

ABSTRAK DAN EXECUTIVE SUMMARY

PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



**PERBANYAKAN MASAL BIBIT SINGKONG (*Manihot esculentum*) BEBAS
PENYAKIT *CASSAVA BROWN STREAK DISEASE (CBSD)* MELALUI
KULTUR MERISTEM SECARA *IN VITRO***

Ketua / Anggota Tim

Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS, NIDN : 0026046502 (Ketua)

Dr. Ir. Slameto, MP NIDN : 0023026001 (Anggota 1)

Dra. Dwi Setyati, M.Si, NIDN : 0017046402 (Anggota 2)

**UNIVERSITAS JEMBER
DESEMBER 2013**

ABSTRAK

PERBANYAKAN MASAL BIBIT SINGKONG (*Manihot esculentum*) BEBAS PENYAKIT CASSAVA BROWN STREAK DISEASE (CBSD) MELALUI KULTUR MERISTEM SECARA *IN VITRO*

Peneliti : Didik Pudji Restanto ¹⁾, Slameto ²⁾ dan Dwi Setyati ³⁾
Mahasiswa terlibat : Ida Anggraini, NIM 101510501058
Sumber dana : BOPTN 2013
Kontak E-mail : restanto.lemlit@unej.ac.id

^{1,2)} Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Jember, dan ³⁾ Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Jember.

ABSTRAK

Indonesia mempunyai potensi dalam pengembangan singkong dunia karena terletak di daerah tropis. Produktivitas masih rendah dibandingkan Negara Afrika. Produksi bisa ditingkatkan dengan perluasan lahan (bekas tambang dan lahan yang produktif) sehingga produksi singkong nasional akan meningkat. Kebutuhan singkong dunia mencapai 220 juta ton per tahun untuk mencukupi sekitar 700 juta orang sebagai sumber karbohidrat yang penting pada Negara tropis dan subtropis. Kebutuhan tersebut didominasi oleh central produksi singkong dunia seperti Afrika.

Cassava brown streak disease (CBSD) adalah penyakit utama pada tanaman singkong yang mengakibatkan masalah yang serius pada perkebunan singkong di dunia terutama di Afrika, Tanzania dan India (Wassawa *et. al*, 2010). Di Indonesia virus ini masih belum optimal dalam penanganannya. Penyakit ini secara sistemik ada didalam tanaman singkong yang merusak daun batang dan umbi dan sangat menurunkan kualitas dan produksi singkong dunia seperti India penurunan hasil bisa mencapai 100% akibat serangan penyakit CBSD (Lopez, 2003).

Bioteknologi tanaman memegang peranan penting dalam usaha perbaikan pertumbuhan dan produksi tanaman. Perbanyakkan bibit singkong dalam jumlah besar yang bebas penyakit CBSD sangat diperlukan. Pendekatan bioteknologi melalui perpaduan pemanasan (*thermotherapy*) pada eksplan dan kultur meristem dapat digunakan untuk mendapatkan tanaman singkong bebas penyakit, seragam dan bermutu baik. Para ahli yang tergabung dalam The East Africa Root Crops Research Network (EARRNET) berupaya untuk mengatasi virus menjadi isu dunia pada tanaman singkong. Transformasi gen untuk mendapatkan tanaman yang tahan terhadap CBSD direncanakan terealisasi pada tahun 2016, sehingga petani singkong bisa memanfaatkan bibit singkong yang tahan CBSD dan bermutu

