



**INDUKSI DAN KULTUR SUSPENSI *FRIABLE*
EMBRYOGENIC CALLUS UBI KAYU (*Manihot esculenta*)
MENGUNAKAN KULTIVAR LOKAL DAN JENIS AUKSIN
YANG BERBEDA**

TESIS

Oleh
ENDAH CAHYANI SIMAMORA
NIM 211520101001

**PROGRAM STUDI MAGISTER AGRONOMI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2023



**INDUKSI DAN KULTUR SUSPENSII *FRIABLE*
EMBRYOGENIC CALLUS UBI KAYU (*Manihot esculenta*)
MENGUNAKAN KULTIVAR LOKAL DAN JENIS AUKSIN
YANG BERBEDA**

TESIS

Diajukan guna memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan
Program Magister pada Program Studi Agronomi (S2)
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh:

ENDAH CAHYANI SIMAMORA

NIM 211520101001

**JURUSAN MAGISTER AGRONOMI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2023

PERSEMBAHAN

Dengan Puji Syukur atas kehadiran Allah SWT, saya persembahkan karya tulis ilmiah ini kepada :

- 1) Orang tua tercinta Ibu Dwi Darmiati dan Bapak S. Maulana Simamora. Terimakasih atas semua kasih sayang dan cintanya, dukungan baik moril maupun materil serta doa dan pengorbanan yang tak terhingga. Semoga Mama dan Ayah senantiasa dilindungi oleh-Nya serta dilimpahkan kasih dan rahmat-Nya.
- 2) Adinda tercinta Aisyah Nasria Putri Simamora yang telah memberikan dukungan serta doa.
- 3) Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

“Dan Kami pasti akan menguji kamu dengan sedikit ketakutan, kelaparan, kekurangan harta, jiwa, dan buah-buahan. Dan sampaikanlah kabar gembira kepada orang yang sabar.”

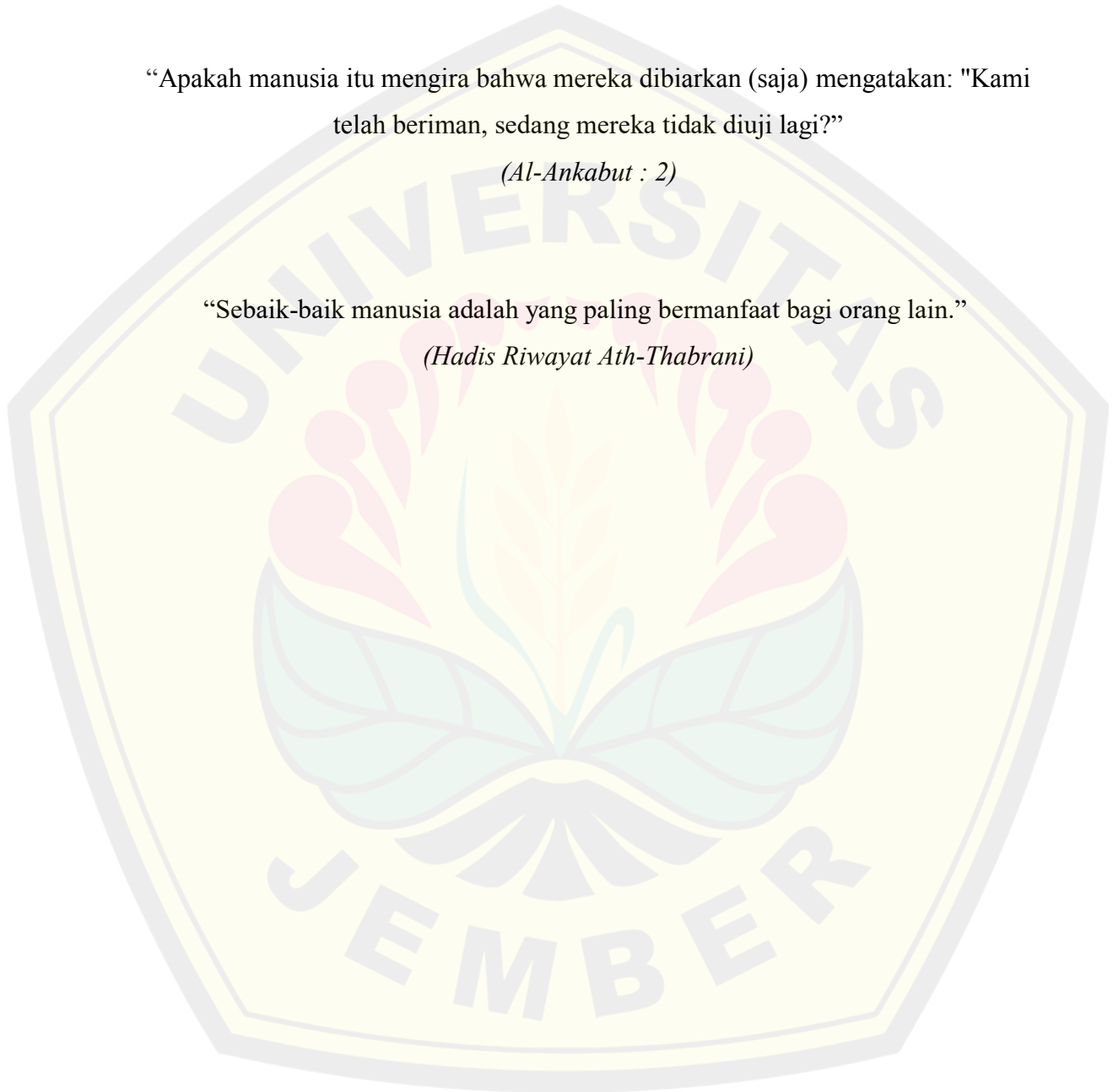
(Q.S Al – Baqarah : 155)

“Apakah manusia itu mengira bahwa mereka dibiarkan (saja) mengatakan: "Kami telah beriman, sedang mereka tidak diuji lagi?"

(Al-Ankabut : 2)

“Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi orang lain.”

(Hadis Riwayat Ath-Thabrani)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Endah Cahyani Simamora

NIM : 211520101001

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul: “Induksi dan Kultur Suspensi *Friable Embryogenic Callus* Ubi Kayu (*Manihot Esculenta*) Menggunakan Kultivar dan Jenis Auksin yang Berbeda” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapati sanksi akademik jika dikemjadian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 17 Juli 2023

Yang menyatakan,

Endah Cahyani Simamora

NIM 211520101001

TESIS

**INDUKSI DAN KULTUR SUSPENSI *FRIABLE*
EMBRYOGENIC CALLUS UBI KAYU (*Manihot esculenta*)
MENGUNAKAN KULTIVAR LOKAL DAN JENIS AUKSIN
YANG BERBEDA**

Oleh:

Endah Cahyani Simamora

NIM 211520101001

Pembimbing

Dosen Pembimbing Skripsi : Dr. Ir. Slameto, M.P

NIP. 196002231987021001

PENGESAHAN

Tesis berjudul **Induksi dan Kultur Suspensi *Friable Embryogenic Callus* Ubi Kayu (*Manihot Esculenta*) Menggunakan Kultivar Lokal dan Jenis Auksin yang Berbeda** telah diuji dan disahkan pada:

Hari :

Tanggal :

Tempat :

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Dr. Ir. Slameto, M.P
NIP.196002231987021001

Ir. Didik Pudji Restanto, M.S.,Ph.D.
NIP. 196504261994031001

Dosen Penguji Utama

Dosen Penguji Anggota

Ir. Sigit Soeparjono, M.S., Ph.D.
NIP. 196005061987021001

Tri Handoyo, S.P., Ph.D
NIP. 197112021998021001

Mengesahkan
Dekan,

Prof. Dr. Ir. Soetriono, MP.
NIP. 196403041989021001

RINGKASAN

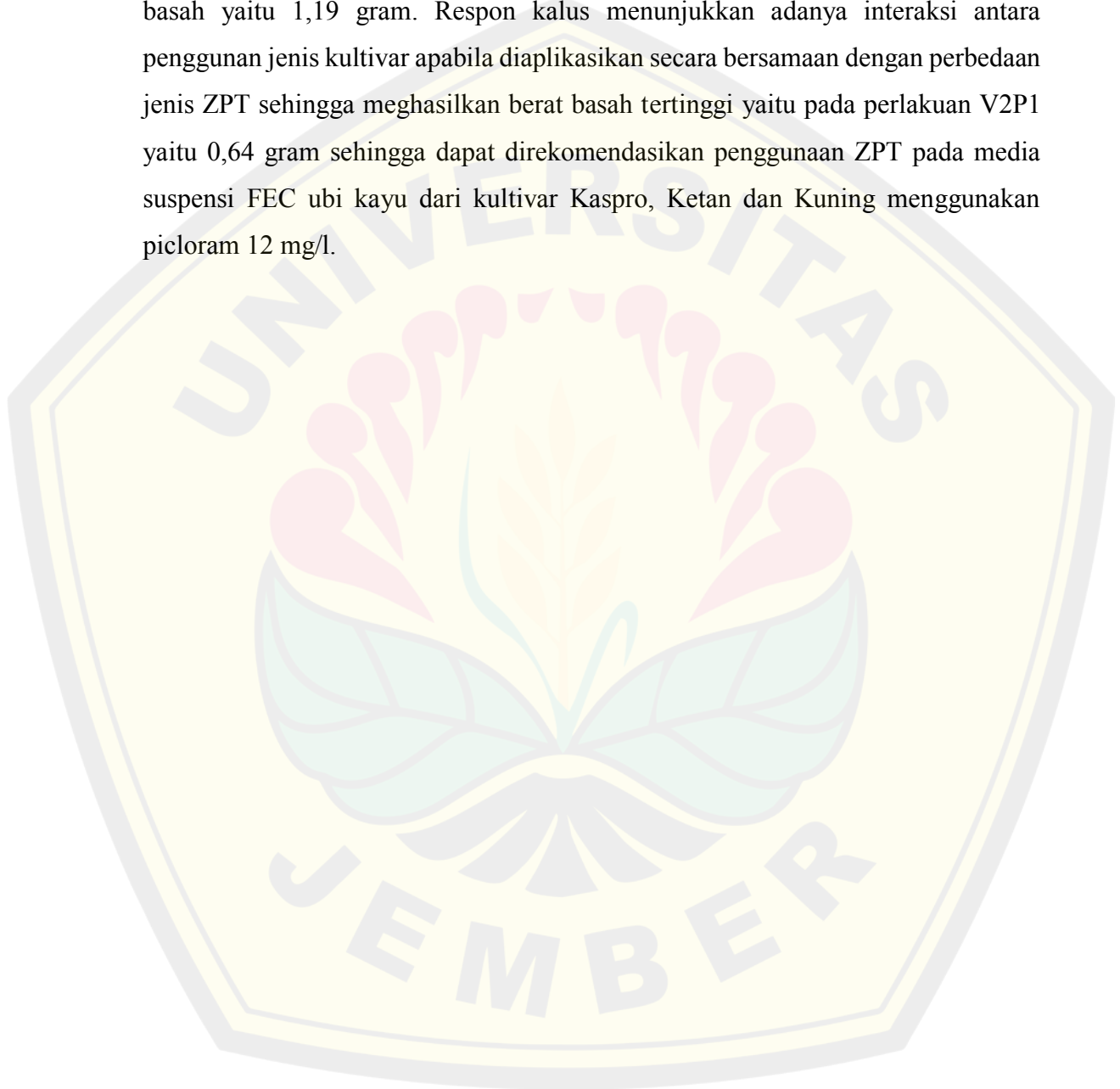
Induksi Dan Kultur Suspensi *Friable Embryogenic Callus* Ubi Kayu (*Manihot Esculenta*) Menggunakan Jenis Kultivar Lokal Dan Auksin Berbeda; Endah Cahyani Simamora, 211520101001; halaman; Program Studi Magister Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Ubi kayu menjadi salah satu komoditas yang diprioritaskan oleh pemerintah untuk dikembangkan serta tanaman yang relatif mudah dibudidayakan. Produksi tanaman ubi kayu lima tahun terakhir 2010 – 2015 cenderung menurun sehingga dibutuhkan usaha peningkatan tanaman ubi kayu produktivitas yang tinggi dan kejelasan varietas melalui pemenuhan kebutuhan benih atau bibit varietas unggul ubi kayu. Salah satu teknologi perakitan tanaman secara vegetatif menggunakan sel somatik adalah hibridisasi somatik dan transformasi genetic. Salah satu tahapan penting dari menghasilkan protoplas melalui kalus adalah meningkatkan aktivitas proliferasi sel untuk memperbanyak jumlah sel, maka FEC akan dikulturkan pada media cair atau suspensi. Beberapa kendala dalam menghasilkan kalus yang embriogenik yaitu genotipe dari tanaman serta eksplorasi dari metode dan protokol induksi FEC dari beberapa kultivar ubi kayu masih terbatas.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Ekofisiologi dan Kultur Jaringan Fakultas Pertanian mulai November 2022 sampai dengan Juni 2023 dengan tahapan perbanyak kultur in-vitro tanaman ubi kayu, induksi kalus dari swollen yang terbentuk dari perkembangan auxillary bud, kemudian induksi kalus FEC dari beberapa kultivar sebagai perlakuan yaitu Kaspro, Ketan, Kuning pada media GD, dilanjutkan dengan proliferasi pada kultur suspensi dengan perlakuan ZPT yaitu picloram 12 mg/L, 20 mg/l, dan 2,4-D 12 mg/l. Kemudian diuji kemampuan regenerasinya pada media 1 mg/l NAA dilanjutkan pada media induksi tunas pada media 0,4 mg/L BAP.

Hasil penelitian yang diperoleh yaitu Respon kalus dari kultivar lokal menunjukkan bahwa penggunaan kultivar lokal menghasilkan FEC dengan

kemampuan proliferasi yang sama berdasarkan peninjauan pada variabel pengamatan volume suspensi, berat segar dan viabilitas sel sebab FEC sudah diseleksi di media padat sebelum kultur suspensi. Tingkat proliferasi kalus pada jenis ZPT yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan hasil suspensi FEC pada pertambahan berat basah dengan pemberian P1 yang menghasilkan rata-rata berat basah yaitu 1,19 gram. Respon kalus menunjukkan adanya interaksi antara penggunaan jenis kultivar apabila diaplikasikan secara bersamaan dengan perbedaan jenis ZPT sehingga menghasilkan berat basah tertinggi yaitu pada perlakuan V2P1 yaitu 0,64 gram sehingga dapat direkomendasikan penggunaan ZPT pada media suspensi FEC ubi kayu dari kultivar Kaspro, Ketan dan Kuning menggunakan picloram 12 mg/l.



SUMMARY

Induction and Suspension Culture Of Cassava (*Manihot Esculenta*) Friable Embryogenic Callus With Different Local Cultivar And Auxin; Endah Cahyani Simamora, 211520101001; page; Program Study od Magister Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Jember.

Cassava has become one of the prioritized commodities for development by the government and is a relatively easy crop to cultivate. The production of cassava in the past five years shown a declining trend, to increase the productivity of high-yielding cassava plants and ensure the availability of superior cassava seeds or seedlings. One of the technologies through vegetative from tissue culture is somatic hybridization and genetic transformation. An important step in producing protoplasts through callus formation is to enhance cell proliferation to increase the cell division. Therefore, friable callus (FEC) is cultured in liquid media or suspension. However, there are several challenges in generating embryogenic callus, such as the genotypes of the plants and the exploration of methods and protocols for FEC induction from various cassava cultivars.

The research was conducted at the Laboratory of Ecophysiology and Tissue Culture, Faculty of Agriculture, from November 2022 to June 2023. The study involved started from in vitro culture multiplication of cassava plants, callus induction from swollen structures formed by the development of auxiliary buds, followed by FEC induction from several cultivars, namely Kaspro (V1), Ketan (V2), and Kuning (V3) on GD media. This was followed by proliferation in suspension culture with the application of auxin plant growth regulators (PGR), namely picloram at 12 mg/L (P1), 20 mg/L (P2), and 2,4-D at 12 mg/L (P3). Subsequently, the regeneration capacity was tested on 1 mg/L NAA media and further induced shoot formation on 0.4 mg/L BAP medium.

The results of the study showed that the callus response of local cultivars resulted in FEC with similar proliferation capabilities, as observed through variables such as suspension volume, fresh weight, and cell viability because of FEC was selected on solid medium before suspension. The level of callus proliferation with different types of auxin showed differences in the growth of FEC

suspension based on the increase in fresh weight, with P1 treatment resulting in an average fresh weight of 1.19 grams. The callus response indicated there was interaction between the use of different cultivar types when applied simultaneously with different types of auxin, resulting in the highest fresh weight in the V2P1 treatment, which was 0.64 grams. Therefore, the recommendation of auxin in suspension culture for Kaspro, Ketan, and Kuning is using picloram at 12 mg/l.



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Induksi dan Kultur Suspensi *Friable Embryogenic Callus* Ubi Kayu (*Manihot Esculenta*) Menggunakan Kultivar Lokal dan Jenis Auksin yang Berbeda” guna memenuhi salah satu syarat menyelesaikan Pendidikan Magister (S2) pada Program Studi Magister Agronomi. Penyusunan tesis ini dapat diselesaikan karena bantuan berbagai pihak dan penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Soetriono, MP., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
2. Tri Handoyo, S.P., Ph.D selaku Ketua Program Studi Magister Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember.
3. Dr. Ir. Slameto, M.P., selaku Dosen Pembimbing Utama yang sudah memberikan arahan dan masukan dalam penyusunan tesis.
4. Ir. Didik Pudji Restanto, M.S, Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang sudah memberikan arahan dan masukan dalam penyusunan tesis.
5. Ir. Sigit Soeparjono, M.S., Ph.D. selaku Dosen Penguji Utama yang banyak memberikan petunjuk dan evaluasi dalam penyusunan tesis.
6. Mohammad Nur Khozin, S.P.,M.P selaku Ketua Laboratorium Ekofisiologi, PS. Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember yang telah memberikan izin pelaksanaan penelitian.
7. Budi Kriswanto, SP., M.P. selaku Laboran di Laboratorium Ekofisiologi yang telah mengarahkan dan membantu dalam penelitian.
8. Seluruh Dosen Fakultas Pertanian, Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan.
9. Kedua orang tua, Adikku Aisyah yang telah memberikan dukungan moril, doa dan materi dalam penyelesaian tesis.
10. Tante Trias, Om Hanis Subayli, Bude Ibnu Marhaeniyah, Kakak Ravinda Lady Parlindung yang memberikan dukungan moril selayaknya orang tua selama di Jember.

11. Teman seperjuangan penelitian Fairuz L. Hanifah, Fayza Santika, Izna Arsyika, Alsura Tri Budha, Fauziatuz Zahro, Rifngatul Atiqoh serta teman-teman seperjuangan kultur jaringan lainnya.
12. Teman seperjuangan Asisten Laboratorium Mata Kuliah Kultur Jaringan FKIP Biologi Zaki, Izna, Fairuz, Calen, Dima dan Candra.
13. Rekan seperjuangan PS. Magister Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
14. Semua pihak yang terlibat dalam penelitian dan penulisan tesis.

