

Pengaruh Umur Eksplan dan Subkultur terhadap Pembentukan Tunas Majemuk Beberapa Kultivar Ketela Pohon

Tri Muji Ermayanti¹, Yuli Sulistyowati¹, dan Adi Pancoro²

¹Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI, Cibinong

²Jurusan Biologi, FMIPA, ITB, Bandung

ABSTRAK

Pembentukan tunas majemuk dari nodus tunggal dipengaruhi oleh banyak faktor di antaranya adalah komposisi media, penggunaan zat pengatur tumbuh, lingkungan fisik *in vitro*, dan fisiologi eksplan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh umur eksplan (internodus) dan subkultur terhadap pembentukan tunas majemuk secara *in vitro* pada beberapa kultivar ketela pohon. Media MS yang mengandung beberapa zat pengatur tumbuh dipergunakan dalam percobaan ini. Pengamatan jumlah tunas majemuk dilakukan setelah biakan berumur satu bulan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa BAP secara terpisah, atau yang dikombinasikan dengan NAA atau GA₃ diperlukan untuk pembentukan tunas majemuk. Banyaknya subkultur dan umur eksplan yang berbeda yang ditanam pada berbagai media menurunkan jumlah tunas majemuk yang terbentuk per eksplan.

Kata kunci: Ketela pohon, *Manihot esculenta*, umur eksplan, subkultur, tunas majemuk.

ABSTRACT

The formation of compound shoots from a single node was influenced by many factors, for example, medium composition, growth regulator, *in vitro* physical environment, and explant physiology. The objective of the research was to find out the effect of the explant and subculture age on the formation of compound shoots *in vitro* on several cassava cultivars. MS media containing some growth regulators were used in this study. The observation on the number of compound shoots was conducted after the culture aged one month. The research results indicated that BAP alone, or combined with NAA or GA₃ was needed for the formation of compound shoots. The number of subcultures and different ages of the explants grown on various media reduced the number of compound shoots per explant.

Key words: Cassava, *Manihot esculenta*, explant age, subculture, compound shoots.

PENDAHULUAN

Ketela pohon (*Manihot esculenta* Crantz.) adalah salah satu tanaman pangan yang banyak dimanfaatkan di sebagian besar wilayah di Indonesia. Selain sebagai tanaman pangan yang dikonsumsi umbinya, umbi tanaman ini juga banyak diolah menjadi tepung tapioka atau produk lainnya. Budi daya dan pemuliaan tanaman

pada ketela pohon sudah lama dilakukan untuk meningkatkan nilai tambah beberapa kultivar tanaman ini baik dengan menggunakan teknik-teknik konvensional maupun dengan teknik *in vitro* termasuk untuk mendapatkan tanaman transgenik (Arias-Garson dan Sayre, 1993; Luong *et al.*, 1995). Penelitian lain yang telah dikembangkan secara *in vitro* antara lain untuk mendapatkan embrio somatik dan regenerasinya (Raemakers *et al.*, 1993; Konan *et al.*, 1994), preservasi dengan menggunakan metode kriopreservasi (Mycock *et al.*, 1995) dan penelitian tentang biologi molekuler (Salehuzzaman *et al.*, 1994).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui beberapa faktor yang mempengaruhi pembentukan tunas majemuk terutama umur eksplan dan banyaknya subkultur dari beberapa kultivar ketela pohon yang terdapat di Indonesia. Selanjutnya tunas majemuk akan dipelihara untuk stok tanaman *in vitro* yang sangat berguna bagi penelitian selanjutnya.

BAHAN DAN METODE

Material dan Pelaksanaan Penelitian

Bahan tanaman yang dipergunakan adalah stek enam kultivar ketela pohon yaitu: Adira II, Adira IV, Bic 323, Bic 137, Bic 317, dan Bic 319 yang diperoleh dari Puslitbang Tanaman Pangan, Bogor. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biak Sel dan Jaringan Tanaman, Puslitbang Bioteknologi LIPI, Cibinong.