baik (Ntawuruhunga dan Legg, 2007). Indonesia akan mencanangkan perluasan lahan secara nasional melalui gernas-singkong sehingga kebutuhan bibit yang seragam akan mengalami kesulitan. Teknologi perbanyakan masal bibit singkong seragam dan bermutu baik dengan perpaduan pemanasan (*thermtherapy*) dan kultur meristem ini dirancang selama 3 (tiga) tahun dengan pentahapan sebagai berikut :**Tahun I , target tahun ini adalah mendapatkan komposisi 2,4 D yang baku untuk induksi kalus singkong.** Kalus yang didapatkan seragam dan berkualitas baik (kompak dan embrionik) yang diharapkan mampu bermultiplikasi. Bahan tanam berasal dari stek singkong berumur 4 minggu yang telah ditumbuhkan pada pemanasan (*thermotherapy*) temperature 35°C di *growth chamber*. Tunas yang tumbuh akan diambil meristemnya dengan menggunakan mikroskop dan diinkubasi dalam petridis untuk mendapatkan kalus yang embrionik. Media yang digunakan adalah media ½ MS dengan kombinasi 2,4 D (0,1 ppm, 0,5 ppm dan 1 ppm) dan BAP (0,05 ppm dan 0,1 ppm). Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa sterilisasi eksplan daun dan stek singkong sudah ditemukan yaitu sebelum masuk laminar batang singkong disemprot dengan alcohol 70% dan dicuci dengan tween dan dibilas sampai bersih. Direndam potongan eksplan dengan alcohol 70% selama 5 menit dan dicuci sampai bersih. Kemudian direndam lagi dalam klorox 4% selama 3 – 5 menit dan dibilas dengan air steril dan eksplan siap ditanam. Dengan menggunakan 2,4 D sebesar 7 ppm pada eksplan daun memberikan respon terbaik terhadap berat kalus. Reagerasi tanaman dengan GA3 0,5 ppm tidak bermultiplikasi dan muncul sistem perakaran sedangkan dengan BAP 0,5 ppm bisa bermultiplikasi dan tidak muncul sistem perakaran.

Kata kunci : *Manihot esculentum*, CBSD, GA3, BAP dan kultur meristem

EXSECUTIVE SUMMARY

PERBANYAKAN MASAL BIBIT SINGKONG (*Manihot esculentum*) BEBAS PENYAKIT CASSAVA BROWN STREAK DISEASE (CBSD) MELALUI KULTUR MERISTEM SECARA *IN VITRO*

Peneliti : Didik Pudji Restanto ¹⁾, Slameto ²⁾ dan Dwi Setyati ³⁾
Mahasiswa terlibat : Ida Anggraini, NIM 101510501058
Sumber dana : BOPTN 2013
Kontak E-mail : restanto.lemlit@unej.ac.id

^{1,2)} Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Jember, dan ³⁾ Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Jember.

I. LATAR BELAKANG DAN TUJUAN

Latar Belakang

Indonesia menjadi urutan ke 4 produksi singkong dunia setelah Afrika, Brasil dan India. Meskipun Indonesia menduduki peringkat ke 4 dunia tetapi berdasarkan data FAO bulan November 2012, Indonesia menjadi negara terbesar import singkong sebesar 2,6 juta ton. Produksi singkong nasional ternyata tidak mencukupi untuk kebutuhan nasional karena akhir akhir ini sudah mulai singkong digunakan sebagai bahan baku bioethanol.

Melalui Gerakan nasional singkong sejahtera bersama (Gernas-SSB) tahun 2016 Indonesia meramalkan uang beredar dari pasar singkong dalam negeri mencapai Rp57,6 triliun yang bisa mensejahterakan 576 ribu petani di 33 provinsi. Pencapaian target itu harus diimbangi dengan perluasan lahan dan produktifitas tanaman singkong perlu ditingkatkan. Penyediaan bibit singkong berupa stek yang bermutu baik secara nasional akan mengalami kesulitan dengan keterbatasan stek yang dihasilkan. Perlu diketahui

bahwa bibit singkong melauai stek yang digunakan akan menghasilkan tanaman yang tidak seragam karena stek berasal dari bagian tanaman yang beda.

Peningkatan luas lahan singkong harus diimbangi dengan penyediaan bibit yang memadai. Selama ini penyediaan bibit singkong masih secara tradisional dengan menggunakan stek, hasil yang didapatkan berupa tanaman yang tidak seragam. Kultur jaringan merupakan salah satu alternatif dalam upaya untuk penyediaan bibit secara masal, seragam dan bermutu baik.