Penulis telah berusaha untuk menyelesaikan tanggung jawab dengan sebaik-baiknya dan menyadari bahwa terdapat kekurangan dalam penulisan karya tulis ilmiah ini. Penulis memohon maaf dan berterimakasih jika nantinya ada kritik dan saran yang membangun sehingga dapat menyempurnakan penulisan selanjutnya. Demikian yang dapat dituliskan, semoga tulisan ini memberikan informasi dan ilmu yang bermanfaat.

Jember, Juli 2023

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman Sampul.....	i
Halaman Cover.....	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN.....	v
PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
PRAKATA.....	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
2.1 Tanaman Ubi Kayu.....	2
2.2 <i>Friable Embryonic Callus</i>	5
2.3 Kultur Suspensi Sel.....	7
2.4 Zat Pengatur Tumbuh Auksin.....	8
2.5 Regenerasi.....	10
2.4 Hipotesis.....	11
BAB 3 METODOLOGI.....	11
3.1 Waktu dan Tempat	11
3.2 Alat dan Bahan.....	11
3.3 Rancangan Percobaan	11
3.4 Prosedur Pelaksanaan	12
3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	12
3.4.2 Sterilisasi Eksplan dan Penanaman.....	12
3.4.3 Induksi Kalus	13
3.4.4 Kultur Suspensi.....	13
3.4.5 Regenerasi Kalus	13
3.5 Variabel Pengamatan	14

3.5.1 Frekuensi FEC (%).....	14
3.5.2 Volume Sel (ml).....	14
3.5.3 Viabilitas Sel.....	14
3.5.4 Berat Segar Kalus.....	15
3.5.6 Histologi.....	15
3.5.7 Regenerasi Kalus.....	16
3.6 Analisis Data.....	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17
4.1 Hasil.....	17
4.1.1 Hasil Analisis Sidik Ragam Perlakuan Jenis Kultivar.....	17
4.1.2 Tapan Regenerasi Kalus Embrio Somatik Kultivar Ubi Kayu.....	18
4.1.3 Hasil ANOVA Perlakuan Jenis Kultivar dan ZPT.....	22
4.1.5 Berat Segar Kalus.....	24
4.1.6 Viabilitas Sel.....	25
4.1.7 Histologi Kalus.....	27
4.2 Pembahasan.....	36
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	41
5.1 Kesimpulan.....	41
5.2 Saran.....	41
DAFTAR PUSTAKA.....	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar 4. 1 Tahapan regenerasi pada kultivar kaspro.....	19
Gambar 4. 2 regenerasi pada kultivar ketan.....	20
Gambar 4. 3 Tahapan regenerasi pada kultivar kuning.....	21
Gambar 4. 4 Kenaikan volume kalus pada kultur suspensi perlakuan P1	23
Gambar 4. 5 Kenaikan volume kalus pada kultur suspensi perlakuan P2	23
Gambar 4. 6 Kenaikan volume kalus pada kultur suspensi perlakuan P3	24
Gambar 4. 7 Pengaruh Jenis Auksin terhadap Berat Segar kalus	24
Gambar 4. 8 Pengaruh perlakuan kultivar dan zat pengatur tumbuh terhadap viabilitas sel kultur suspensi.....	26
Gambar 4. 9 Uji vibilitas pada kultur suspensi dengan haemocytometer	27
Gambar 4. 10 Uji vibilitas pada kultur suspensi dengan haemocytometer	28
Gambar 4. 11 Uji vibilitas pada kultur suspensi dengan haemocytometer	29
Gambar 4. 12 Histologi kalus pada kultivar kaspro pada media CIM.....	31
Gambar 4. 13 Histologi FEC kultivar kaspro pada media GD	32
Gambar 4. 14 Histologi kalus pada kultivar kaspro pada media NAA.....	33
Gambar 4. 15 Histologi kalus kultivar kaspro pada media P1	34
Gambar 4. 16 Hasil Pengamatan Kultur Suspensi pada 7 HST, 14 HST, 21 HST dan 28 HST	36

DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Uraian Perlakuan.....	12
Tabel 4. 1 Rangkuman nilai F Hitung ANOVA pada FEC.....	17
Tabel 4. 2 Hasil Uji DMRT 5% Pengaruh Jenis Kultivar FEC	18
Tabel 4. 3 Rangkuman Hasil ANOVA Kombinasi Perlakuan (V) dan Auksin (P) terhadap Index Pertumbuhan Kultur Suspensi.....	22
Tabel 4. 4 Hasil Uji DMRT 5% Interaksi Pengaruh Kultivar dan jenis ZPT terhadap berat segar.....	25



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pemanfaatan ubi kayu (*Manihot esculenta*) di Indonesia cukup luas, diantaranya bahan pangan pokok sumber karbohidrat, substitusi (Widaningsih, 2015) dan kebutuhan industri misalnya pembuatan tepung dan biofuel (Sriroth, 2010). Melalui program diversifikasi pangan, ubi kayu menjadi salah satu komoditas yang diprioritaskan oleh pemerintah untuk dikembangkan (Nugroho, 2016). Selain itu, tanaman ubi kayu merupakan tanaman yang relatif mudah dibudidayakan sebab mampu tumbuh di lahan marginal, toleran terhadap cekaman lingkungan serta dapat disimpan lama setelah panen (Zhang et al., 2018) sehingga dibutuhkan ketersediaan hasil panen ubi kayu, sedangkan menurut data BPS (2015), produksi tanaman ubi kayu lima tahun terakhir 2010 – 2015 cenderung menurun sehingga dibutuhkan usaha peningkatan tanaman ubi kayu dengan produktivitas yang tinggi dan kejelasan varietas melalui pemenuhan kebutuhan benih atau bibit varietas unggul ubi kayu.

Varietas unggul tanaman ubi kayu dapat diperoleh melalui perakitan tanaman melalui penggabungan dari beberapa sifat unggul tanaman. Salah satu pendekatan yang dapat dilakukan adalah teknik kultur jaringan sebab terdapat kesulitan tanaman ubi kayu untuk dikembangkan secara generatif (Feng et al, 2020). Salah satu teknologi perakitan tanaman secara vegetatif menggunakan sel somatik adalah hibridisasi somatik dan transformasi genetik. Menurut Suryowinoto (1996), isolasi protoplas adalah teknik untuk menghasilkan protoplas yang utuh dan *viable* dari jaringan tanaman dengan cara menghilangkan dinding selnya. Keberhasilan regenerasi tanaman dari protoplas telah dilaporkan dengan menggunakan protoplas dari sel mesofil daun, kalus dan suspensi sel (Shi, Yang and He, 2016). Protoplas dapat diisolasi melalui kalus yang *friable* atau FEC (*friable embryogenic callus*) yang memiliki karakteristik kuning pucat, bertekstur remah, terdiri atas sejumlah unit sel embriogenik (Taylor, 1996).

Salah satu tahapan penting dari menghasilkan protoplas melalui kalus adalah meningkatkan aktivitas proliferasi sel secara cepat untuk memperbanyak

jumlah sel, maka FEC akan dikulturkan pada media cair atau suspensi. Metode suspensi telah banyak dimanfaatkan untuk propagasi tanaman, produksi metabolit sekunder, menyediakan propagul untuk transformasi genetik dan isolasi protoplas (Yusuf et al. 2013, Wan Nur Syuhada et al. 2016). Media suspensi untuk kultur kalus merupakan metode yang dapat mempercepat proliferasi sel dengan meningkatkan jumlah kalus dalam waktu singkat serta meningkatkan ukuran kalus agar lebih seragam. Sistem kultur suspensi dilakukan dengan perendaman yang berlangsung secara terus-menerus dan digojok (*shake*) di atas *orbital shaker* sehingga mampu memisahkan agregat sel, mengatasi distribusi bentuk sel agar lebih seragam serta menyediakan oksigen dan nutrisi yang terkandung di dalam media dapat merata dan homogeni untuk menjaga respirasi sel tetap optimal (Kong, 2020; Riyadi, 2016).

Salah satu tahapan penting dari menghasilkan protoplas melalui kalus adalah meningkatkan aktivitas proliferasi sel secara cepat untuk memperbanyak jumlah sel, maka FEC akan dikulturkan pada media cair atau suspensi (Karjadi, 2007). Berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Taylor et al (1996) jenis auksin yang dapat menginduksi FEC adalah picloram sehingga untuk meningkatkan proliferasi sel di media suspensi ditambahkan picloram 12 mg/l kemudian menurut Lentz (2021) FEC yang dikulturkan pada media dengan penambahan picloram 20 mg/l dapat meningkatkan proliferasi pada kultivar asal Brazil. Beberapa kultivar juga mampu menginduksi kalus sampai terbentuk somatik embrio dengan pemberian 2,4-D hingga 40% (Mongomake, 2015; Slameto, 2023). Selain faktor hormon yang mampu menginduksi FEC, terdapat beberapa kendala dalam menghasilkan kalus yang embriogenik yaitu genotipe dari tanaman. Rossin and Ray (2011) telah melaporkan bahwa terdapat perbedaan signifikan dari kemampuan setiap kultivar ubi untuk menghasilkan kalus yang embriogenik serta menurut Chavarriaga-Aguirre (2016) terdapat keterbatasan dalam menghasilkan FEC dalam jumlah besar sebab eksplorasi dari metode beberapa kultivar ubi kayu masih terbatas.

Berdasarkan uraian di atas, dapat diketahui bahwa media kultur suspensi pada FEC serta jenis kultivar dapat mempengaruhi tingkat proliferasi sel sehingga

dibutuhkan peningkatan proliferasi sel agar didapatkan sel yang *viable*. Kultur suspensi FEC pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan eksplan dari beberapa kultivar lokal tanaman ubi kayu sehingga dibutuhkan komposisi media yang optimal untuk meningkatkan proliferasi sel pada media suspensi melalui perbedaan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh auksin.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana respon induksi kalus dari beberapa kultivar lokal pada media induksi FEC?
2. Bagaimana respon kalus dari beberapa kultivar lokal pada media kultur suspensi?
3. Bagaimana tingkat proliferasi kalus beberapa kultivar lokal pada perbedaan jenis auksin pada media suspensi?
4. Bagaimana respon kalus hasil interaksi penggunaa kultivar lokal sebagai eksplan dan jenis auksin pada media suspensi?

1.3 Tujuan

1. Mengetahui respon induksi kalus dari beberapa kultivar lokal pada media induksi FEC.
2. Mengetahui respon kalus dari beberapa kultivar lokal pada media suspensi.
3. Mengetahui tingkat proliferasi kalus beberapa kultivar lokal pada perbedaan jenis auksin pada media suspensi.
4. Mengetahui respon kalus hasil interaksi penggunaa kultivar lokal sebagai eksplan dan jenis auksin pada media suspensi

1.4 Manfaat Penelitian

Memberikan informasi mengenai protokol induksi kalus embriogenik pada tahapan kultur suspensi sel sebagai tahapan krusial dalam proliferasi sel sebagai bahan untuk perakitan genotipe unggul baru melalui pendekatan kultur jaringan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Ubi Kayu

Berdasarkan hasil identifikasi tumbuhan oleh Herbarium Medanense (2016), klasifikasi tanaman singkong adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae atau tumbuh-tumbuhan
Divisi	: Spermatophyta atau tumbuhan berbiji
Sub divisi	: Angiospermae atau berbiji tertutup
Kelas	: Dicotyledoneae atau biji berkeping dua
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: Manihot
Spesies	: <i>Manihot esculenta</i>

Ubi kayu termasuk tanaman hasil introduksi yang berasal dari negara Brazil. Ubi kayu termasuk tanaman perdu kaya karbohidrat dari keluarga Euphorbiaceae yang dikenal luas pemanfaatannya mulai dari daun sebagai sayuran dan umbinya dapat dijadikan bahan pangan, pakan, dan industri (Widaningsih, 2015). Ubi kayu (*Manihot esculenta*) merupakan bahan makanan pokok ketiga setelah padi dan jagung. Selain itu, tanaman ubi kayu merupakan tanaman yang relatif mudah untuk dibudidayakan sebab mampu tumbuh di lahan marginal, toleran terhadap cekaman lingkungan serta dapat disimpan lama setelah panen (Zhang et al., 2018). Ubi kayu mempunyai potensi sebagai sumber karbohidrat yang penting sebagai bahan pangan, khususnya bagi negara yang sedang berkembang, seperti Indonesia.

Meskipun peningkatan konsumsi dan produksi ubi kayu terus meningkat, kandungan nutrisi ubi kayu seperti protein, beta karoten dan mineral masih rendah. Beberapa upaya seleksi dan evaluasi terhadap sumber daya genetik ubi kayu untuk memperoleh kandidat ubi kayu unggul telah banyak dilakukan sehingga dibutuhkan ketersediaan bibit unggul dan varietas yang jelas. Oleh sebab itu, dibutuhkan ketersediaan hasil panen ubi kayu, sedangkan menurut data BPS (2015), produksi tanaman ubi kayu lima tahun terakhir 2010 – 2015 cenderung menurun. Rendahnya produksi tersebut disebabkan oleh beberapa alasan antara lain umumnya

pengembangan ubi kayu dilakukan di lahan marginal; budidaya ubi kayu di tingkat petani yang masih dilakukan secara sederhana, jarak tanam terlalu rapat, tidak dipupuk secara intensif, dan tidak dilakukan pengendalian hama dan penyakit secara intensif sehingga produksinya kurang maksimal sehingga dibutuhkan usaha peningkatan tanaman ubi kayu yang mampu menghasilkan produktivitas yang tinggi dan kejelasan varietas melalui penggunaan varietas unggul (Nugroho, 2016).

Penelitian perbanyakan dan perbaikan tanaman ubi kayu melalui teknik kultur jaringan telah banyak dilakukan. Penelitian yang dilakukan mencakup penelitian pembentukan tunas baru (multiplikasi tunas) dan pembentukan kalus embriogenik (Hankoua et al., 2006; Onuoch dan Onwubiku, 2007; Feitosa et al., 2007; Rossin dan Rey, 2011; Wongtiem et al., 2011; Mapayi et al., 2013; Hartati et al., 2013). Penelitian perbaikan tanaman ubi kayu di Afrika dan negara Amerika Latin difokuskan terhadap perbaikan genotipe atau varietas yang tahan terhadap hama dan penyakit (Mushiyimana et al., 2011; Cacai et al., 2013). Perbaikan sifat ubi kayu yang telah dilakukan di Indonesia yaitu peningkatan kandungan nutrisi pada umbi seperti jenis protein tertentu, komponen lain seperti fosfor dan rasio antara amilosa dan amilopektin (Sudarmonowati et al., 2002).

2.2 *Friable Embryonic Callus*

Perbanyakan *in vitro* dapat dilakukan melalui pembentukan tunas lateral dan melalui embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik merupakan salah satu teknik yang menjadi alternatif untuk perbanyakan tanaman. Melalui teknik ini, embrio somatik dapat dihasilkan secara langsung dan secara tidak langsung tanpa melalui fusi gamet. Embrio somatik yang terbentuk secara tidak langsung terjadi melalui fase antara, yaitu dengan membentuk kalus dan kembali menjadi meristematik dari sel yang diferensiasi (Santos & Paz, 2016).

Kalus embriogenik yang dapat berkembang secara bertahap merupakan komponen yang penting pada tahap embriogenesis somatik tidak langsung. Kalus embriogenik yang bersifat *friable* digunakan untuk teknik transformasi genetik atau fusi protoplas untuk perakitan tanaman. Kalus terbentuk dari eksplan yang mengalami pada proses penanaman yang ditandai dengan adanya pembengkakan dari eksplan tersebut (Zulkarnain, 2014). Untuk membentuk FEC diperlukan

beberapa tahapan yang melibatkan penggunaan beberapa kombinasi zat pengatur tumbuh dan asam amino yang berbeda untuk setiap genotip ubi kayu. Meskipun begitu secara umum tahapan inisiasi FEC hampir semuanya sama yaitu yang harus dilakukan pertama adalah induksi embrio somatik primer (ESP) yaitu embrio somatik yang dihasilkan langsung dari kalus yang bersifat embriogenik. Dalam hal ini biasanya penggunaan auksin dengan konsentrasi yang tinggi seperti Picloram dan juga penambahan asam amino seperti L-Tyrosine mampu menginduksi ESP dengan baik. Setelah ESP terbentuk tahapan berikutnya adalah multiplikasi embrio somatik sekunder (ESS; embrio somatik yang terbentuk di atas permukaan embrio somatik primer). Embrio somatik tumbuh dan berkembang akan melewati fase globular, hati, torpedo dan kotiledon. Dalam ESP dan ESS, fase seperti torpedo dan kotiledon tidak diinginkan karena tujuan akhirnya adalah terbentuknya kalus FEC dengan bentuk seperti nodul-nodul yang saling bersusun ke atas seperti piramida dengan tekstur yang sangat remah dibandingkan kalus somatik biasa. Tahapan berikutnya yaitu induksi *fresh* FEC (FFEC) dan terakhir adalah subkultur FEC dan multiplikasi. Untuk ESP dan ESS pada ubi kayu yang terbentuk paling banyak berasal dari eksplan young leaf lobes atau tunas pucuk yang diinduksi pada media kultur yang ditambahkan hormon auksin seperti Picloram atau 2,4-D dengan konsentrasi yang tinggi (Fitriani, 2016).

Marlin et al. (2012) juga menjelaskan pembengkakan eksplan merupakan respon dari tanaman yang mengakibatkan sebagian besar karbohidrat dan protein yang ada terakumulasi pada jaringan yang diberi pelukaan. Pembelahan sel yang mengarah pada pembentukan kalus ditandai dengan adanya perubahan yang terjadi pada eksplan. Pembelahan tidak terjadi pada semua sel dalam jaringan asal, tetapi hanya sel dilapisan periphery yang mengalami diferensiasi secara terus menerus (Gunawan, 1988). Warna kalus menggambarkan penampilan visual kalus dan diamati dengan melihat secara langsung sehingga dapat diketahui kalus yang masih memiliki sel-sel aktif dan atau sel-sel yang telah mati (tidak mengalami diferensiasi). Protoplas dapat diisolasi melalui kalus yang friable atau FEC (*friable embryogenic callus*) yang memiliki karakteristik kuning pucat, bertekstur remah, terdiri atas sejumlah unit sel embriogenik (Taylor, 1996). FEC akan memudahkan

proses isolasi dinding sel sebab dinding sel pada kalus masih relatif tipis. Tahapan induksi dan multiplikasi menjadi kesulitan dan membutuhkan modifikasi protokol untuk produksi FEC yang ditujukan untuk perbaikan sifat tanaman dengan bioteknologi.