Pengaruh Beberapa Macam Media terhadap Pembentukan Tunas Majemuk pada Ketela Pohon

Media MS (Murashige dan Skoog, 1962) padat yang diberi penambahan 2% sukrosa dan 0,8% agar dipergunakan sebagai media dasar untuk induksi tunas majemuk ketela pohon. Zat pengatur tumbuh BAP 1 mg/l dan NAA 0,01 mg/l yang diperoleh dari acuan referensi Stamp dan Henshaw (1986) dipergunakan sebagai media pembandingan (S1). Beberapa media lainnya yang dicobakan adalah MS tanpa zat pengatur tumbuh (S0), MS + 0,5 mg/l BAP (S2), MS + 0,1 mg/l BAP (S3), MS + 0,3 mg/l BAP (S4) dan MS + 0,1 mg/l BAP + 0,05 mg/l NAA + 0,03 mg/l GA3 (S5). Eksplan yang dicobakan adalah internodus dari tanaman yang relatif masih muda. Sterilisasi dilakukan dengan 0,025% HgCl₂ selama 5-7 menit. Percobaan menggunakan enam kultivar ketela pohon dan masing-masing kultivar mempunyai 12 eksplan sebagai ulangan. Biakan diinkubasi pada ruang bersuhu 26-28°C yang mempunyai 16 jam fotoperiode.

Pengaruh Subkultur Tunas Ketela Pohon terhadap Pembentukan Tunas Majemuk

Percobaan dilakukan untuk mengetahui pengaruh subkultur terhadap pembentukan tunas majemuk dari eksplan tunas tunggal yang ditanam pada beberapa media. Dua kultivar yaitu Adira II dan Adira IV dipergunakan dalam percobaan ini. Internodus sebanyak 12 ditanam pada media S1, S4, dan S5. Setelah sterilisasi internodus ditumbuhkan ke dalam media S0 selama dua minggu untuk mendapatkan tunas tunggal, kemudian masing-masing tunas diisolasi dan ditumbuhkan pada media S1, S4, dan S5. Penanaman pertama ini disebut sebagai SK0. Satu bulan kemudian diamati jumlah tunas majemuk yang terbentuk. Setelah itu, subkultur dilakukan dengan cara mengisolasi satu tunas dari SK0 kemudian ditumbuhkan pada media baru (SK1). Setelah satu bulan diamati jumlah majemuk yang terbentuk. Subkultur selanjutnya SK2 dan SK3 dilakukan lagi untuk mengamati jumlah tunas yang terbentuk setelah berumur satu bulan.

Pengaruh Umur Eksplan terhadap Kemampuan Membentuk Tunas Majemuk

Tujuan dari percobaan ini adalah untuk mengetahui pengaruh umur internodus terhadap kemampuan membentuk tunas majemuk. Tunas yang paling muda (tunas 1) diambil dengan cara memotong pucuk dari stek batang yang berumur 2-3 minggu. Setelah 2-3 minggu tunas yang terbentuk dari cabang stek dipotong dan dikulturkan (tunas 2). Tunas 3 dan 4 diambil 2-3 minggu setelah tunas sebelumnya. Selanjutnya internodus ditanam pada media S4. Sebanyak enam internodus dari kultivar Adira II, Adira IV, dan Bic 323 dipergunakan dalam percobaan ini. Penghitungan jumlah tunas majemuk dilakukan satu bulan setelah penanaman.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Beberapa Macam Media terhadap Pembentukan Tunas Majemuk pada Ketela Pohon

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanpa atau dengan zat pengatur tumbuh pada media MS dapat menstimulasi munculnya tunas tunggal dari internodus seminggu setelah tanam (Tabel 1). Namun setelah tunas diisolasi dan ditumbuhkan ke dalam media baru banyaknya tunas yang terbentuk bervariasi bergantung pada kultivar ketela pohon dan jenis media yang dipergunakan. Morfologi tunas tunggal (daun dan batang) yang terbentuk nampak normal dengan daun dan batang berwarna hijau gelap.

Tabel 1. Banyaknya internodus (%) dari enam kultivar ketela pohon yang membentuk tunas tunggal pada berbagai media.