Penggunaan teknik kultur jaringan sangat memungkinkan untuk perbanyakkan masal bibit singkong bebas penyakit, seragam dan bermutu baik. Perpaduan antara perlakuan termotherapy dan kultur meristem akan menjawab semua masalah yang terjadi, sehingga tidak pernah kekurangan tentang penyediaan bibit singkong melalui kultur jaringan (Quak, 1972). Perbanyakkan bibit singkong melalui pembentukan somatik embriogenesis sangat memungkinkan yaitu dengan eksplan daun (Raemakers, 2005), biji dan kotiledon (Stamp, 1986).

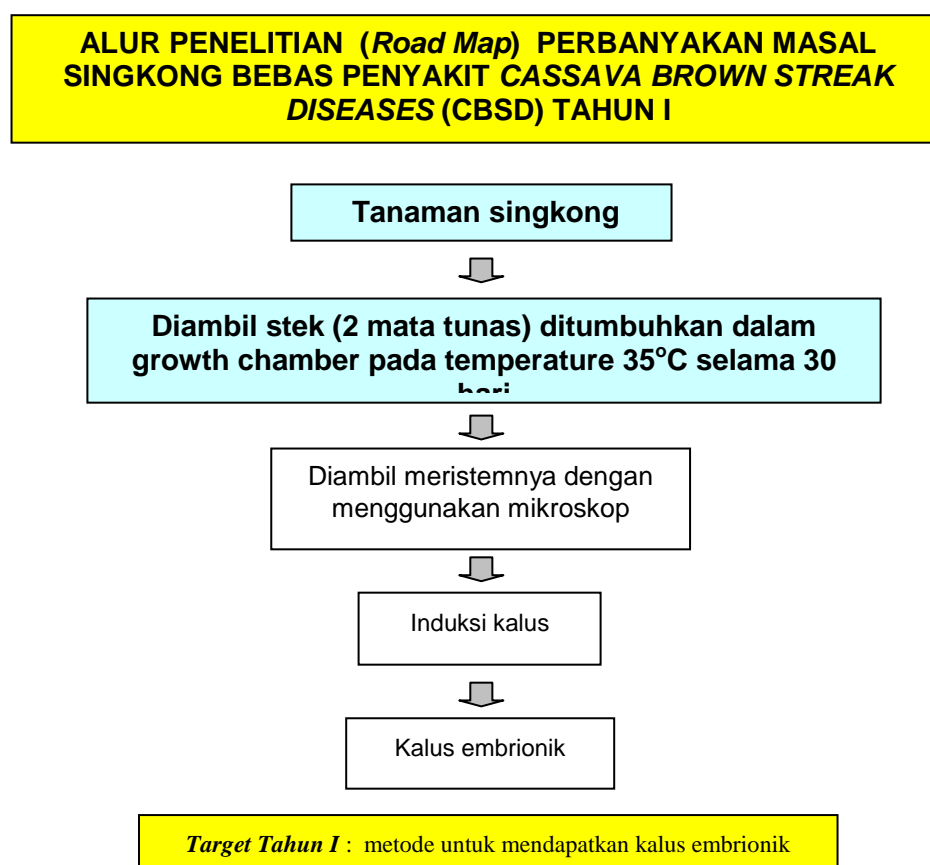
Para peneliti singkong berupaya untuk memproduksi bibit tanaman singkong yang bebas penyakit dengan sekala besar untuk memenuhi kebutuhan bibit singkong yang seragam dan bermutu baik. Dengan teknologi kultur jaringan melalui kultur meristem yang dipandukan dengan pemanasan bisa menyelesaikan masalah yang selama ini menghantui daerah sentral produksi singkong dunia seperti Afrika.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk perbanyakkan masal bibit singkong dan merakit tanaman singkong yang bebas virus melalui kultur meristem yang dipandukan dengan perlakuan suhu tinggi pada eksplan singkong.

II. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman pada Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian UNEJ. Adapun alur penelitian yang akan dilakukan terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Alur penelitian Perbanyakan Masal Singkong Melalui Kultur Meristem

Persiapan bahan tanam dari tunas samping (auxillary buds) singkong

Tanaman singkong gajah diambil dari Balitkabi- Malang atau dari Kalimantan yang merupakan varietas lokal. Stek singkong dengan 2 tunas ditumbuhkan dalam growth chamber pada temperatur 35°C selama 4 hari. Jaringan meristematik tunas samping (*auxillary buds* 1,5 cm) dicuci dengan menggunakan sabun pada air mengalir. Potongan eksplan disterilkan dengan 5% clorox selama 2 menit dan di cuci dengan air

steril sebanyak 3x. Meristem diambil dengan menggunakan mikroskop binokuler dengan hati-hati dalam laminar. Semua eksplan direndam dalam betadin 1% selama 5 menit untuk mengurangi adanya pencoklatan (browning) pada eksplans.

2. Induksi Kalus

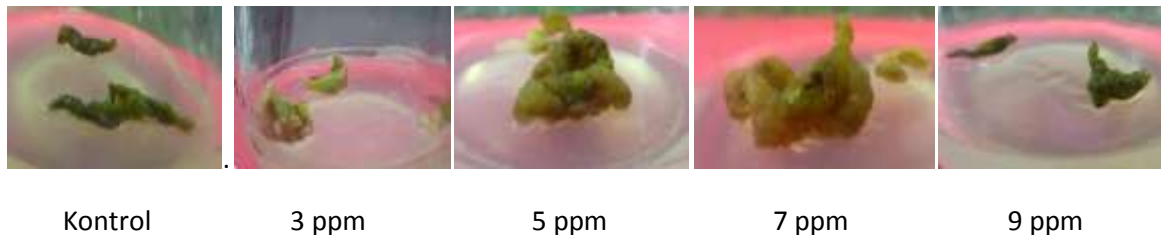
Tunas yang tumbuh dari stek diambil meristemnya dengan hati-hati di bawah mikroskop untuk mendapatkan meristem. Media yang digunakan adalah $\frac{1}{2}$ media MS dengan kombinasi 2,4 D (0,1 ppm, 0,5 ppm dan 1 ppm) dan BAP (0,05 ppm dan 0,1 ppm). Semua eksplan akan diinkubasi dalam petridis yang bisa memudahkan dalam pengamatan perkembangan kalus. Kalus akan terbentuk sekitar 4 minggu kemudian di sub kultur untuk memperbanyak kalus.

Target tahun I ini adalah mendapatkan komposisi BAP dan 2,4 D yang baku untuk induksi kalus singkong. Kalus yang didapatkan seragam dan berkualitas baik (kompak dan embrionik) yang diharapkan mampu bermulplikasi

III. HASIL YANG DICAPAI

Induksi kalus dari eksplan daun dengan menggunakan 2,4 D

Eksplan daun diambil dari daun muda yang telah membuka penuh. Daun dicuci dengan detergen untuk menghilangkan debu dan kontaminan dari luar. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan ethanol 70% direndam selama 5 menit dan dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali dan dilanjutkan perendaman dalam clorox selama 3-5 menit dan dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali. Terakhir direndam dalam betadin sebagai antiseptik dan ditaman dalam media MS yang terkandung 2,4D sebanyak 0 ppm (kontrol), 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm dan 9 ppm. Hasil pengamatan pada minggu ke 6 terlihat pada Gambar 2



Gambar 2. Induksi kalus daun singkong setelah inkubasi 6 minggu pada 0, 3, 5, 7 dan 9 ppm 2,4D

Pada Gambar 2 terlihat bahwa pada kontrol tidak menunjukkan perubahan yang berarti dengan meningkatnya kandungan 2,4 D akan mempercepat terbentuknya kalus dan terbukti akan berkembang sampai konsentrasi 7 ppm dan terjadi penurunan induksi kalus. Hal ini terbukti dengan bertambahnya berat kalus sampai penambahan 7 ppm 2,4 D terlihat pada Tabel 1.