2.3 Kultur Suspensi Sel

Kultur suspensi lebih efektif dari segi pengeluaran sebab tidak dibutuhkan agen pepadat sehingga semua sel mendapatkan kesempatan yang sama dalam menyerap nutrisi dan ZPT dari media. Secara umum kultur suspensi menunjukkan multiplikasi dan proliferasi yang tinggi dibandingkan media padat (Ascough and Fennel, 2004). Penggojokan pada kultur suspensi memungkinkan distribusi nutrisi dan zpt sehingga tidak terdapat zona penisipan yang terbentuk di sekitar eksplan seperti pada media padat serta penggojokan meningkatkan aerasi dari eksplan sehingga dapat meningkatkan kemampuan pertumbuhan (Jackson et al. 1991).

Media kultur suspensi sel disesuaikan dengan tujuan yang akan dicapai, misalnya untuk meningkatkan proliferasi sel sehingga dibutuhkan media suspensi yang dapat mempercepat pembelahan sel dalam jumlah banyak. Salah satu metode yang dapat dilakukan untuk meningkatkan proliferasi sel adalah menambahkan hormon auksin pada media sebab auksin berperan dalam pertumbuhan dan pemanjangan sel, dapat menginduksi pembelahan sel serta diferensiasi sel (Karjadi, 2007). Keberhasilan kultur suspensi sangat dipengaruhi oleh perlakuan yang diberikan serta beberapa faktor lain seperti sub kultur pada bahan tanamnya. Sub kultur kalus bertujuan untuk tetap menyediakan nutrisi bagi kalus, selain itu sub kultur kalus juga meningkatkan bobot biomasanya. Pengaturan kombinasi media cair sebagai bahan kultur suspensi sangat berpengaruh besar terhadap keberhasilan kultur sel tanaman dan juga perlakuan subkultur pada sel suspensi dapat meningkatkan perkembangan menggunakan media baru dengan ketentuan tidak melebihi batas kepadatan minimum yang justru dapat mengakibatkan pembelahan dan pertumbuhan sel menjadi terhenti. Menurut Ahmad et al (2021) pembentukan ukuran dan bentuk sel pada kultur suspensi dipengaruhi oleh jenis auksin yang digunakan pada komposisi media cair serta perbedaan genotipe dari chamomile memberikan respon yang berbeda pada kultur media cair melalui persentase kalus

yang terbentuk sebesar 78,83% dan volume sel yang viable tertinggi pada genotipe Ishfan sebesar 16,16 cm³.

Kultur suspensi dibutuhkan untuk tahapan isolasi protoplas pada fusi protoplas. Metode fusi protoplas atau hibridisasi somatik merupakan salah satu metode yang dapat mengatasi permasalahan dalam pemuliaan tanaman dengan sifat unggul yang disandi oleh banyak gen (Milliam et al., 1995). Mariska & Husni (2006) melaporkan bahwa beberapa hasil penelitian dengan fusi protoplas telah berhasil meningkatkan keragaman genetic tanaman, produktivitas, perbaikan sifat ketahanan terhadap hama, penyakit dan nematoda, serta perbaikan sifat-sifat kualitatif seperti kandungan minyak yang tinggi. Teknik ini diperlukan dalam pemuliaan tanaman untuk menyeleksi dan merakit varietas hibrida secara lebih cepat (Riyadi, 2010). Taylor et al (1996) melaporkan bahwa proliferasi sel pada media suspensi kalus FEC ubi kayu menghasilkan presentase FEC sebesar 95% pada media cair dengan penambahan picloram. FEC yang terbentuk akan digunakan untuk menghasilkn protoplas (Taylor, 1996; Sofiari, 1998).

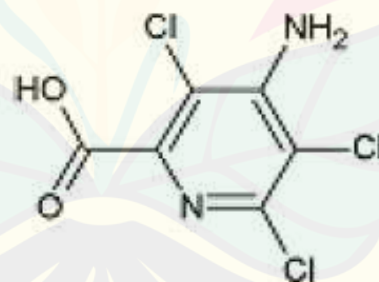
2.4 Zat Pengatur Tumbuh Auksin

Adapun zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk tujuan induksi kalus adalah jenis auksin dan sitokinin. Auksin diketahui mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman melalui beberapa perubahan pada level seluler, termasuk mempengaruhi proses embryogenesis (Kelley and Riechers 2007; Vanneste and Frim 2009). Peningkatan respirasi merupakan respon dari auksin dalam pemanjangan dan pembelahan sel. Peningkatan respirasi dari induksi dan atau penambahan auksin dibutuhkan untuk pemenuhan energy dan prekursor pada proses sintesis protein dan RNA serta replikasi DNA. Induksi auksin akan meningkatkan respirasi sel sebagai hasil dari peningkatan aktivitas sel mitokondria atau hasil dari stimulasi pertumbuhan, difrensiasi dan propagasi (Leonove et al, 1985).

Pemanjangan sel dan pertumbuhan sel diregulasi dari beberapa faktor termasuk hormone. Auxin berperan mengontrol pertumbuhan dan perkembangan tanaman melalui pembelahan sel (proliferasi), pertumbuhan (pembesaran dan pemanjangan) dan difrensiasi. Pembesaran sel terjadi terlebih dahulu dibandingkan

dengan pembelahan sel. Perkembangan sel termasuk pemanjangan vakuola didefinisikan sebagai tekanan turgor yang meningkatkan ukuran sel, Auksin mengaktifkan ekspresi gen terkait dinding sel dan menstimulasi pemopaaan sintesis protein yang memicu peningkatan keasaman apoplast. Auksin juga mengaktifkan plasma membrane (PM) H^+ ATPases melalui regulasi fosforilasi threonine PM H^+ ATPase yang memicu pengasaman apoplast sehingga pada kondisi asam, protein penghancur dinding sel aktif dan menyebabkan pemanjangan dinding sel. Perubahan pada dinding sel memicul sel mengaktifasi calcium channel yang memompa kalsium ke dinding sel dan meningkatkan pH sehingga menyebabkan terhentinya pertumbuhan. Sehingga auksin berperan sebagai cytoskeleton (Afs dan cMTs) serta meningkatkan pengangkutan vesikel yang mengandung bahan penyusun dinding sel yang baru (Majda and Robert, 2018).

Zat pengatur tumbuh Auksin yang paling banyak digunakan yaitu dari jenis 2,4-D dan Picloram. Picloram merupakan herbisida auksin (kategori pirimidin) dan umumnya digunakan pada konsentrasi yang rendah sebagai zat pengatur tumbuh (Roostika, 2012), struktur kimia dari picloram dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2. 1 Struktur Kimia Picloram (Abramović, 2007)

Pada kultur suspensi kalus ubi kayu ditambahkan hormon auksin jenis picloram pada media kultur. Berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Taylor et al (1996) jenis auksin yang dapat menginduksi FEC dalam persentase yang tinggi adalah picloram dibandingkan 2,4-D sehingga untuk meningkatkan proliferasi sel di media suspensi ditambahkan picloram 12 mg/L sedangkan menurut Lentz et al (2018), dibutuhkan penambahan picloram 20 mg/L untuk meningkatkan proliferasi

kalus pada genotipe rekalsitan Verdinha hingga menghasilkan kalus fase torpedo (2018). Berdasarkan penelitian Roostika (2012) diketahui perlakuan terbaik untuk induksi kalus adalah picloram 21 μM . Penambahan picloram 21 μM pada media yang diperkaya dengan senyawa N-organik mampu meningkatkan jumlah kalus embriogenik tanaman nanas. Jenis auksin 2,4-D diduga mempengaruhi metabolisme RNA, yang mengontrol metabolisme protein, yang kemungkinan dilakukan pada proses transkripsi molekul RNA (Maftuchah dkk, 1998). Kenaikan sintesis protein menyebabkan bertambahnya sumber tenaga untuk pertumbuhan.

2.5 Regenerasi

Tanaman memiliki kemampuan dalam meregenerasi sel pasca terjadi pelukaan menjadi jaringan atau organ baru untuk meminimalisir kerusakan lokal. Regenerasi tunas dapat diinduksi dari jaringan somatik dengan melalui reaktivasi sel yang belum berdiferensiasi misalnya embrio somatik yang diperoleh dari kultur kalus dan kultur sel. Terdapat dua cara yang dapat dilakukan untuk regenerasi yaitu organogenesis yaitu organ dapat tumbuh langsung dari eksplan dan embriogenesis somatik yaitu organ terbentuk melalui pembentukan embrio somatik terlebih dahulu. Cara embriogenesis somatik lebih dianjurkan untuk kebutuhan perbaikan sifat tanaman dengan pendekatan kultur jaringan misalnya melalui fusi protoplas atau transformasi genetik lebih dianjurkan karena tanaman yang diperoleh berasal dari satu sel somatik sehingga peluang diperolehnya sel lebih tinggi. Embrio somatik berasal dari sel tunggal yang kompeten dan berkembang membentuk fase globular, heart, torpedo dan kemudian embrio somatik kemudian dikecambahkan membentuk planlet (Purnamaningsih, 2006).

Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan pada tahap regenerasi yaitu keseimbangan nutrisi dalam media dan interaksi zat pengatur tumbuh endogen dan eksogen yang diserap dari media tanam. Hal tersebut akan memengaruhi diferensiasi jaringan tanaman menjadi organ tertentu (Wattimen, 1992). Zhang (2000) melaporkan bahwa hasil suspensi sel dapat ditransfer ke media MSN yaitu MS dengan penambahan NAA 1 mg/l untuk pertumbuhan FEC menjadi embrio selama 2 – 4 minggu. Regenerasi fase torpedo ditransfer pada media CEM untuk fase

recovery selama 3 hari kemudian. Regenerasi tanaman diamati pada media CBM hingga tumbuh tunas selama 4 – 8 minggu.

2.4 Hipotesis

1. Kemampuan kalus membentuk FEC tergantung pada jenis kultivar lokal.
2. FEC yang dihasilkan dari beberapa kultivar ubi kayu memberikan respon yang lebih baik pada media kultur suspensi.
3. Terdapat perbedaan tingkat proliferasi sel beberapa kalus embriogenik (FEC) beberapa kultivar lokal ubi kayu akibat perbedaan konsentrasi picloram pada media suspensi.



BAB 3 METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan November 2022 – Juni 2023 di Laboratorium Ekofisiologi dan *Green House* Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian adalah pot dan gunting stek untuk penanaman stek bibit ubi kayu. Botol, pinset, gunting, pisau scalpel, pH-Meter, *autoclave*, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), bunsen, petridish untuk sterilisasi, pembuatan media, penanaman *in vitro* dan induksi kalus. Erlenmeyer dan *rotary shaker* dan saringan untuk kultur suspensi. Mikroskop cahaya merk Leica EZ4HD dan OptiLab untuk pengamatan kalus dan sel.

Bahan yang digunakan adalah bibit hasil stek dan eksplan tanaman ubi kayu kultivar lokal sesuai perlakuan berbentuk tunas aksilar atau buku batang. Media Murashige and Skoog (MS), Media Gresshoff and Doy (GD), hormon Benzylaminopurine (BAP), picloram, Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), hormon Naphtalena Acetic Acid (NAA).

3.3 Rancangan Percobaan

Sebelum dilakukan kultur suspensi dilakukan evaluasi kemampuan tiap kultivar lokal untuk membentuk FEC melalui percobaan pendahuluan dengan perlakuan jensi kultivar menggunakan rancangan acak lengkap non faktorial. Percobaan kultur suspensi dilakukan dengan rancangan acak lengkap faktorial (RALF) dengan dua faktor kemudian diulang sebanyak tiga kali. Dua faktor tersebut yaitu kultivar tanaman ubi kayu terdiri atas tiga taraf dan jenis Auksin pada kultur suspensi terdiri atas tiga taraf sehingga diperoleh 9 kombinasi perlakuan. Berikut uraian perlakuan pada penelitian ini (Tabel 3.1).

Tabel 3. 1 Uraian Perlakuan

Kultivar Ubi Kayu (V)	Jenis Auksin (P)	Kombinasi Perlakuan		
Kaspro (V1)	Picloram 12 mg/l (P1)	V1.P1	V1.P2	V1.P3
Ketan (V2)	Picloram 20 mg/l (P2)	V2.P1	V2.P2	V2.P3
Kuning (V3)	2,4-D 12 mg/l (P3)	V3.P1	V3.P2	V3.P3

Berikut merupakan model persamaan matematika yang digunakan dalam penelitian:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} : Pengamatan Faktor A taraf ke-i , Faktor B taraf ke-j dan Ulangan ke-k.

μ : Rataan Umum.

α_i : Pengaruh Faktor A pada taraf ke-i.

β_j : Pengaruh Faktor B pada taraf ke-j.

AB_{ij} : Interaksi antara Faktor A dengan Faktor B.

ϵ_{ijk} : Pengaruh galat pada Faktor A taraf ke-i, Faktor B taraf ke-j dan ulangan ke-k.

3.4 Prosedur Pelaksanaan

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat yang digunakan disterilisasi pada autoklaf dengan suhu 121°C selama satu jam. Bahan berupa media disterilisasi pada autoklaf dengan suhu 121°C selama 30 menit.

3.4.2 Sterilisasi Eksplan dan Penanaman

Buku batang tanaman ubi kayu dihilangkan bagian daun kemudian dipotong-potong. Proses sterilisasi dilakukan di LAFC. Eksplan yang telah dipotong-potong digojok dalam larutan alcohol 70% selama 30 detik. Kemudian dilakukan penggojokan sebanyak lima kali, masing-masing selama tiga menit dalam larutan Natrium Hipoklorit 5%. Kemudian dibilas dengan aquades sebanyak dua kali. Eksplan yang sudah disterilisasi ditiriskan di tisu steril kemudian

ditanaman pada media MS (Murashige and Skoog) dengan penambahan BAP 0,1 mg/l.

3.4.3 Induksi Kalus

Eksplan dari tanaman in-vitro dipotong bagian *auxillary bud* kemudian ditanam di media CAM (*cassava auxillary medium*) yaitu media MS dengan BAP 10 mg/L dan CuSO_4 2 μM . Setelah didapatkan pembesaran tunas samping (*swollen*) kemudian *swollen* dipindahkan ke media pada keadaan gelap di suhu 28°C. pada media CIM (*cassava callus induction medium*) yaitu MS dengan penambahan 12 mg/l picloram. Pengamatan dilakukan hingga terbentuk kalus. Apabila telah terbentuk kalus fase globular atau torpedo maksimal selama 8 minggu, kalus disubkultur pada media GD (Gresshoof and Doy) dengan penambahan picloram 12 mg/l. Kalus pada media GD disubkultur setiap 2 minggu hingga muncul kalus embriogenik (FEC). Tahapan tersebut dilakukan pada LAFC.

3.4.4 Kultur Suspensi

Kalus embriogenik yang *friable* dengan karakteristik kuning pucat, bertekstur remah, terdiri atas sejumlah unit sel embriogenik kemudian dikulturkan pada 30 ml media cair GD tanpa agar dengan penambahan perlakuan P1 yaitu picloram 12 mg/l, picloram 20 mg/l yaitu P2 dan 2,4-D 12 mg/l yaitu P3 pada erlenmeyer atau foil viar. Kultur suspensi diletakkan pada kondisi penyinaran, diletakkan pada *rotary shaker* selama 24 jam. Media kultur suspensi diperbaharui setiap 7 hari sekali dengan menggunakan pipet steril.

3.4.5 Regenerasi Kalus

Regenerasi dilakukan pada masing-masing tahapan media yaitu media yang pertama adalah media induksi FEC dan tahapan yang kedua adalah media suspensi. Media regenerasi yang digunakan terdapat tiga tahapan, media tahap pertama yaitu MS dengan penambahan NAA 1 mg/l selama 2 – 3 minggu hingga menunjukkan *green spot* kemudian dikulturkan pada media MS dengan penambahan 0,1 mg/l BAP untuk induksi tunas, setelah tunas muncul kemudian untuk pemanjangan tunas disubkultur pada MS dengan penambahan 0,4 mg/L BAP hingga tumbuh tunas selama 4 – 8 minggu.

3.5 Variabel Pengamatan

3.5.1 Frekuensi FEC (%)

Frekuensi FEC merupakan persentase dari jumlah eksplan yang membentuk FEC. Menghitung jumlah eksplan yang membentuk FEC dibagi dengan jumlah seluruh eksplan pada minggu ke-12 di media GD (Roosin et al, 2011; Apio *et al*, 2015).

4.5.2 Skor Pembentukan FEC

Persentase FEC yang telah diperoleh kemudian dikelompokkan berdasarkan skor kemampuan membentuk kalus. Skor pembentukan FEC berada pada rentan – 75%. tidak terbentuk FEC = 0, persentase kalus $\leq 10\%$ = 1, persentase kalus 11 – 25% = 2, persentase 26 – 50% = 3, 51 – 75 % = 4, persentase lebih dari 75% = 5 (Rossin and Ray, 2011). Skor 0 menunjukkan tidak terbentuknya FEC, skor 2 menunjukkan kemampuan kultivar dalam menginduksi kalus FEC rendah, skor 3 menunjukkan kemampuan kultivar dalam menginduksi kalus sedang atau medium, skor 4 menunjukkan kemampuan kultivar dalam menginduksi kalus tinggi, menunjukkan kemampuan kultivar dalam menginduksi kalus sangat tinggi. Semakin tinggi skor maka semakin tinggi kemampuan kultivar untuk membentuk kalus FEC .

3.5.3 Volume Sel (ml)

Menurut (Mustafa, 2011) pengamatan respon pertumbuhan volume hasil suspensi sel embriogenik dilakukan dengan metode *cell volume after sedimentation* (CVS) dengan modifikasi menggunakan botol fiol viar. Kalus embriogenik hasil suspensi sel yang mengendap pada botol viar diamati setiap interval 7 hari sekali hingga hari ke 28 dengan mengukur pertambahan volume kalus.