Kultivar	Media					
	S0	S1	S2	S3	S4	S5
Adira II	66,7	58,3	83,3	91,7	100,0	100,0
Adira IV	91,7	66,7	91,7	91,7	100,0	91,7
Bic 137	66,7	41,7	41,7	100,0	75,0	75,0
Bic 317	83,3	83,3	100,0	83,3	100,0	91,7
Bic 319	91,7	83,3	100,0	75,0	100,0	83,3
Bic 323	100,0	66,7	100,0	100,0	100,0	91,7

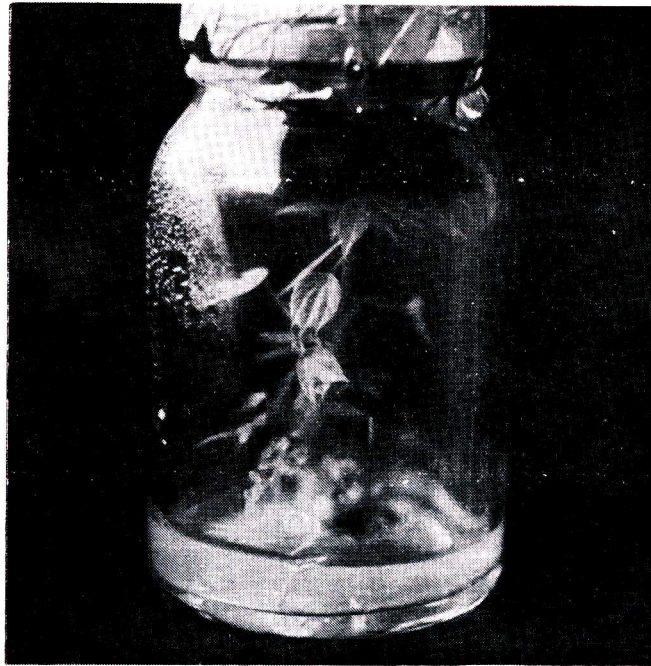
BAP (0,3-1 mg/l) terpisah atau dikombinasikan dengan NAA, dan GA₃ sangat diperlukan untuk pembentukan tunas majemuk (Tabel 2) namun juga menghasilkan kalus pada dasar eksplan (Gambar 1). Hal ini tidak menguntungkan untuk pertumbuhan dan perkembangan tunas majemuk selanjutnya. Pengurangan konsentrasi BAP menjadi 0,1 mg/l tanpa NAA dapat mengurangi pembentukan kalus namun menstimulasi pembentukan akar. Pada beberapa kultivar penambahan NAA atau GA₃ tidak mutlak diperlukan karena pemberian BAP pada konsentrasi tertentu secara terpisah tanpa NAA atau GA₃ dapat menstimulasi pembentukan tunas majemuk.

Hampir semua kultivar membentuk lebih banyak tunas majemuk pada media S1, S4, dan S5 dibandingkan dengan internodus yang ditanam pada media S2 dan S3, tetapi pada media S1 terbentuk kalus pada bagian dasar eksplan yang lebih banyak dibandingkan dengan eksplan yang ditanam pada media lainnya. Usaha untuk mengurangi terbentuknya kalus di dasar eksplan perlu dilakukan, karena pembentukan kalus ini menurunkan kemampuan eksplan membentuk tunas majemuk dan mengurangi laju tumbuh tunas. Dari penampakan luar terlihat bahwa banyaknya kalus pada dasar tunas menyebabkan anatomi batang dan daun yang abnormal. Batang nampak membesar dengan daun yang tebal seperti gejala vitrifikasi.

Tabel 2. Jumlah rata-rata tunas yang terbentuk per internodus dari enam kultivar ketela pohon yang ditanam pada berbagai media.

Kultivar	Media					
	S0	S1	S2	S3	S4	S5
Adira II	1,00 ^e	7,13 ^a	1,00 ^e	2,47 ^{de}	3,73 ^c	6,00 ^{ab}
Adira IV	1,33 ^e	6,93 ^a	1,20 ^e	1,00 ^e	4,47 ^c	7,00 ^a
Bic 137	1,00 ^e	7,00 ^a	1,67 ^e	1,00 ^e	5,00 ^{bc}	4,60 ^c
Bic 317	1,00 ^e	4,00 ^c	1,53 ^e	1,00 ^e	6,00 ^{ab}	5,67 ^b
Bic 319	1,00 ^e	2,53 ^d	1,53 ^e	1,00 ^e	3,73 ^c	4,27 ^c
Bic 323	1,00 ^e	3,67 ^c	1,00 ^e	1,00 ^e	5,00 ^{bc}	3,53 ^{cd}

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada P<0,01 menurut uji Duncan.