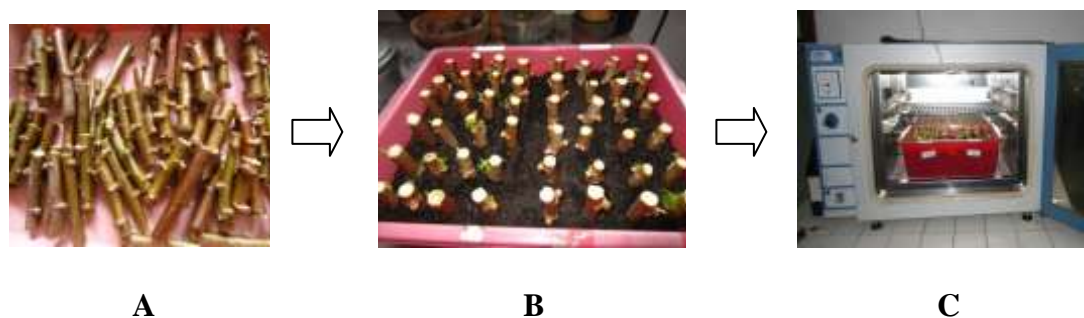
Tabel 1 Berat kalus (g) dari eksplan daun setelah pemberian 2,4D 0, 3, 5, 7 dan 9 ppm

Konsentrasi 2,4 D	Rata-rata berat kalus
0 ppm (kontrol)	2,25 a
3 ppm	3,86 a
5 ppm	5,78 b
7 ppm	6,52 b
9 ppm	2,11 a

Pada Tabel 1 terlihat bahwa dengan peningkatan konsentrasi 2,4D akan terjadi peningkatan berat kalus sampai pada konsentrasi 7 ppm meskipun tidak berbeda nyata dengan 5 ppm dan pada 9 ppm sudah terjadi penurunan berat kalus. Hal ini diduga pada konsentrasi 9 ppm sudah terjadi stagnasi (induksi kalus berkurang dan ada kecenderungan menurun. Menurut Sofiari *et., al*, 1996, melaporkan penggunaan 2,4 D 8 ppm menghasilkan kalus terbaik dan akan mengalami penurunan berat kalus pada 10 ppm dan kalus mengalami pencoklatan (browning) dan tidak mau berkembang.

Persiapan Bahan Tanam untuk kultur meristem

Telah dicobakan tanaman singkong gajah yang mempunyai potensi hasil tinggi. Tanaman singkong yang terinfeksi virus dijadikan sebagai bahan tanam. Stek singkong dua mata tunas disemaikan dalam bak plastik selama 4 hari, kemudian diperlakukan dengan suhu tinggi (40 °C) selama 4 hari dengan harapan meristem yang terbentuk akan bebas virus. Adapun alur penelitian terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3 Tanaman singkong umur 4 hari dan diperlakukan pada temperatur 40°C

Pada Gambar di atas terlihat stek dengan 2 mata tunas ditanam selama 4 hari untuk memunculkan tunas dan diperlakukan pada suhu 40°C. Pendekatan bioteknologi secara *in vitro* melalui pemanasan (thermotherapy) dan kultur meristem dapat digunakan untuk mengeliminasi virus suatu tanaman (Zapata *et al.*, 1995). Jaringan meristem suatu tanaman merupakan jaringan yang bebas virus dikarenakan virus tidak mampu dalam jaringan meristematik, aktivitas metabolisme yang tinggi sehingga virus tidak memungkinkan mereplikasi karena persaingan dan tingkat auksin tinggi pada meristem dapat menghambat multiplikasi virus. Selama perlakuan pemanasan dengan menggunakan kultur meristem maka virus tidak bisa mereplikasi (Walkey, 1976). Keberhasilan eliminasi virus pada tanaman tergantung pada spesies virus dan varietas tanaman. Perlakuan suhu yang tinggi secara *in vitro* telah efektif dalam menghilangkan virus (Allam, 2000). Setelah di berikan perlakuan dengan suhu 35 – 40 °C selama 4 hari kemudian dipindahkan dalam polibag selama 1,5 bulan (Gambar 4).