3.5.4 Viabilitas Sel

Viabilitas sel diamati dengan melakukan pewarnaan menggunakan larutan *Triphan blue* di bawah mikroskop. Langkah pertama adalah menambahkan stock larutan EB sebanyak 0,025% ke dalam suspensi sel (1 ml). Larutan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Kemudian dilanjutkan dengan menghitung jumlah sel menggunakan haemocytometer. Sel yang dihitung adalah sel hidup yang ditandai

dengan tidak terwarnai oleh *triphan blue* (Baker & Mock, 1994; Riyadi & Tahardi, 2003). Pengamatan dilakukan pada hari ke-28 kultur suspensi). Nilai viabilitas sel dapat direpresentasikan dengan jumlah sel sebagai berikut :

$$\text{Viabilitas sel} = \frac{\Sigma \text{ sel viabel}}{\Sigma \text{ sel viabel} + \Sigma \text{ sel mati}}$$

3.5.5 Berat Segar Kalus

Metode dilakukan untuk mengevaluasi pertumbuhan sel pada kultur suspensi adalah mengukur berat segar kalus. Tahapan pertama yang dilakukan untuk mengetahui berat segar kalus yaitu menimbang berat kalus sebelum dimasukkan ke media suspensi (W0). Setelah minggu ke-4, kalus yang telah disaring dan ditimbang (W1). Nilai berat segar kalus dikalkulasi sebagai nilai growth index (GI). Berikut adalah formula perhitungan GI (Sahraroo et al, 2014) :

$$\text{GI} = (W1 - W0) / W0$$

W0 = berat awal sebelum pelakuan kultur suspensi

W1 = berat akhir setelah perlakuan kultur suspensi

GI = Growth Index

3.5.6 Histologi

Pengamatan histologi kalus hasil suspensi sel diamati menggunakan mikroskop stereo Leica EZ4 HD dan Optic Lab. Pengamatan anatomi kalus embriogenik dilakukan dengan metode histologi. Prosedur kerja histologi yaitu fiksasi jaringan menggunakan larutan formalin 0%, Aceticacid 5% dan alcohol (FAA) 5. Kemudian tahapan kedua adalah dehidrasi menggunakan alcohol konsentrasi bertahap mulai dari 70%, 80%, 95 dan 100%. Selanjutnya tahapan ketiga yaitu celaring menggunakan campuran alcohol : xilol dengan perbandingan bertahap yaitu 3:1, 1:1, 1:3. Tahapan yang keempat adalah infiltasi dengan merendam sampel dalam paraffin selama 24 jam. Tahapan ke lima adalah pemotongan mikrotom rotary setelah 8-12 mikron. Tahapan ke enam adalah perekatan pita paraffin pada deglass selanjutnya dilakukan pewarnaan menggunakan bahan kimia Safranin atau Fastgreen 1%. Setelah pewarnaan

dilakukan mounting menggunakan balsam Canada dan tahapan terakhir adalah pengamatan sampel di mikroskop.

3.5.7 Regenerasi Kalus

Respon awal kalus setelah dipindahkan ke media regenerasi adalah pembentukan spot hijau sebagai bentuk dari pengaruh hormone yang membentuk klorofil selanjutnya spot hijau akan tumbuh menjadi tunas (Dwimahyani, 2007). Regenerasi kalus baik pada media padat dan media cair diamati persentase tumbuhnya tunas atau pada umur 2 minggu setelah tanam (MST) sampai 8 MST.

3.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan analisa sidik ragam atau *analysis of variance* (ANOVA) dan apabila menunjukkan perbedaan yang nyata atau signifikan dilanjutkan dengan uji *Duncan Range Test* (DMRT) taraf 0,05.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Pengaruh Perlakuan Jenis Kultivar

Kultur suspensi membutuhkan eksplan berupa kalus embriogenik yang bersifat remah atau FEC sehingga dibutuhkan tahapan induksi kalus dari beberapa kultivar yang digunakan di dalam penelitian diantaranya Kaspro, Ketan dan Kuning. Dilakukan pengujian potensi keberhasilan induksi kalus sampai dengan regenerasi dari kultivar tersebut. Berdasarkan hasil ANOVA pada tabel 4.1 dapat diketahui terdapat hasil yang bervariasi dari masing-masing variabel pengamatan. Variabel pengamatan yang menunjukkan berbeda sangat nyata yaitu pada nilai skor FEC dan menunjukkan perbedaan yang nyata pada persentase terbentuknya FEC. Variabel pengamatan persentase kemunculan kalus, regenerasi tunas dan akar tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dari perlakuan kultivar sehingga tiap kultivar memiliki potensi yang sama untuk kemunculan kalus dan kemampuan regenerasi tunas dan akar. Berikut disajikan rangkuman hasil ANOVA dari perlakuan kultivar Kaspro, Ketan dan Kuning terhadap beberapa variabel pengamatan pada Tabel 4.1.

Tabel 4. 1 Rangkuman nilai F Hitung ANOVA pada persentase kemunculan kalus, terbentuknya FEC, regenerasi tunas, regenerasi akar, dan skor FEC

No	Variabel Pengamatan	Nilai F-Hitung Kultivar (V)
1	Persentase kemunculan kalus	0,29 ^{ns}
2	Persentase terbentuknya FEC	10,96*
3	Skor FEC dari tiap Kultivar	6,43**
4	Persentase regenerasi tunas	1,15 ^{ns}
5	Persentase regenerasi akar	1,15 ^{ns}

Keterangan : * = Berbeda nyata
 ** = Berbeda sangat nyata
 ns = Berbeda tidak nyata

Berdasarkan hasil uji DMRT 5% pada Tabel 4.2 menunjukkan bahwa Kultivar Kaspro memiliki persentase pembentukan kalus atau frekuensi FEC tertinggi yaitu 51,26% yang diikuti oleh perlakuan lainnya yaitu Kuning dengan persentase pembentukan kalus sebesar 43,58% serta rerata frekuensi FEC Kultivar Ketan yang membentuk kalus sebesar 10%. Kemudian variabel pengamatan nilai skor FEC menunjukkan Kultivar Kuning dan Kaspro memiliki nilai skor berurutan yaitu 4% dan 2% sedangkan skor FEC ketan memiliki nilai rata-rata terendah yaitu 0,17 yang berbeda dari dua varietas lainnya. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa kemampuan kalus membentuk FEC akan meningkatkan nilai skor kultivar dalam membentuk FEC. Berikut disajikan hasil Uji DMRT 5% pada tabel 4.2.

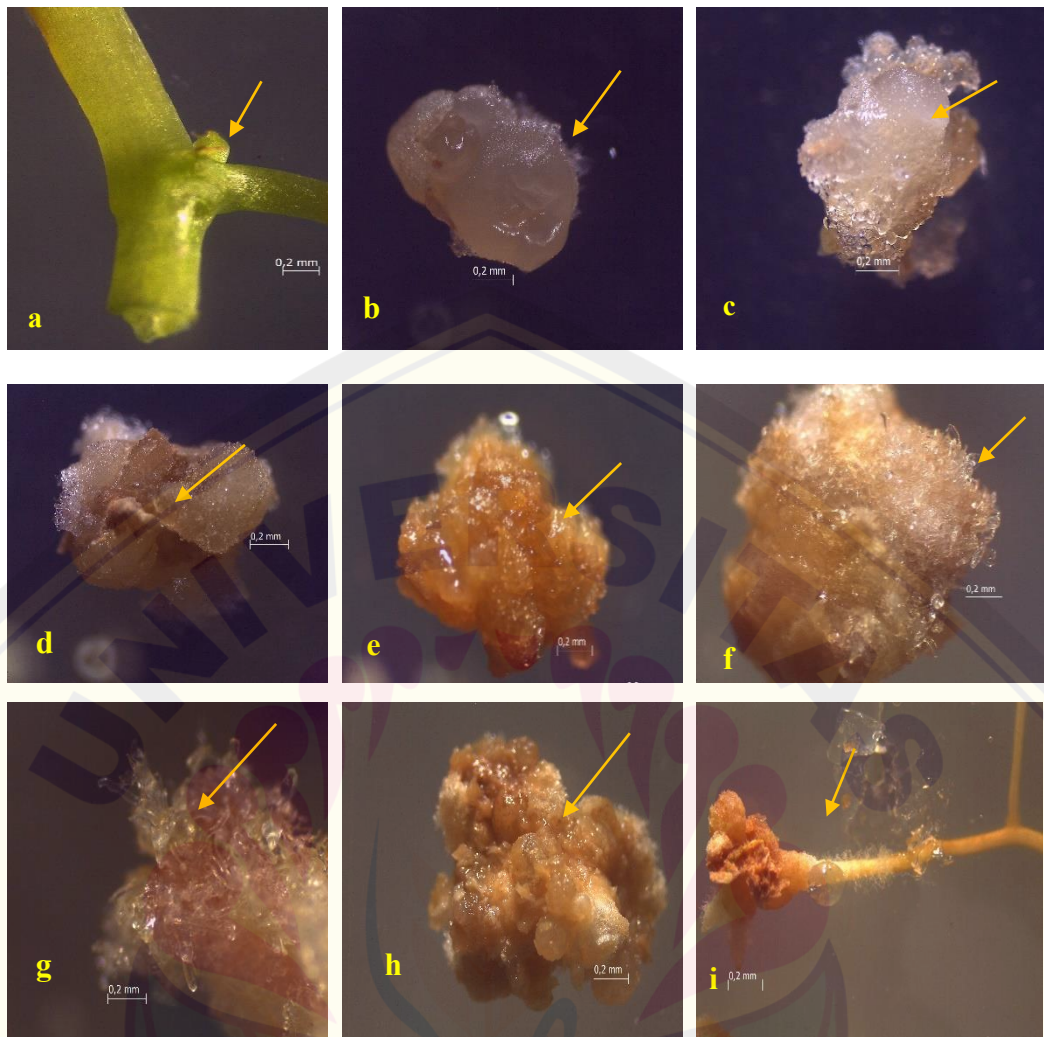
Tabel 4. 2 Pengaruh Jenis Kultivar terhadap kemampuan pembentukan dan skor FEC

Perlakuan	Frekuensi FEC (%)	Skor FEC
Ketan	7,87±9,34 ^a	0,17±0,4 ^a
Kuning	43,58±27 ^a	2±2,45 ^b
Kaspro	51,26±7,68 ^a	4±0,63 ^b

Keterangan : Angka yang diikuti huruf (notasi) yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) 5%

4.1.2 Tahapan Regenerasi FEC Kultivar Kuning dari Media Padat

Terdapat beberapa tahapan yang harus dilakukan untuk regenerasi kalus embrio somatik. Tahapan pertama yaitu induksi kalus dengan eksplan berupa auxiliary bud kemudian ditanam pada media CAM untuk perkembangan swollen (Gambar 4.1a) kemudian swollen diisolasi untuk induksi kalus yaitu ditanam pada media CIM (Gambar 4.1b). Kemudian kalus akan berkembang menjadi embrio melalui beberapa fase yaitu fase globular, *heart*, torpedo dan kotiledon akan berdiferensiasi menjadi tunas dan akar. Berdasarkan Gambar 4.1 menunjukkan kultivar kaspro memiliki potensi dapat beregenerasi ditandai dengan kemunculan akar pada media NAA 60 HST.

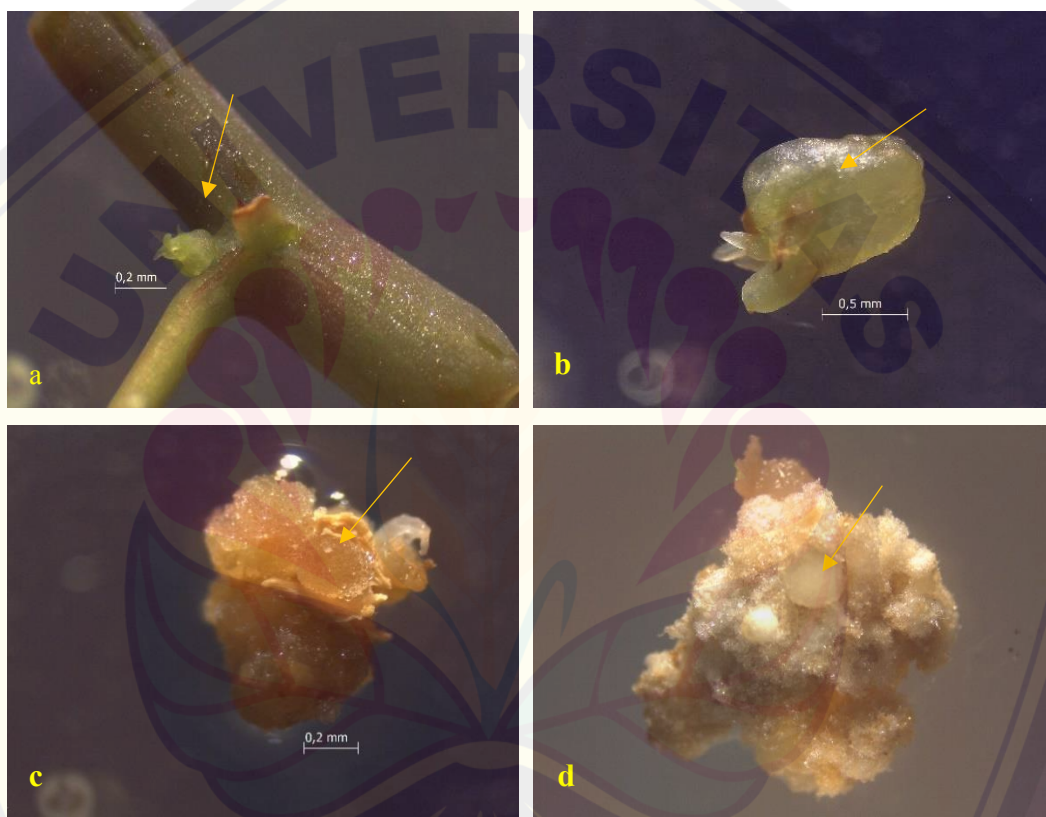


Gambar 4. 1 Tahapan regenerasi pada kultivar kaspro. Induksi Swollen dari AB pada media CAM (a), swollen 4 HST pada media CIM (b), pembentukan kalus pada media CIM (c), sub kultur kalus pada media CIM (d), induksi FEC pada media GD (e), sub-kultur FEC pada media GD (f), kalus fase torpedo pada media GD (g), kalus embriogenik pada media GD (h), regenerasi kalus embrio somatik pada media NAA (i).

Berdasarkan Gambar 4.1 menunjukkan bahwa *swollen* dapat diinduksi dari AB (Gambar 4.1 a), *swollen* diisolasi dan ditanam pada media CIM dan berkembang menjadi kalus (Gambar 4.1c), kalus yang diinduksi pada media CIM kemudian dipindahkan pada media GD untuk induksi kalus sekunder (4.1d). Berdasarkan Gambar 4.1e FEC dapat diinduksi pada media GD selanjutnya dapat berkembang ke fase torpedo (Gambar 4.1 f-g). Kemudian kalus embriogenik (Gambar 4.1h) pada medi GD dipindahkan pada media NAA 1 mg/l selanjutnya kalus kultivar

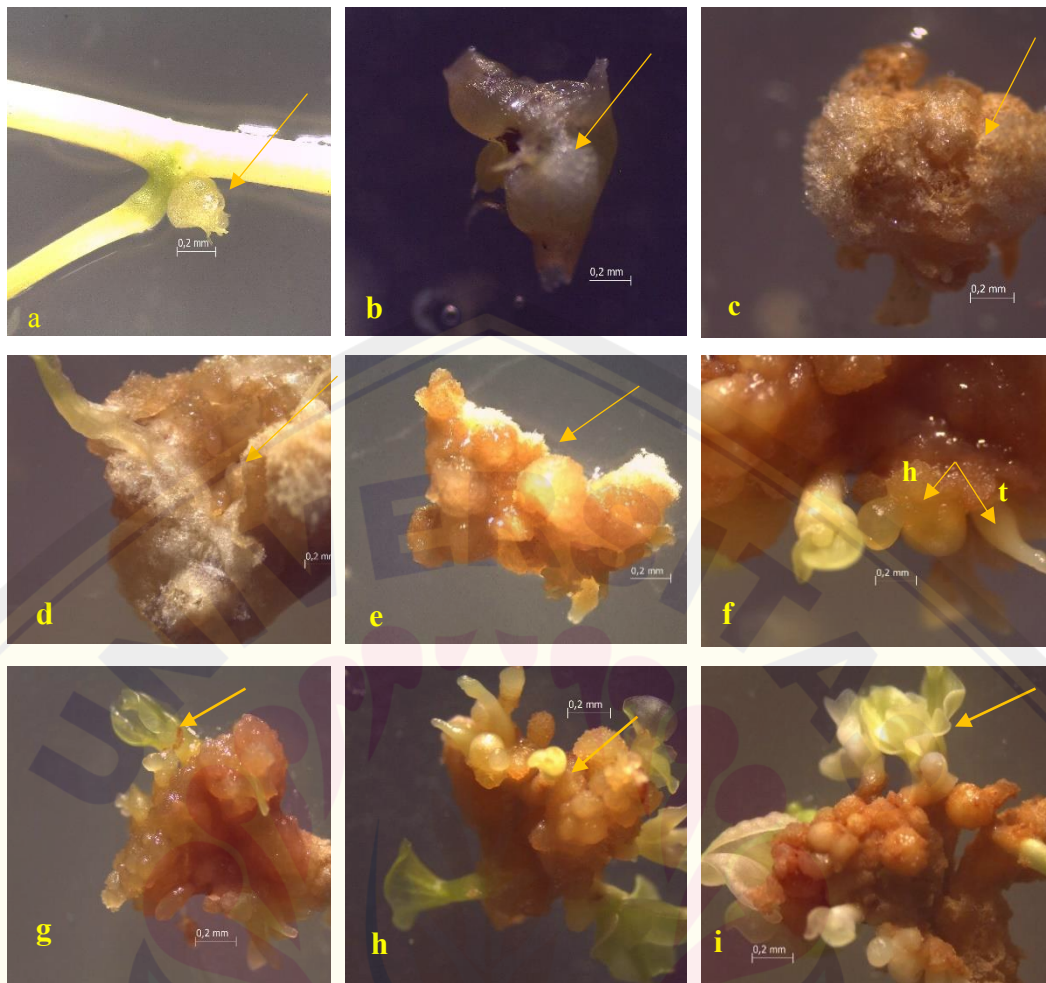
kaspro menunjukkan potensi regenerasi kalus ditandai dengan pertumbuhan akar pada kalus embriogenik (Gambar 4.1i).

Berdasarkan hasil uji regenerasi kultivar ketan dapat diketahui kemampuan regenerasi kultivar tersebut rendah sebab kalus yang diinduksi pada media GD tidak menunjukkan adanya pertumbuhan dan perkembangan kalus sekunder kemudian sub-kultur pada media NAA tidak menunjukkan respon akar atau tunas ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4. 2 Tahapan regenerasi pada kultivar ketan. Induksi swollen dari AB pada media CAM (a), swollen 4 HST pada media CIM (b), sub kultur kalus pada media CIM (c), kalus pada media GD membentuk globular (d).

Kultivar Kuning diketahui memiliki potensi untuk regenerasi melalui pembentukan calon tunas pada media NAA pada 20 HST. *Swollen* dapat tumbuh menjadi kalus (Gambar 4.3 c-d). Kemudian dipindahkan pada media GD sehingga muncul kalus primer dan terbentuk fase globular (Gambar 4.3 e). Kemudian kalus disubkultur pada media GD dan membentuk fase heart dan torpedo (Gambar 4.3 f).



Gambar 4. 3 Tahapan regenerasi FEC pada kultivar kuning. Induksi Swollen dari AB pada media CAM (a), swollen 4 HST pada media CIM (b), pembentukan kalus pada media CIM (c), sub kultur kalus pada media CIM (d), induksi FEC pada media GD kemudian membentuk fase GD pada 28 HST (e), sub-kultur FEC pada media GD memasuki fase torpedo dan *heart* (f), kalus embriogenik pada media NAA 20 HST (g), perkembangan kalus embriogenik menjadi tunas pada media BAP 0,1 mg/L (h), regenerasi kalus embrio somatik pada media BAP 0,4 mg/l (i).

4.1.3 Pengaruh Perlakuan Jenis Kultivar dan Auksin

Setelah diperoleh FEC dari kultivar Kaspro, Kuning dan Ketan yang akan digunakan untuk eksplan kultur suspensi kemudian kalus tersebut dikulturkan di media cair. Perlakuan dari jenis kultivar FEC dan jenis auksin digunakan dalam penelitian untuk mengetahui respon terbaik dalam menghasilkan kalus yang memiliki potensi viabilitas tinggi dan mampu beregenerasi optimal. Berdasarkan Tabel 4.3 menunjukkan bahwa kultivar dan jenis auksin tidak berpengaruh nyata terhadap penambahan volume kultur suspensi dan viabilitas sel. Pengaruh kultivar secara tunggal tidak berpengaruh nyata pada indeks pertumbuhan kalus tetapi jenis ZPT memberikan pengaruh sangat nyata pada indeks pertumbuhan sedangkan diketahui terdapat interaksi yang berbeda nyata pada kultivar dan ZPT. Tabel rangkuman hasil ANOVA disajikan pada Tabel 4.3 sebagai berikut.

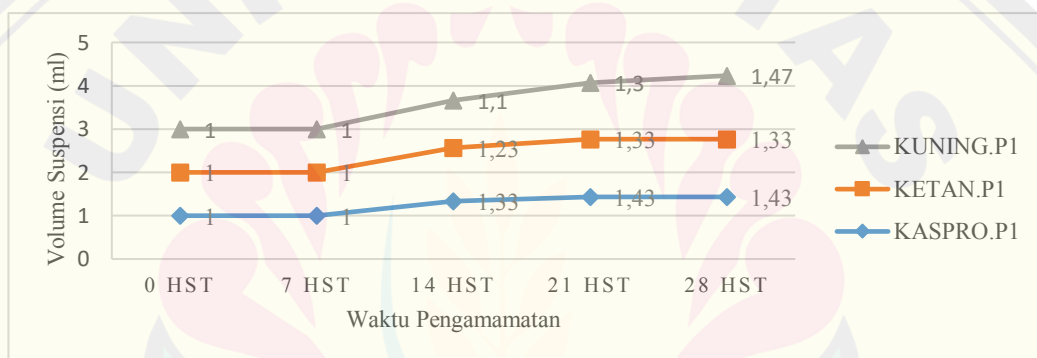
Tabel 4. 3 Rangkuman Hasil ANOVA Kombinasi Perlakuan Kultivar (V) dan Auksin (P) terhadap Index Pertumbuhan Kultur Suspensi

Variabel Pengamatan	Nilai F-Hitung		
	Kultivar (V)	Auksin (P)	Interaksi
Volume suspensi 7 HST	0,16 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,1 ^{ns}
Volume suspensi 14 HST	0,15 ^{ns}	0,53 ^{ns}	0,1 ^{ns}
Volume suspensi 21 HST	0,09 ^{ns}	0,8 ^{ns}	0,05 ^{ns}
Volume suspensi 28 HST	0,16 ^{ns}	1,02 ^{ns}	0,03 ^{ns}
Indeks pertumbuhan	0,07 ^{ns}	3,75**	6,36*
Viabilitas sel	0,02 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,02 ^{ns}

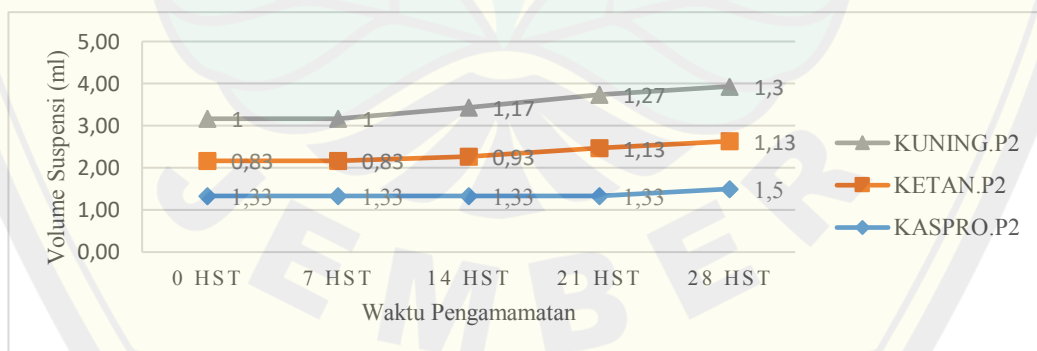
Keterangan : * = Berbeda nyata
 ** = Berbeda sangat nyata
 ns = Berbeda tidak nyata

Volume suspensi diamati setiap interval 7 hari sekali sampai 28 HST. Volume yang diamati adalah volume endapan dari kalus. Berdasarkan Gambar 4.3 dapat diketahui bahwa volume akhir tertinggi terdapat pada perlakuan V1P2 dengan rerata volume secara berurutan mulai dari 1,33 ml pada 7 HST sampai 21 HST dan mengalami kenaikan volume menjadi 1,5 ml pada 28 HST. Kemudian volume terendah pada hari terakhir pengamatan perlakuan V2P3 menunjukkan nilai rata-rata volume terendah yaitu 0,6 ml. V1P2 menunjukkan kenaikan volume pada hari ke 28 HST sedangkan perlakuan V3P1, V1P1, V2P1, V3P2, V2P2 dan V2P3

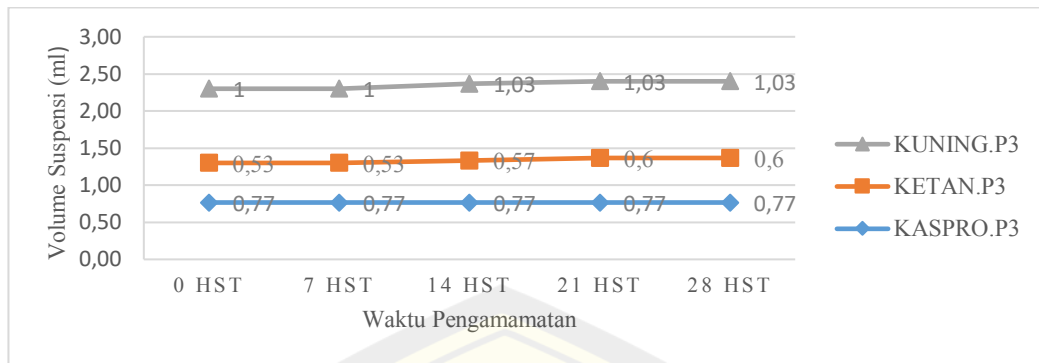
menunjukkan kenaikan volume pada 14 HST. Kemudian tidak terjadi kenaikan volume pada V1P3. Berdasarkan gambar 4.4 diketahui bahwa perlakuan P1 dapat meningkatkan volume kalus pada 14 HST, 21 HST pada kultivar kuning sedangkan pada kenaikan volume hanya terjadi pada 14 HST dan 21 HST pada kultivar ketan dan kaspro. Perlakuan P2 yang dikombinasikan dengan kultivar menunjukkan bahwa kenaikan volume terjadi pada 14 HST dan 21 HST pada kultivar Kuning dan ketan sedangkan pada kultivar kaspro P2 menunjukkan kenaikan volume pada 28 HST, hal tersebut ditunjukkan pada Gambar 4.5. Kemudian perlakuan P3 yang dikombinasikan dengan kultivar pada Gambar 4.6 hasil bahwa kenaikan volume terjadi pada kultivar Kuning dan Ketan pada 14 HST sedangkan kultivar Kaspro tidak mengalami kenaikan volume selama kultur suspensi.



Gambar 4. 4 Kenaikan volume kalus pada kultur suspensi perlakuan P1 dari setiap kultivar



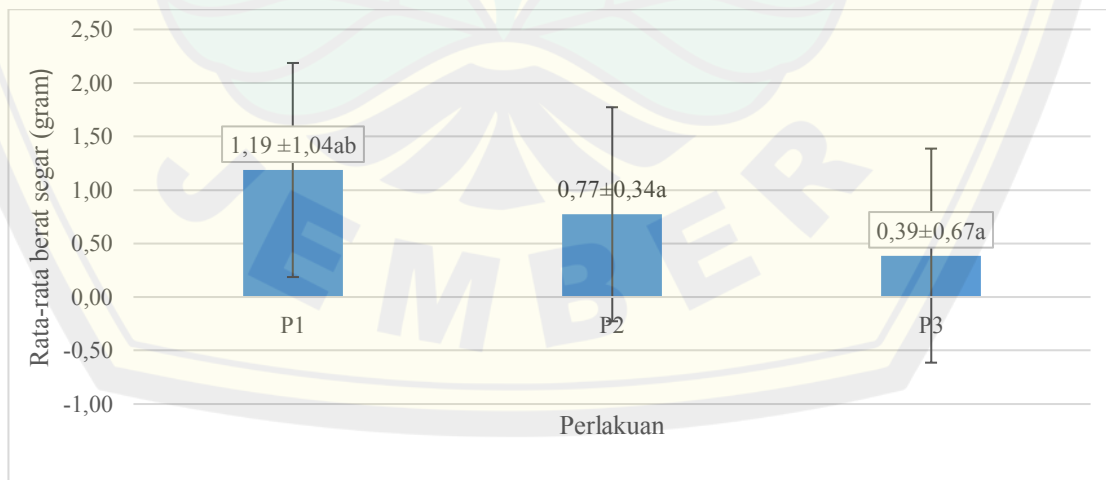
Gambar 4. 5 Kenaikan volume kalus pada kultur suspensi perlakuan P2 dari setiap kultivar



Gambar 4. 6 Kenaikan volume kalus pada kultur suspensi perlakuan P3 dari setiap kultivar

4.1.5 Berat Segar Kalus

Peningkatan berat segar kalus dikalkulasikan menjadi nilai *growth index* diperoleh melalui peningkatan berat basah kalus. Kalus yang remah ditimbang sebanyak 0,25 gram sebagai W0 (berat awal kalus) kemudian dikulturkan di media perlakuan suspensi. Setelah 28 HST di media suspensi, berat basah kalus ditimbang hingga didapatkan W1 (berat basah kalus di akhir pengamatan). Kemudian dihitung selisih antara berat akhir dan berat awal serta dibagi berat awal sehingga didapatkan nilai *growth index*. Diketahui terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan jenis auksin serta dihasilkan bahwa perlakuan P1 menunjukkan rata-rata perlakuan tertinggi dibanding P2 dan P3 tetapi tidak terdapat perbedaan antar perlakuan berdasarkan uji lanjut DMRT 5% pada Gambar 4.7.



Gambar 4. 7 Pengaruh Jenis Auksin terhadap Berat Segar kalus

Keterangan : Angka yang diikuti huruf (notasi) yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) 5%

Tabel 4. 4 Pengaruh Interaksi Pengaruh Kultivar dan Jenis Auksin terhadap Berat Segar

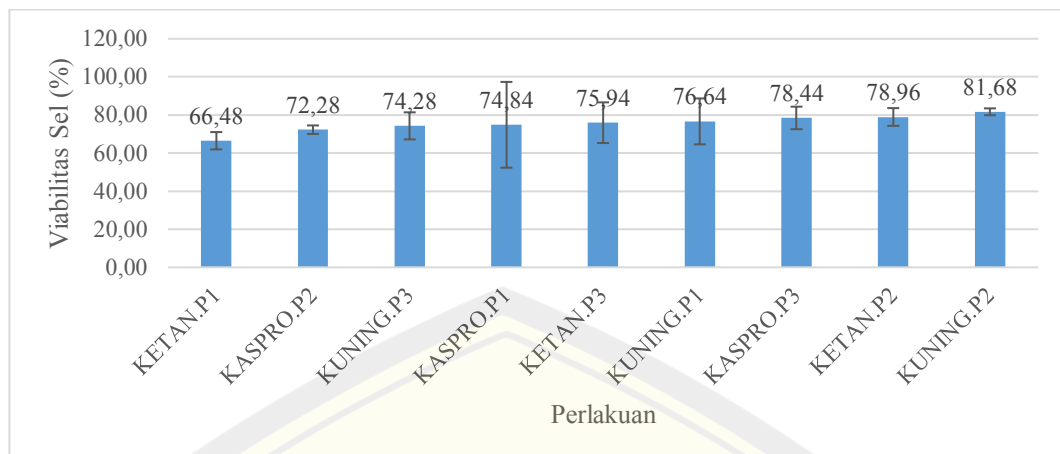
Perlakuan	Growth Index (gram)
Kaspro.P3	0±0a
Ketan.P3	0±0a
Kuning.P1	0±0a
Kaspro.P2	0,19±0,02ab
Ketan.P2	0,2±3,40abc
Kuning.P3	0,39±0,02bcd
Kuning.P2	0,39±0,08bcd
Kaspro.P1	0,55±0,09cd
Ketan.P1	0,64±0,07d

Keterangan : Angka yang diikuti huruf (notasi) yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) 5%

Berdasarkan hasil uji lanjut DMRT 5% diketahui bahwa nilai rerata tertinggi dari growth index adalah perlakuan V2P1 dengan nilai 0,64 gram tetapi tidak berbeda dari perlakuan lainnya, kemudian nilai rerata rendah terapat pada perlakuan P1P3, P2P3, P3P1. Nilai terendah tersebut menunjukkan tidak terjadinya peningkatan *growth index*. Berikut disajikan grafik growth index pada Tabel 4.4.

4.1.6 Viabilitas Sel

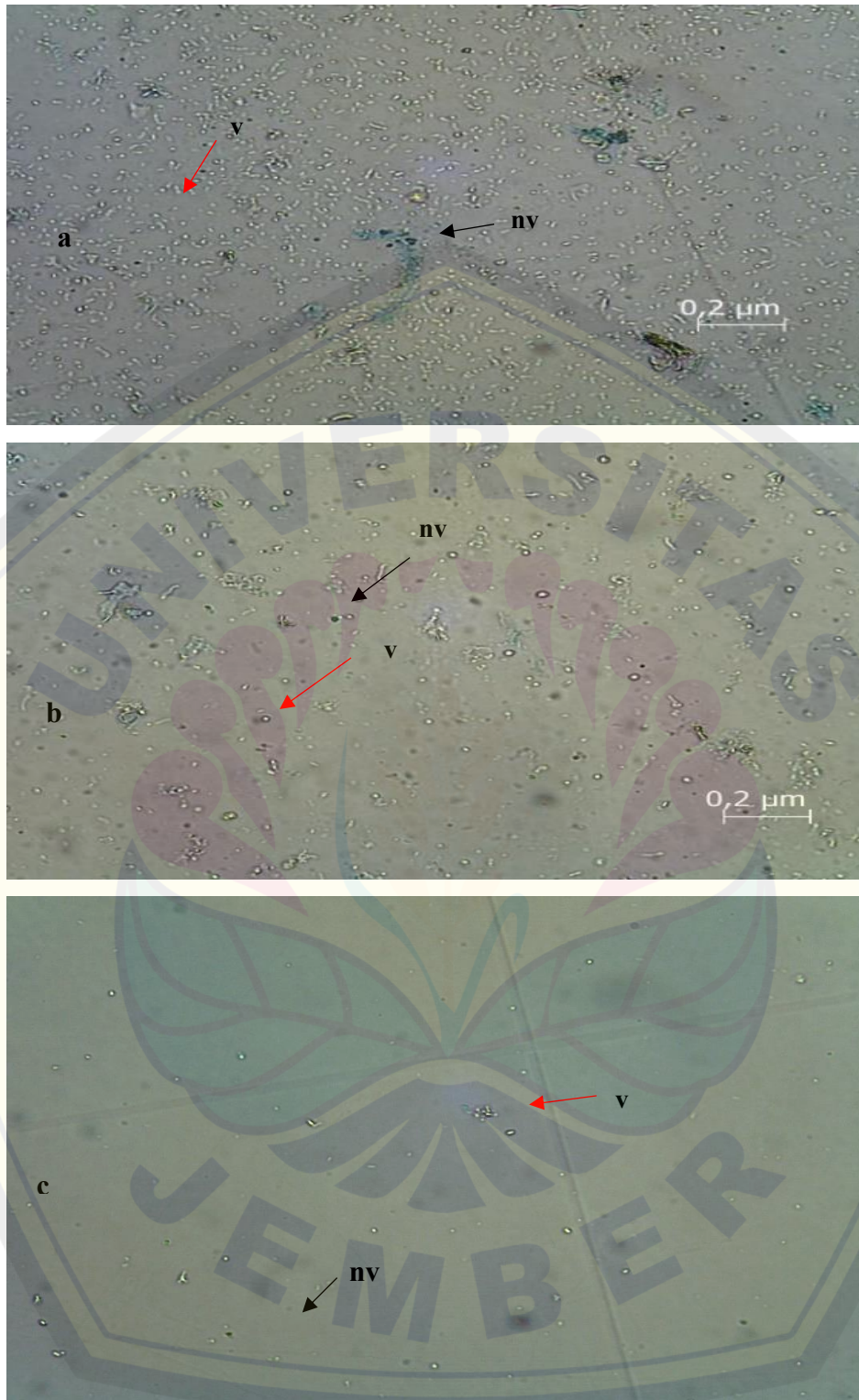
Rerata persentase sel viabel tertinggi terdapat pada perlakuan Kuning.P2 sebesar 81,68% kemudian nilai rerata terendah terdapat pada perlakuan Ketan.P1 66,48%. Semakin tinggi nilai sel yang viabel maka semakin tinggi kemungkinan sel embriogenik yang terdapat pada sampel kalus tersebut. Berikut disajikan grafik nilai persentase viabilitas sel pada kultur suspensi pada Gambar 4.8.



Gambar 4. 8 Pengaruh perlakuan kultivar dan zat pengatur tumbuh terhadap viabilitas sel kultur suspensi.

Viabilitas sel dapat menjadi variabel yang digunakan untuk mengetahui kalus yang dikulturkan masih bisa melakukan proliferasi sebab tersusun atas sel-sel yang viabel. Viabilitas sel diamati di akhir pengamatan dengan mengambil suspensi dari kalus kemudian dihitung sel yang viabel atau sel yang hidup menggunakan alat haemocytometer kemudian diamati di mikroskop. Sel yang viabel ditandai dengan sel yang terlihat seperti gelembung kemudian tidak terwarnai dengan *tryphan blue* sedangkan sel non viabel berwarna biru sebab terwarnai *tryphan blue*.