Gambar 4. Alur penelitian perbanyakan massal singkong menggunakan kultur meristem

Pada Gambar 4 setelah melalui perlakuan temperatur yang tinggi dan dibarengi dengan eksplan meristem akan terbentuk kalus embrionik yang siap bermultiplikasi dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap yang bebas dari virus.

Secara paralel kalus embrionik dicoba untuk dimultiplikasi menjadi tanaman lengkap dengan menggunakan hormon GA3 0,5 ppm dan BAP 0,5 ppm (Gambar 5).



Gambar 5. Multiplikasi kalus embrionik menjadi tanaman lengkap dengan menggunakan GA3 0,5 ppm dan BAP 0,5 ppm

Pada Gambar 5 terlihat kecenderungan dengan penambahan GA3 0,5 ppm terjadi sistem perakaran dan tanaman tidak multiplikasi (tunggal). Sedangkan dengan BAP 0,5 ppm tidak ditemukan sistem perakaran dan tanaman mampu bermultiplikasi lebih banyak.

IV. SIMPULAN PENELITIAN

Dari hasil penelitian disimpulkan :

1. Sterilisasi bahan tanam dari lapang daun dan batang singkong cukup menggunakan perendaman 70% ethanol selama 3-5 menit dan dilanjutkan dengan perendaman clorox 4% selama 5 menit.
2. Dalam menginduksi kalus dengan eksplan daun terbaik menggunakan 2,4 D konsentrasi 7 ppm, terbukti dengan eksplan mampu membentuk kalus dan berat basahnya tertinggi.
3. Reperasi tanaman dengan GA3 0,5 ppm tidak bermultiplikasi dan muncul sistem perakaran sedangkan dengan BAP 0,5 ppm bisa bermultiplikasi dan tidak muncul sistem perakaran

DAFTAR PUSTAKA

- Allam, E.K. 2000. Eradication of *Banana bunchy top virus* and *Banana mosaic virus* from diseased banana plants. *Annals of Agriculture Science* 45:33-48.
- Lopez, C.E., Zuluaga, A.P., Cooke, R., Delseny, M., Tohme, J. and Verdier, V. (2003) Isolation of resistance gene candidate (RGCs) and characterization of an RGC cluster in cassava. *Mol. Gen. Genomics* 26
- Raemakers K, Tzitzikas (2005). Indirect somatic embryogenesis in cassava for genetic modification purposes, *Plant cell reports* 24:507-512.
- Quak, F, 1972. Review of heat treatment and meristem tip culture as a methods to obtain virus free plants. 10 th Int. Hortic. Cong. Proc. 3:12-25.
- Stamp JA and GG. Henshaw, 2007, Somatic Embryogenesis in Cassava School of Biological Sciences, University of Bath, Claverton Down, Bath BA2 7AY, United Kingdom
- Sofiari E, E. Kanju, C.J.J.M. Raemakers, E. Jacob, 1996. COMPARISON OF NAA AND 2,4-D INDUCED SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CASSAVA. Thesis Agriculture Fakultas Wagenengen University
- Zapata, C., Miller, J.C. and Smith, R.H. 1995. An in vitro procedure to eradicate Potato viruses X, Y and S from russet norkotah and two of its strains. *In vitro Cell Development Biology* 31:153-159.
- Walkey, D.G.A. 1976. High temperature inactivation of Cucumber and Alfalfa mosaic viruses in *Nicotiana rustica* cultures. *Annals of Applied Biology* 84:183-192.