Berdasarkan gambar 4.9 dapat diketahui bahwa terdapat sekumpulan sel yang diamati menggunakan haemocytometer pada mikroskop sehingga menunjukkan bahwa pada perlakuan Kaspro dikombinasikan dengan perlakuan P1, P2 dan P3 menunjukkan terdapat sel yang terwarnai oleh *tryphan blue* sebagai sel non viabel sedangkan sel yang tidak terwarnai merupakan sel viabel. Ditambah dengan Gambar 4.10 yang menunjukkan hasil pengamatan haemocytomer perlakuan Ketan dikombinasikan dengan P1, P2 dan P3 serta Gambar 4.11 merupakan hasil pengamatan perlakuan kultivar Kuning dikombinasikan dengan jenis auksin P1, P2 dan P3. Berikut disajikan visualisasi hasil pengamatan viabilitas sel pada perlakuan kultur suspensi pada Gambar 4.9, Gambar 4.10 dan Gambar 4.11.



Gambar 4. 9 Uji viabilitas pada kultur suspensi dengan haemocytometer sel nv = sel non viabel, sel v = sel viabel. Kaspro.P1 (a), Kaspro.P2 (b), Kaspro.P3 (c)



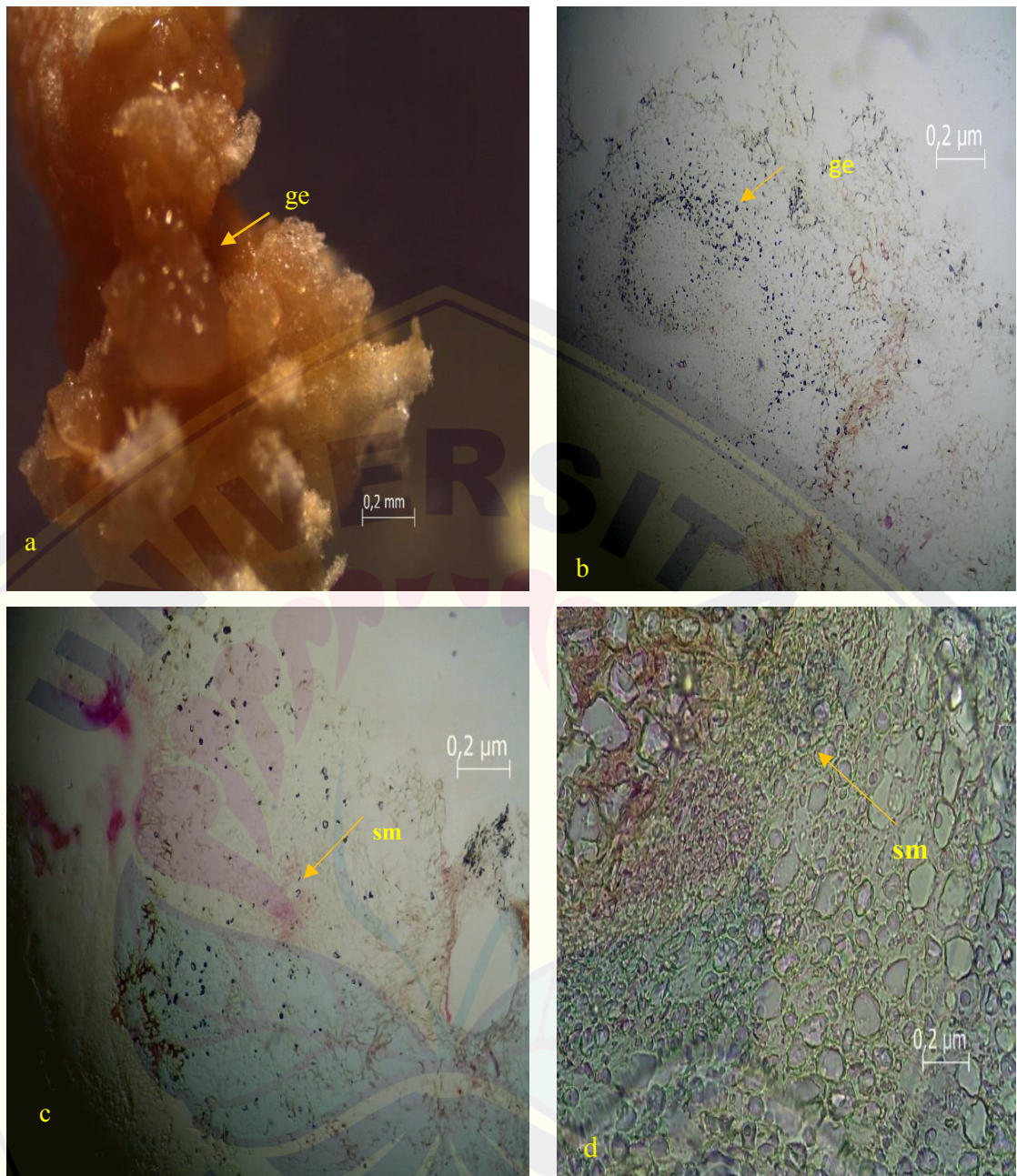
Gambar 4. 10 Uji vibilitas pada kultur suspensi dengan haemocytometer sel nv = sel non viabel, sel v = sel viabel. Ketan.P1 (a), Ketan.P2 (b), Ketan.P3 (c)



Gambar 4. 11 Uji viabilitas pada kultur suspensi dengan haemocytometer sel nv = sel non viabel, sel v = sel viabel. Kuning.P1 (a), Kuning.P2 (b), Kuning.P3 (c)

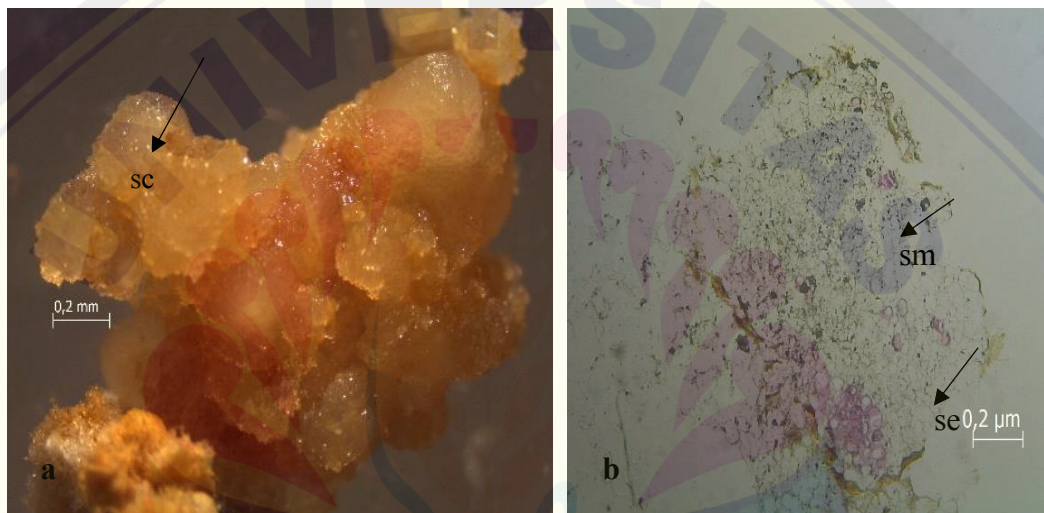
4.1.7 Histologi Kalus

Histologi jaringan kalus diamati untuk mengetahui bentuk morfologi kalus di beberapa fase kalus yang berasal dari Kultivar Kaspro mulai dari media CIM, GD, perlakuan suspensi dan media regenerasi. Kalus yang dikulturkan pada media CIM merupakan hasil pertumbuhan kalus dari swollen. Inisiasi tahap awal kalus akan membentuk kalus yang bergerombol. Tahap induksi kalus akan menghasilkan beragam jenis kalus baik kompak maupun remah sehingga butuh dilakukan pemilihan kalus. Pada media CIM, fase globular mungkin terjadi seperti ditunjukkan pada Gambar 4.12 dapat diketahui bahwa pada media CIM dapat membentuk kalus fase globular pada Gambar 4.12a dan 4.12b dengan hasil histologi jaringan yang membentuk bulatan, kemudian terlihat pada analisis histologi jaringan dapat diketahui kalus pada media CIM bersifat meristematik ditandai dengan ruang antar sel yang rapat sehingga bagian jaringan meristematik terlihat lebih gelap. Setelah dilakukan perbesaran 400x dapat dilihat bahwa terlihat inti sel yang rapat mengindikasikan bahwa terdapat sel meristematik (Gambar 4.12.d). Berikut disajikan hasil analisis histologi kalus media CIM pada Gambar 4.12.



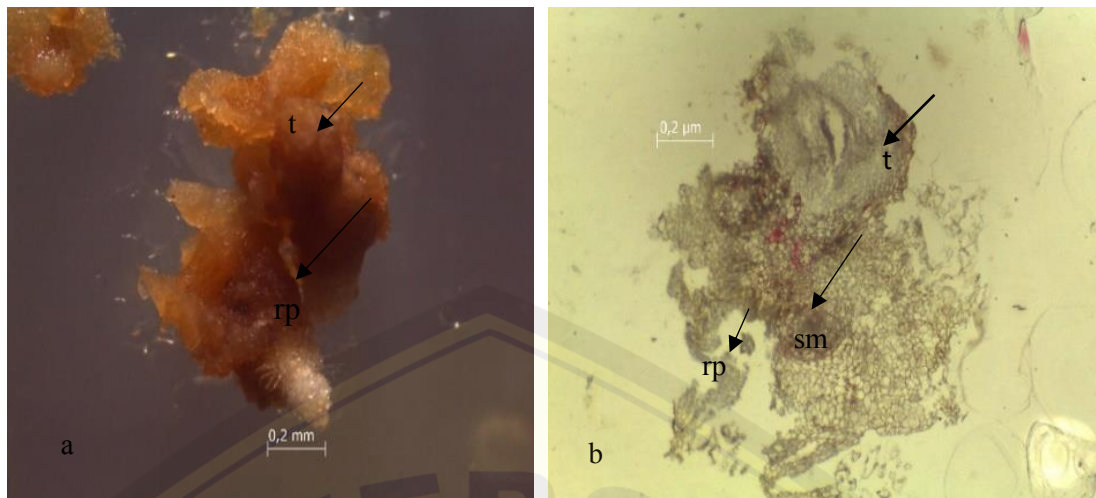
Gambar 4. 12 Histologi kalus inisiasi tahap awal pada kultivar kaspri pada media CIM ge = globular sm = sel meristematik

Setelah kalus telah terbentuk pada media CIM kemudian dipindahkan ke media GD untuk induksi kalus embriogenik yang remah. Kalus FEC ditandai dengan struktur yang remah, berwarna pucat dan berbentuk kalus sekunder yaitu kalus yang tumbuh setelah induksi kalus primer. FEC terdiri atas jaringan embriogenik yang juga bersifat meristematik. FEC berada di bagian tepi kalus seperti ditunjukkan pada Gambar 4.13b. Kalus yang berada pada GD pada hasil histologi kalus menunjukkan adanya pola sel meristematik dengan pola inti sel yang rapat dan berwarna lebih gelap. Berikut ditunjukkan hasil analisis histologi kalus media GD pada Gambar 4.13.



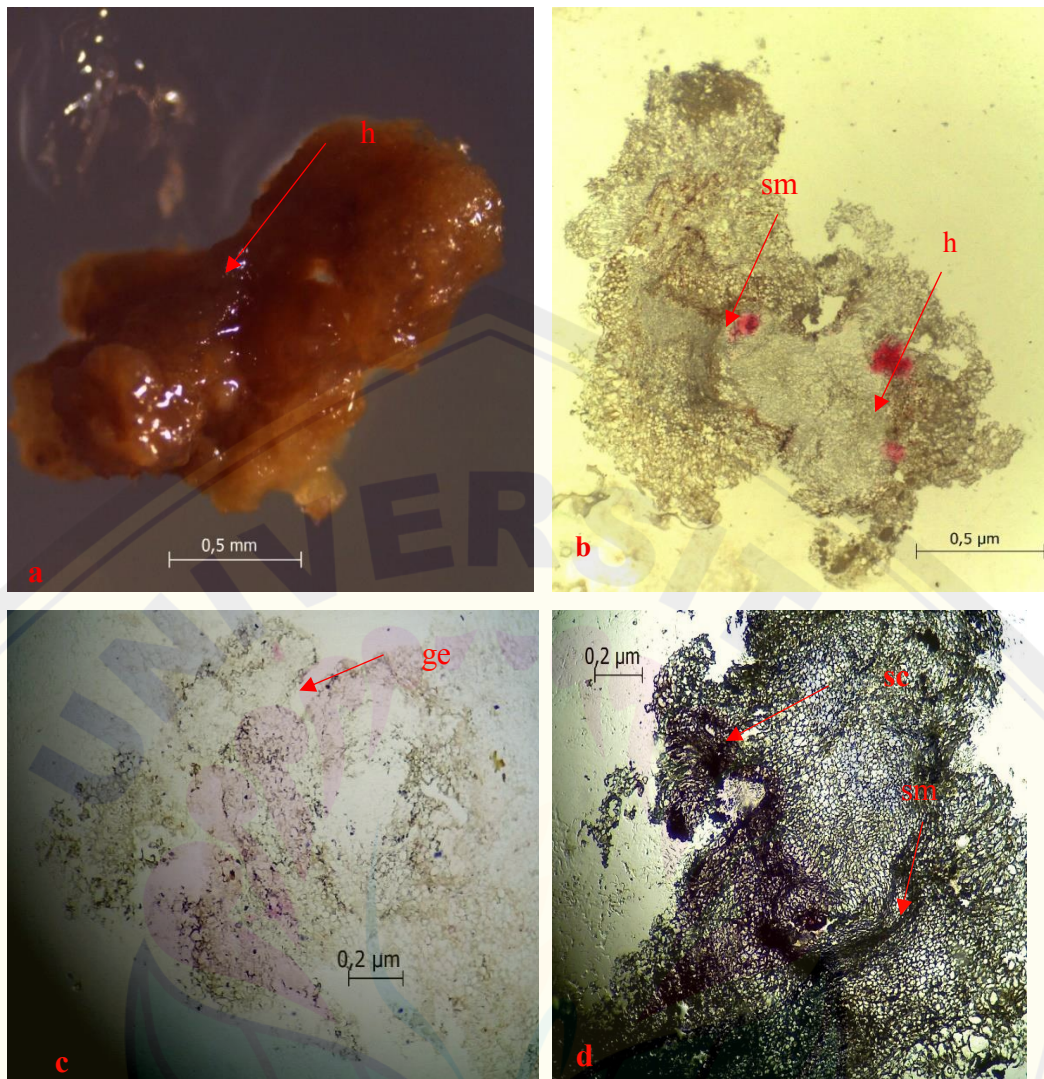
Gambar 4. 13 Histologi FEC kultivar kaspro pada media GD sc = secondary callus sm = sel meristem se = sel embriogenik

Eksplan kalus embriogenik yang dibutuhkan untuk kultur suspensi diuji kemampuan regenerasinya sehingga harus dipindahkan pada media regenerasi kalus ubi kayu yaitu NAA 1 mg/L. Kalus pada media regenerasi menunjukkan pola kalus fase torpedo dan menunjukkan mulai munculnya root primordia sebagai calon akar (Gambar 4.14a-b).



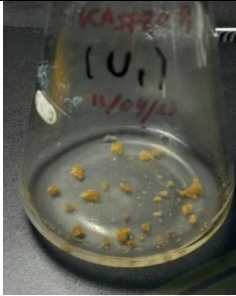
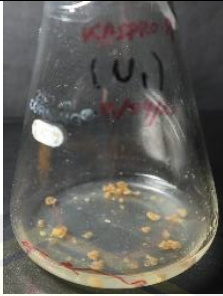
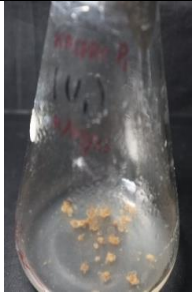
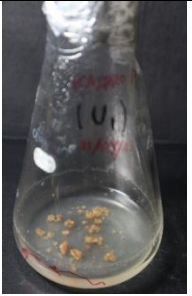

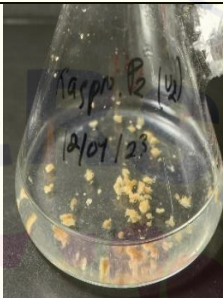

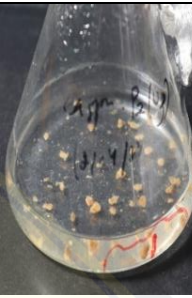
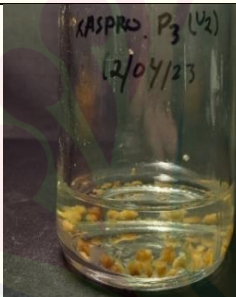
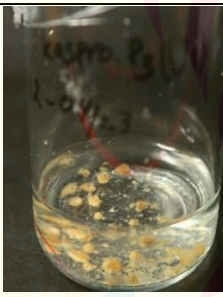
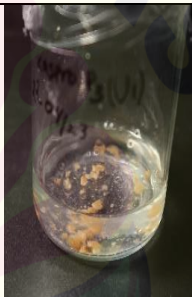
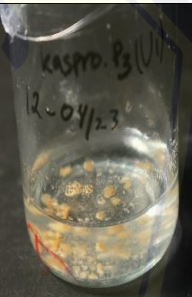
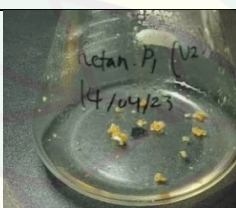
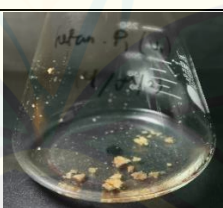
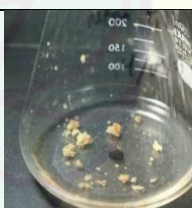


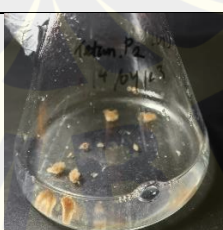
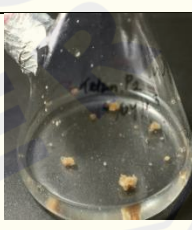

Gambar 4. 14 Histologi kalus pada kultivar kaspro pada media NAA t = torpedo rp = *root primorida* se = sel embriogenik sm = sel meristem

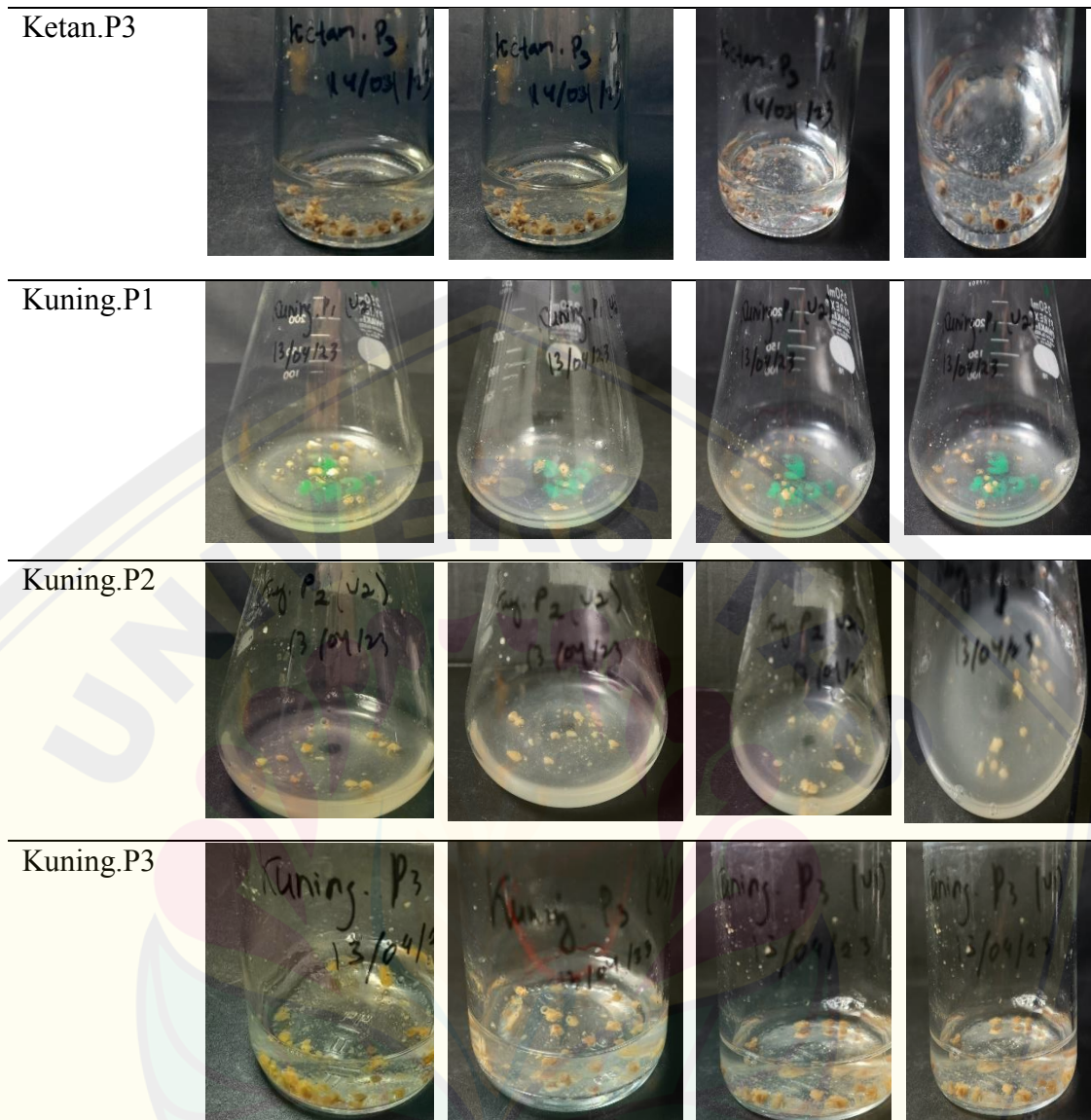
Kalus embriogenik remah atau FEC dari setiap kultivar sebagai eksplan kultur suspensi dipindahkan ke media perlakuan yaitu P1, P2 dan P3. Melalui variable pengamatan volume suspensi berat basah kalus dan viabilitas sel hasil kultur suspensi diketahui media P1 menunjukkan data pertumbuhan tertinggi maka sampel yang diambil untuk uji histologi adalah P1. Berdasarkan hasil analisis histologi pada Gambar 4.15a-d diketahui bahwa kalus hasil suspensi menunjukkan adanya sel meristematik dan satu sampel kalus memasuki fase globular dan *heart*. Kalus primer memasuki fase *heart* dan kalus sekunder memasuki fase globular.



Gambar 4. 15 Histologi kalus kultivar kaspro pada media P1 h = heart sm = sel meristematic ge = globular

Hasil observasi visual kultur suspensi pada Gambar 4.16 menunjukkan kalus tidak mengalami browning pada media suspensi sehingga media kalus bisa digunakan untuk meningkatkan jumlah kalus embriogenik melalui proses penggojokan dari shaker. Berikut disajikan gambar hasil observasi visual setiap pengamatan mulai dari 7 HST – 28 HST pada Gambar 4.15.

Perlakuan	7 HST	14 HST	21 HST	28 HST
Kaspro.P1				
Kaspro.P2				
Kaspro.P3				
Ketan.P1				
Ketan.P2				



Gambar 4. 16 Hasil Pengamatan Kultur Suspensi pada 7 HST, 14 HST, 21 HST dan 28 HST

4.2 Pembahasan

Tanaman ubi kayu memiliki potensi untuk dikembangkan dengan memperbaiki sifat genetik dari tanaman baik nilai gizi atau ketahan terhadap cekaman biotik dan abiotik. Kesulitan pengembangan kultivar tanaman ubi kayu adalah mengembangkan tanaman melalui fase generatif karena kesulitan dalam pembungaan sehingga dibutuhkan pendekatan dengan kultur jaringan. Perbanyak tanaman dengan kultur jaringan dengan tujuan perakitan varietas tanaman

membutuhkan eksplan berupa kalus embriogenik. Kalus embriogenik ditandai dengan karakteristik fisik, tingkat proliferasi dan kemampuan regenerasi.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, terdapat beberapa variabel pengamatan yang dipengaruhi oleh jenis kultivar yaitu kemampuan membentuk FEC dan skor FEC. Kalus yang diinisiasi dari swollen mampu menghasilkan kalus dari semua kultivar sehingga data yang diperoleh tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, tetapi kemampuan kalus dalam membentuk FEC memiliki perbedaan yang nyata yaitu melalui hasil uji ANOVA taraf 5%. Hal tersebut didukung oleh penelitian yang menjelaskan bahwa kemampuan kalus untuk membentuk kalus embriogenik tergantung pada jenis kultivar terhadap kondisi lingkungan in-vitro yang diberikan (Slameto, 2023).

Kultivar yang diinduksi kalusnya pada media CIM kemudian disub-kultur pada media GD untuk induksi kalus sekunder menunjukkan hasil tertinggi yaitu Kaspro juga mengindikasikan bahwa semakin tinggi kemampuan kalus membentuk FEC maka nilai dari skor FEC meningkat. Hal tersebut sebab menunjukkan bahwa ZPT picloram mampu menginduksi kalus sebab telah terjadi sinergi antara genotype dan kerja picloram. Hal tersebut telah dijelaskan sebelumnya bahwa frekuensi pembentukan kalus somatik embryogenesis dan peningkatan volume dari eksplan mengindikasikan terjadi efek antara interaksi genotype dan auksin (Feitosa et al. 2007; Rossin and Rey 2011; Saelim et al. 2006.) Kalus Kultivar Kaspro diketahui dapat menginisiasi regenerasi akar dan Kuning menginisiasi pertumbuhan tunas, tetapi pertumbuhan tersebut membutuhkan periode yang lama yaitu 8 MST dengan sub kultur setiap 2 MST. Kemampuan kultivar ketan untuk membentuk FEC rendah sehingga skor pembentukan FEC dikategorikan skor rendah atau kultivar rekalsitran. Berdasarkan penelitian Mongomake et al (2015) diketahui bahwa beberapa kultivar kalus rekalsitran mengalami kegagalan mensinkronkan interaksi antara genotype dan fitohormon meskipun kultivar rekalsitran mampu membentuk struktur kalus proembriogenik atau globular, fase kalus tersebut sulit untuk berkembang menjadi fase torpedo atau embrio (Raemakers, 1997).

Kalus embriogenik yang bertekstur remah setelah diuji kemampuannya dalam membentuk kalus dan daya regenerasinya kemudian dikulturkan pada media suspensi. Media suspensi dibutuhkan untuk proliferasi kalus embriogenik. Eksplan dari kultur suspensi membutuhkan kalus embriogenik yang diperoleh dari kultur kalus pada media padat yaitu media GD. Beberapa hal yang mempengaruhi kultur suspensi adalah eksplan berupa FEC yang sangat tergantung pada sifat genotipe dan komposisi media beserta ZPT. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Karyanti (2021) bahwa peningkatan berat segar kalus kultur suspensi sawit menunjukkan perbedaan yang nyata dari perlakuan beberapa klon sawit, Klon-2 menunjukkan berat segar kalus tertinggi 1,039 g dibandingkan klon lainnya. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, kultivar ubi kayu tidak memberikan pengaruh yang nyata pada semua variabel pengamatan. Hal tersebut dapat disebabkan oleh kalus yang digunakan pada media suspensi merupakan kalus yang sudah diseleksi yaitu merupakan FEC dari media padat yang memiliki tingkat proliferasi tinggi sehingga pengaruh kultivar tidak muncul pada kultur suspensi. Menurut Karyanti (2021) kemampuan proliferasi kalus kemungkinan dipengaruhi oleh kualitas kalus yang diinduksi dan hormon endogen yang terdapat pada inisiasi awal kalus.

Pertumbuhan kultur suspensi dapat dilihat dari volume kalus di dalam kultur suspensi yang meningkat. Menurut Mustafa et al (2011) metode *cell volume after sedimentation* dapat digunakan sebagai indikator pertumbuhan pada media suspensi. Terdapat tiga fase berbeda pada kultur suspensi yaitu fase lag, eksponensial dan stationary (Ramulifho, 2019). Berdasarkan Gambar 4.4 dapat diketahui bahwa fase lag pada kultur suspensi yaitu pada 7 hari setelah tanam merupakan fase awal dari pertumbuhan kalus sehingga belum terdapat kenaikan volume. Kemudian pada pengamatan hari ke 14 dan 21 kultur suspensi mengalami kenaikan volume sehingga fase tersebut merupakan fase eksponensial. Kemudian pada pengamatan hari ke 28, volume kalus tidak mengalami kenaikan kecuali pada perlakuan V3P1 dan V3P2 tetapi kenaikan volume tersebut tidak signifikan berdasarkan uji ANOVA sehingga dapat diketahui bahwa kultur suspensi FEC ubi kayu berada pada fase stationary di 28 HST. Setiap tanaman memiliki fase yang

berbeda dalam kemampuan proliferasi dan daya hidup di media suspensi sehingga idealnya sebelum memasuki fase stationary, bisa langsung dipindahkan ke media regenerasi. Hal tersebut sesuai dengan protokol transformasi tanaman ubi kayu yang menggunakan eskplan FEC bahwa FEC harus dipindahkan ke media pematangan kalus pada 21 HST (Zhang and Gruisem, 2004). Umumnya beberapa kultur suspensi dapat bertahan pada 28 HST seperti pada tanaman *Angelica sinensis* diketahui bahwa kultur suspensi kalus tanaman tersebut memasuki masa stationary di 28 HST (Zhang et al, 2018). Ketidakmampuan kalus bertahan pada media cair bisa disebabkan oleh terjadi penurunan aktivitas metabolisme pada kultur suspensi sebab kalus yang terpapar pada media cair dalam periode waktu yang lama dapat mengakibatkan kekurangan oksigen sehingga menghambat pertumbuhan kalus (Kasi & Sumaryono, 2008).

Berat basah kalus yang ditinjau dari *growth index* menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara jenis kultivar dan jenis auksin. Berdasarkan Tabel 4.5 diketahui bahwa Picloram 12 mg/L dapat meningkatkan berat segar pada kultivar Kaspro dan ketan, kemudian picloram 20 mg/L dapat meningkatkan kultur suspensi pada semua jenis kultivar, sedangkan 2,4-D hanya mampu meningkatkan nilai *growth index* pada kultivar Kaspro. Peningkatan biomassa pada suspensi dapat dipengaruhi oleh pembelahan dan perkembangan sel ditinjau dari proliferasi kalus. Peningkatan proliferasi kalus embriogenik pada tanaman ubi kayu dapat dipicu oleh jenis auksin picloram 12 mg/l (Sofiari, 1998 ; Chetty. 2013 ; Lentz, 2018). Kemudian pada genotipe asal Brazil FEC disubkultur pada media picloram 20 mg/l (Lentz, 2018) kemudian menurut Riyadi (2016) pada kultur suspensi sagu media terbaik untuk meningkatkan proliferasi kalus adalah 2,4-D 15 mg/l. Jenis dan konsentrasi auksin menjadi penentu dalam meningkatkan proliferasi sel pada media suspensi (Tripathi, 2021). Penggunaan media suspensi dengan penambahan auksin akan meningkatkan kemungkinannya terbentuknya kalus embriogenik sebab penambahan auksin akan mempengaruhi perkembangan kalus menuju embryogenesis dan fase maturase untuk memungkinkan terjadinya regenerasi. Auksin berperan dengan dua cara yaitu menstimulasi tingkat keasaman pada dinding sel sehingga memungkinkan pemanjangan sel kemudian mampu

menginduksi transkripsi mRNA spesifik yang berpedan mengkode protein yang berhubungan dengan pertumbuhan sel (Stals and Inze', 2001; Richard et al., 2002). Apabila *growth index* stagan dapat dimungkinkan oleh terjadinya penurunan laju biomassa kalus dalam menginduksi fase perkembangan kalus selanjutnya (Riyadi, 2016). Selanjutnya penggunaan ZPT 2,4-D menunjukkan tidak terjadinya peningkatan *growth index* dapat disebabkan oleh penggunaan 2,4-D dengan konsentrasi terlalu tinggi dapat menurunkan perkembangan sel sebab terjadinya plasmolysis sel yang merupakan indikator berkurangnya kadar air pada sel (Tripathi, 2021).

Viabilitas sel diamati pda 28 HST atau di akhir pengamatan dengan menggunakan haemocytometer. Sel viabel dan non viabel ditandai dengan pewarnaan trypan blue. Apabila sel terwarnai maka diketahui sel tersebut non viabel dan apabila tidak terwarnai maka sel tersebut viabel. Menurut Strober (2015) sel yang hidup memiliki memberan sel yang utuh sehingga zat pewarna seperti tryphan blue tidak mampu menembus sel, sel supensi yang dicampur dengan zat pewarna tertentu kemudian divisualisasikan untuk menentukan sel yang menyerap atau tidak menyerap zat pewarna. Berdasarkan Gambar 4.6 diketahui bahwa sel viabel yang berhasil dideteksi berada di rentan 66, 48% - 81,68%. Semakin tinggi jumlah sel viabel maka semakin tinggi kemungkinan kalus yang bersifat embriogenik sehingga masih mampu berproliferasi dan beregenerasi. Hal tersebut didukung oleh penelitian Sumaryono dan Riyadi (2015) bahwa kultur suspensi Kina yang menunjukkan persentase viabilitas sel mencapai 81% sehingga dapat dimungkinkan sebagian sel masih tetap utuh dan tidak terjadi kerusakan sel akibat dari penggojokan di shaker. Penggojokan berperan dalam perbaikan pertumbuhan melalui peningkatan aerasi sebab salah satu kendala dari kultur suspensi adalah pertumbuhan pada kultur suspensi tidak optimal pada konsentrasi oksigen yang rendah (Hegarty, 1986).

Pengamatan histologi memungkinkan untuk mengetahui pembentukan struktur karakteristik dari proses embriogenik dan mengidentifikasi proses embriogenik serta mengidentifikasi kekurangan dari bentuk dari somatik embrio (Vidal, 2014). Pengamatan histologi kalus dilakukan untuk mengamati

morfogenesis kalus dari setiap media. Tahap induksi kalus yang pertama yaitu pada media CIM menunjukkan bahwa fase globular sudah muncul dan tersusun atas sel meristematik, kalus globular terbentuk pada 28 HST. FEC terdiri atas sel-sel meristematik dengan karakteristik ruang antar sel lebih rapat, mempunyai inti yang jelas, sitoplasma yang padat dan masih aktif membelah (Kasi dan Sumaryono, 2008).

Kemudian pada media GD ditandai dengan pertumbuhan kalus sekunder yang remah ditandai dengan pembentukan sel embriogenik di ujung kalus. Hal ini dapat diketahui bahwa media GD dapat menginduksi FEC fase globular. Hal ini sesuai dengan bahwa kalus yang diharapkan pada FEC adalah fase globular dan *heart* (Fitriani, 2016).

Setelah terbentuk FEC pada media GD dilakukan sub kultur pada media regenerasi. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui kemampuan kultivar beregenerasi sebelum dikulturkan pada media suspensi, kalus FEC diuji daya regenerasinya pada media NAA 1 mg/l. Media NAA dalam rentan waktu 8 MST mampu menginduksi akar tetapi pada kasus penelitian yang telah dilakukan yaitu fase kalus dan fase torpedo memunculkan primordia akar ditandai dengan tonjolan kecil pada jaringan. Abnormalitas dalam morfogenesis disebabkan oleh rendahnya kemampuan untuk membentuk fase embrio somatik yang akan berakibat pada kesulitan regenerasi menjadi planlet (Vidal, 2014).

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa kemampuan regenerasi kalus setelah media NAA 1 mg/l terdapat pada kultivar Kaspro dan Kuning. Kemudian dilakukan kultur suspensi untuk mengetahui kemampuan proliferasi kalus dan daya regenerasinya. Kultivar kaspro pada media P1 yaitu picloram 12 mg/l menunjukkan bahwa kalus pada media suspensi membentuk fase *heart* dan globular sehingga kalus dari media suspensi diketahui sesuai dengan tujuan dari kultur media suspensi yaitu proliferasi kalus. Fase globular dan *heart* merupakan fase yang terdapat pada sel embriogenik sehingga memungkinkan untuk dijadikan eksplan untuk perbaikan genetik tanaman ubi kayu dengan pendekatan kultur jaringan. Hal tersebut menandakan bahwa fase awal kalus yaitu globular merupakan tahapan awal yang penting sesuai dengan pendapat Liu, Xu dan Chua (1993) bahwa

polar transport auksin pada fase awal perkembangan embrio merupakan tahapan sangat penting untuk pembentukan kalus simetris bilateral yang mempengaruhi distribusi auksin secara merata pada embrio.

Kemudian berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, hasil sub kultur kalus kalus fase globar dan heart pada media regenerasi padat yang diperoleh dari kultur suspensi tidak ditemukan kalus yang mengarah pada regenerasi sampai melewati periode pangamatan. Hal tersebut dapat disebabkan oleh periode kultur suspensi yang terlalu lama sehingga dapat mengurangi potensi embriogenik dari kalus selama periode kultur (Arnold, 2002).



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat dihasilkan kesimpulan sebagai berikut :

1. Respon induksi kalus dari beberapa kultivar lokal pada media induksi FEC menunjukkan respon yang berbeda dalam membentuk FEC ditunjukkan dengan rerata frekuensi dan skor FEC tertinggi terdapat pada kultivar Kaspro sebesar 51,26% dan skor 4 sebagai kategori kemampuan membentuk FEC tinggi.
2. Respon kalus dari kultivar lokal menunjukkan bahwa penggunaan kultivar lokal menghasilkan FEC dengan kemampuan proliferasi yang sama berdasarkan peninjauan pada variabel pengamatan volume suspensi, berat segar dan viabilitas sel sebab FEC sudah diseleksi di media padat sebelum kultur suspensi.
3. Tingkat proliferasi kalus pada jenis auksin yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan hasil suspensi FEC pada penambahan berat basah dengan pemberian 12 mg/l picloram yang menghasilkan rata-rata berat basah yaitu 1,19 gram.
4. Respon kalus menunjukkan adanya interaksi antara penggunaan jenis kultivar apabila diaplikasikan secara bersamaan dengan perbedaan jenis auksin sehingga menghasilkan berat basah tertinggi yaitu pada perlakuan Ketan yang diinteraksikan dengan Picloram 12 mg/l yaitu 0,64 gram sehingga dapat direkomendasikan penggunaan ZPT pada media suspensi FEC ubi kayu dari kultivar Kaspro, Ketan dan Kuning menggunakan picloram 12 mg/l.

5.2 Saran

Informasi mengenai penggunaan picloram 12 mg/l perlu disertai dengan penelitian mengenai durasi suspensi yang tepat sebab setiap varietas menunjukkan inkonsistensi fase tertinggi proliferasi serta dibutuhkan penambahan durasi pada kultur regenerasi hasil suspensi sebab hasil regenerasi kalus menunjukkan tiap kultivar tidak seragam.

DAFTAR PUSTAKA

Abramović, B. F., Anderluh, V. B., Gaál, F. F., & Šojić, D. V. 2007. Derivative spectrophotometric determination of the herbicides picloram and triclopyr in mixtures. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(8-9), 809-819.

Ahmad, A., ul Qamar, M. T., Shoukat, A., Aslam, M. M., Tariq, M., Hakimian, M., & Joyia, F. A. 2021. The effects of genotypes and media composition on callogenesis, regeneration and cell suspension culture of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *PeerJ*, 9, e11464.

Apio, H. B., Alicai, T., Baguma, Y., Mukasa, S. B., Bua, A., & Taylor, N. 2015. Production of friable embryogenic callus and regeneration of Ugandan farmer-preferred cassava genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 14(22), 1854-1864.

Blom, T.J.M., Kreis, W., van Iren, F. 1992. A non-invasive method for the routine-estimation of fresh weight of cells grown in batch suspension cultures. *Plant Cell Reports* 11, <https://doi.org/10.1007/BF00232168>

Castro-Concha, L. A., Escobedo, R. M., & de Miranda-Ham, M. L. 2006. Measurement of cell viability in in vitro cultures. In *Plant cell culture protocols* (pp. 71-76). Humana Press.

Dwimahyani, I. 2013. Metode Suspensi Sel Untuk Membentuk Spot Hijau Pada Kultur In-Vitro Galur Mutan Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L). *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*, 3(2).

Feitosa, T., Bastos, J. L. P., Ponte, L. F. A., Jucá, T. L., & Campos, F. D. A. D. P. 2007. Somatic embryogenesis in cassava genotypes from the northeast of Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 201-206.

Feng, W. E. N., SU, W. P., Zheng, H., YU, B. C., Zhang, P., & Guo, W. W. 2020. Plant regeneration via protoplast electrofusion in cassava. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(3), 632-642.

Feng, W. E. N., SU, W. P., ZHENG, H., YU, B. C., ZHANG, P., & GUO, W. W. 2020. Plant regeneration via protoplast electrofusion in cassava. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(3), 632-642.

Fitriani, H. 2016. *Friable Embryogenic Callus* (FEC) Sebagai Material Perbaikan Sifat Unggul Ubi Kayu. *Biotrends*, 7(1), 9-13.

<https://www.bps.go.id/dynamictable/2015/09/09%2000:00:00/880/produksi-ubi-kayu-menurut-provinsi-ton-1993-2015.html>

IE, P. F. I. E. 2016. Evaluation on the effects of culture medium on regeneration of oil palm plantlets from immature embryos (IE). *Journal of Oil Palm Research*, 28(2), 234-239.

Jacyn Baker, C., & Mock, N. M. 1994. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(1), 7-12.

Karyadi, A. K., & Buchory, A. 2007. Pengaruh penambahan auksin dan sitokinin terhadap pertumbuhan tunas bawang putih.

Kong, E. Y., Biddle, J., Foale, M., & Adkins, S. W. 2020. Cell suspension culture: A potential in vitro culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis. *Industrial Crops and Products*, 147, 112125.

Leonova, L. A., Gamburg, K. Z., Vojnikov, V. K., & Varakina, N. N. 1985. Promotion of respiration by auxin in the induction of cell division in suspension culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 4(1), 169-176.

Mariska, I. & Husni, A. (2006). Perbaikan sifat genotip melalui fusi protoplas pada tanaman lada, nila dan terung. *Jurnal Penelitian dan pengembangan Pertanian*, 25(2), 55-60.

Nugroho, C. C., Khumaida, N., & Ardie, S. W. 2016. Pertumbuhan tunas ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) genotipe Jame-jame secara in vitro. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 44(1), 40-46.

Raemakers, C. J. J. M., Sofiari, E., Jacobsen, E., & Visser, R. G. F. 1997. Regeneration and transformation of cassava. *Euphytica*, 96, 153-161.

Raemakers, C. J. J. M., Sofiari, E., Taylor, N., Henshaw, G., Jacobsen, E., & Visser, R. G. F. 1996. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants by particle bombardment using luciferase activity as selection marker. *Molecular Breeding*, 2, 339-349.

Ramulifho, E., Goche, T., Van As, J., Tsilo, T. J., Chivasa, S., & Ngara, R. 2019. Establishment and characterization of callus and cell suspension cultures of selected *Sorghum bicolor* (L.) Moench varieties: A resource for gene discovery in plant stress biology. *Agronomy*, 9(5), 218.

RIYADI, I. 2005. Pertumbuhan biak kalus dan suspensi sel tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) Growth of callus and cell suspension cultures of cinchona (*Cinchona ledgeriana* Moens). *Menara Perkebunan*, 73(1).

Riyadi, I., Efendi, D., Purwoko, B. S., & Santoso, D. 2016. Embriogenesis somatik tidak langsung pada tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) menggunakan sistem kultur suspensi, perendaman sesaat, dan media padat.

Roostika, I., Khumaida, N., Mariska, I., & Wattimena, G. A. 2012. The effect of picloram and light on somatic embryogenesis regeneration of pineapple.

Rossin, C. B., & Rey, M. E. C. 2011. Effect of explant source and auxins on somatic embryogenesis of selected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars. *South African Journal of Botany*, 77(1), 59-65.

Sahraroo, A., Babalar, M., Mirjalili, M. H., Moghaddam, M. R. F., & Ebrahimi, S. N. 2014. In-vitro callus induction and rosmarinic acid quantification in callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 13(4), 1447.

Santos, M. R. A., & Paz, E. S. 2016. Effect of 2, 4-d on callus induction in leaf explants of peach palm (*Bactris gasipaes* hbk). *Embrapa Rondônia-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.

Shi, Guomin., Lina Yang and Tao He. 2016. Plant Regeneration from Protoplasts of *Gentiana straminea* Maxim. *Open Life Science* 11: 55–60.

Sriroth, K., K. Piyachomkwan, S. Wanlapatit, S. Nivitchanyong. 2010. The promise of a technology revolution in cassava bioethanol: from Thai practice to the world practice. *Fuel* 89:1333-1338.

Suryowinoto, M. 1996. Prospek kultur jaringan dalam perkembangan pertanian modern. *Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. hlm*, 2-18.

Taylor N J, Edwards M, Kiernan R C, Davey C D M, Blakesley D, Henshaw G G. 1996. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Biotechnology*, 14, 726–730

Tripathi, M. K., Tripathi, N., Tiwari, S., Tiwari, G., Mishra, N., Bele, D., ... & Tiwari, S. 2021. Optimization of different factors for initiation of somatic embryogenesis in suspension cultures in sandalwood (*Santalum album* L.). *Horticulturae*, 7(5), 118.

Widaningsih R. 2015. Outlook Komoditas Pertanian Tanaman Pangan. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. Kementerian Pertanian.

Yusuf, N. A., Annuar, M. S. M., & Khalid, N. 2013. Physical stress for overproduction of biomass and flavonoids in cell suspension cultures of *Boesenbergia rotunda*. *Acta physiologiae plantarum*, 35(5), 1713-1719. BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Zhang, P., & Gruissem, W. 2004. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In *Transgenic crops of the world: essential protocols* (pp. 301-319). Dordrecht: Springer Netherlands.

Zhang, Y. H., Lu, Y. Y., He, C. Y., & Gao, S. F. 2019. A method for cell suspension culture and plant regeneration of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 136, 313-322.

Zulkarnain, Z. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman: Solusi perbanyak tanaman budi daya*. Bumi Aksara.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Deskripsi Kultivar Lokal

Deskripsi Kultivar Lokal Kaspro (Radjit dan Presestiawati, 2011 ; Kurniawan, 2010; Rahman et al., 215)

Warna Daun	: Hijau Muda
Bentuk Daun	: Menjari
Produktivitas	: 35 Ton/Hectare
Umur Panen	: 8 Bulan
Kadar Pati	: 22,23%
Warna Umbi	: Putih
Kadar HCN	: >100 mg/l
Rasa	: Pahit

Deskripsi Kultivar Lokal Ketan Kabupaten Lampung (Pranowo, 2021)

Bentuk Daun	: Lanclote
Warna Daun	: Hijau Gelap
Warna Tunas	: Hijau Keunguan
Warna Tulang Daun	: Hijau Kemerahan
Warna Luar Batang	: Hijau Kekuningan
Warna Korteks Batang	: Hijau Terang
Warna Epidermis Batang	: Coklat Muda
Warna Ujung Percabangan Batang	: Hijau
Bentuk Umbi	: Silinder
Warna Kulit Luar Umbi	: Cokelat Gelap
Umur Panen	: 12 Bulan
Hasil	: 25 Ton/Hectare

Karakteristik Kultivar Lokal Kuning di Sumatera Utara (Jonharnas et al, 2012)

Warna Daun Muda	: Hijau Muda
Bentuk Daun	: Normal
Warna Tangkai Daun	: Merah
Warna Batang	: Putih
Warna Kulit Umbi	: Cokelat
Warna Kulit Ari	: Merah
Warna Daging Umbi	: Kuning Muda
Umur Panen	: 12 Bulan
Hasil	: 20 Ton/Hectare

Lampiran 2. Data Pengamatan dan Olah Data variabel Pengamatan

Hasil Pengamatan Skor FEC (%) dan Transfromasi Data

Perlakuan Jenis Kultivar	U1	U2	U3	U4	U5	U6	rata-rata
KASPRO	60	60	80	60	60	40	60
KETAN	60	0	0	0	0	0	10
KUNING	20	100	80	20	20	20	43,33333

Perlakuan	Skor FEC	0,5	Transformasi
KASPRO	60	60,5	51,06117612
	60	60,5	51,06117612
	80	80,5	63,79475148
	60	60,5	51,06117612
	60	60,5	51,06117612
	40	40,5	39,5236079
KETAN	20	20,5	26,9214959
	0	0,5	4,054807228
	0	0,5	4,054807228
	0	0,5	4,054807228
	0	0,5	4,054807228
	0	0,5	4,054807228
KUNING	20	20,5	26,9214959
	100	100	90
	80	80,5	63,79475148
	20	20,5	26,9214959
	20	20,5	26,9214959
	20	20,5	26,9214959
TOTAL		648,5	616,239331

Tabel ANOVA Frekuensi FEC (%)

SK	DB	JK	KT	F Hit	notasi	5%	1%
perlakuan	2	64335,2	3217,6	10,98	*	3,68	6,36
galat	15	4404,2	293,62				
total	17	10839					

Uji Lanjut DMRT 5% Frekuensi FEC (%)

SQRT	14,6734		
tabel duncan 5%	2	3	
	3,014	3,16	

dmrt	44,22562	46,36794125	
perlakuan	rata-rata	rata-rata+dmrt	simbol
KETAN	7,87	52,092	a
KUNING	43,58	89,95	a
KASPRO	51,26		a

Tabel Pengamatan skor pembentukan FEC

Perlakuan	U1	U2	U3	U4	U5	U6	Rata-rata
KASPRO	4	4	5	4	4	3	4
KETAN	1	0	0	0	0	0	0,17
KUNING	0	5	5	2	0	0	2

Tabel Uji Lanjut DMRT skor pembentukan FEC

SQRT	0,848383	
tabel duncan 5%	2	3
	3,014	3,16
DMRT	2,557025	2,68088911
perlakuan	rata-rata	rata-rata+dmrt
KETAN	0	2,557025246
KUNING	2	4,68088911
KASPRO	4	

Voume Suspensi mulai dari 7 HST, 14 HST, 21 HST, 28 HST

PERLAKUAN	ULANGAN	Volume			
		7 HST	14 HST	21 HST	28 HST
KASPRO.P1	1	1	1,3	1,5	1,5
	2	1	1,2	1,2	1,2
	3	1	1,5	1,6	1,6
	rerata	1	1,33	1,433	1,43
KASPRO.P2	1	1	1,5	1,5	1,5
	2	1,5	1	1	1,5
	3	1,5	1,5	1,5	1,5
	rerata	1,33	1,33	1,33	1,5
KASPRO.P3	1	0,8	0,8	0,8	0,8
	2	0,5	0,5	0,5	0,5
	3	1	1	1	1

	rerata	0,77	0,77	0,77	0,77
KETAN.P1	1	1,5	1,7	1,7	1,7
	2	1	1	1	1
	3	0,5	1	1,3	1,3
	rerata	1	1,23	1,33	1,33
KETAN.P2	1	1	1	1	1
	2	1	1,1	1,1	1,1
	3	0,5	0,7	1,3	1,3
	rerata	0,83	0,93	1,13	1,13
KETAN.P3	1	0,5	0,6	0,7	0,7
	2	0,5	0,5	0,5	0,5
	3	0,6	0,6	0,6	0,6
	rerata	0,53	0,57	0,6	0,6
KUNING.P1	1	1	1	1	1,5
	2	1	1	1,6	1,6
	3	1	1,3	1,3	1,3
	rerata	1	1,1	1,3	1,47
KUNING.P2	1	1	1	1,2	1,2
	2	1	1,4	1,5	1,6
	3	1	1,1	1,1	1,1
	rerata	1	1,17	1,27	1,3
KUNING.P3	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1
	3	1	1,1	1,1	1,1
	rerata	1	1,03	1,03	1,03

Tabel Pengamatan Berat Segar

Perlakuan	W0	W1	Indeks Pertumbuhan
KASPRO.P1	0,25	0,4	0,6
	0,25	0,4	0,6
	0,25	0,36	0,44
KASPRO.P2	0,25	0,29	0,16
	0,25	0,3	0,2
	0,25	0,3	0,2
KASPRO.P3	0,25	0,25	0
	0,25	0,25	0
	0,25	0,25	0
KETAN.P1	0,25	0,43	0,72
	0,25	0,4	0,6

	0,25	0,4	0,6
KETAN.P2	0,25	0,3	0,2
	0,25	0,3	0,2
	0,25	0,3	0,2
KETAN.P3	0,25	0,25	0
	0,25	0,25	0
	0,25	0,25	0
KUNING.P1	0,25	0,25	0
	0,25	0,25	0
	0,25	0,25	0
KUNING.P2	0,25	0,37	0,48
	0,25	0,33	0,32
	0,25	0,34	0,36
KUNING.P3	0,25	0,34	0,36
	0,25	0,35	0,4
	0,25	0,35	0,4

Tabel ANOVA Berat Segar

SK	DB	JK	KT	F Hit	notasi	5%	1%
perlakuan	8	1,41	0,18	4,13	**	2,51	3,71
faktor auksin (P)	2	0,32	0,16	3,75	**	3,56	6,013
faktor Kultivar (V)	2	0,01	0,001	0,07	NS	3,56	6,013
v x p	4	1,09	0,27	6,36	*	2,93	4,58
galat	18	0,04	0,043				
total	20	1,45					

Tabel Uji Lanjut DMRT 5%

tabel duncan 5%	2	3	4	5	6	7	8	9
	2,97	3,12	3,21	3,27	3,32	3,36	3,38	3,40
DMRT	0,35	0,37	0,38	0,39	0,40	0,40	0,40	0,41

Perlakuan	Rata-Rata	Dmrt	Rata-Rata+Dmrt	Notasi
KASPRO.P3	0	0,354312425	0,354312425	a
KETAN.P3	0	0,371723941	0,371723941	a
KUNING.P1	0	0,382814838	0,382814838	a
KASPRO.P2	0,19	0,390447283	0,580447283	ab
KETAN.P2	0,2	0,395933103	0,595933103	abc
KUNING.P3	0,39	0,400226354	0,790226354	bcd
KUNING.P2	0,39	0,403446292	0,793446292	bcd

KASPRO.P1	0,55	0,405950688	0,955950688	cd
KETAN.P1	0,64			d

Tabel Pengamatan Viabilitas Sel

Perlakuan	U1	U2	U3	Rata-Rata
KASPRO.P1	92,11	83,05	49,37	74,84333333
KASPRO.P2	69,6969697	73,6	73,52941176	72,27546049
KASPRO.P3	83,58208955	79,79798	71,95121951	78,44376295
KETAN.P1	62,5	71,42857	65,51724138	66,4819376
KETAN.P2	76,08695652	76,47059	84,3373494	78,96496472
KETAN.P3	63,82978723	84	80	75,94326241
KUNING.P1	85,71428571	81,25	62,96296296	76,64241623
KUNING.P2	81,48148148	80	83,56164384	81,68104177
KUNING.P3	82,45614035	70,83333	69,56521739	74,28489703

Tabel ANOVA

SK	DB	JK	KT	F Hit	notasi	5%	1%
perlakuan	8	462,03	57,75	0,03	NS	2,510158	3,705421881
faktor auksin (P)	2	118,75	59,38	0,03	NS	3,554557	6,012904835
faktor kultivar (V)	2	64,30	32,15	0,02	NS	3,554557	6,012904835
v x p	4	278,98	69,74	0,04	NS	2,927744	4,579035967
galat	18	1805,49	1805,49				
total	20	2267,51					

Keterangan :

ANOVA = Analysis of Variance

DMRT = Duncan's Multiple Range Test

SQRT = Square Range Test

SK = Sumber Keragaman

DB = Derajat Bebas

JK = Jumlah Kuadrat

KT = Kuadrat Total

U = Ulangan

V = Kultivar

P = Auksin

W0 = Berat awal sebelum perlakuan

W1 = Berat Akhir setelah pengamatan

Lampiran 3. Bagan Alir Tahapan Penelitian