Gambar 1. Tunas majemuk ketela pohon kultivar Adira II pada media S3. Pada pangkal batang terjadi pembentukan kalus.

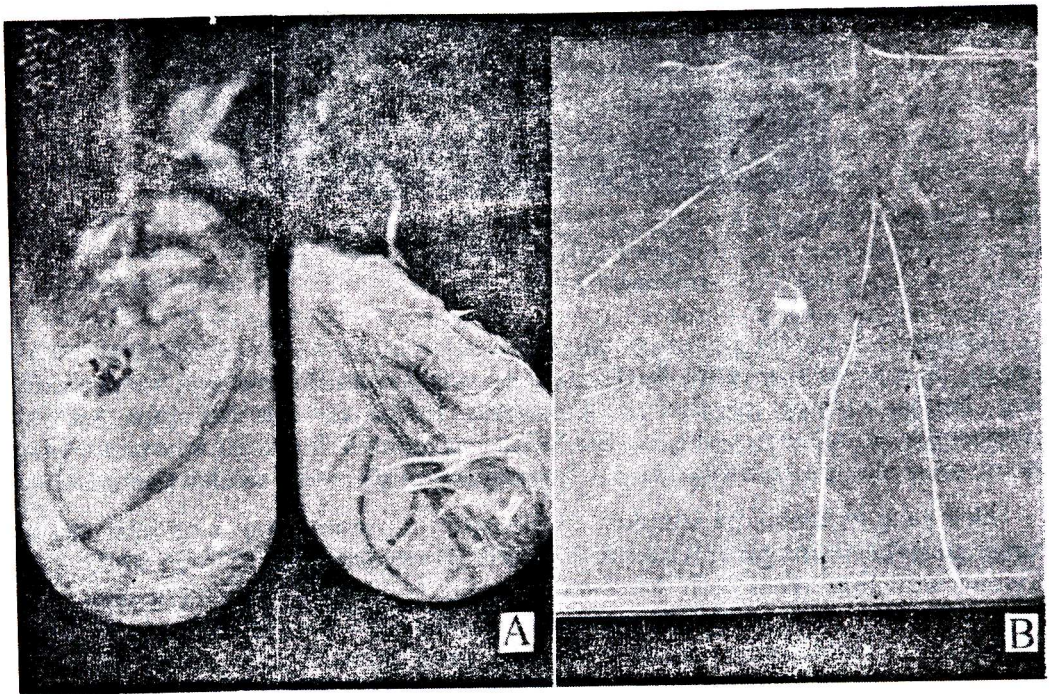
Penggunaan media MS tanpa zat pengatur tumbuh hanya menghasilkan tunas tunggal kecuali kultivar Adira IV. Tunas ini dalam waktu dua minggu membentuk akar. Semua kultivar membentuk akar pada media S0 dan beberapa kultivar membentuk akar pada media S2, S3, S4, dan S5 (Tabel 3). Tidak ada tunas yang membentuk akar pada media S1. Akar muncul antara 10-14 hari setelah penanaman.

Akar yang terbentuk pada media S5 mempunyai penampakan yang lebih besar, panjang dan berwarna putih (Gambar 2a), sedangkan pada media S3 dan S0 nampak normal, berwarna kecoklatan, kecil dan panjang (Gambar 2b). Penampakan akar yang membesar pada media S5 perlu diteliti lebih lanjut karena menyerupai umbi mikro. Tunas ketela pohon kultivar MCOL22 yang ditanam pada media MS yang mengandung NAA, kinetin, dan zeatin mampu membentuk umbi mikro yang mengandung pati (Salehuzzaman *et al.*, 1994). Hasil serupa juga diperoleh pada tunas ketela pohon kultivar MCOL22 yang ditanam pada media MS yang mengandung 0,1 mg/l BAP dan NAA (Cabral *et al.*, 1992).

Beberapa kultivar mampu membentuk lebih dari satu akar per planlet pada media S0, S2, S4, dan S5 (Tabel 4). Hanya dua kultivar yaitu Adira IV dan Bic 319 membentuk akar tunggal pada media S2. Untuk memperoleh akar normal, media S0 adalah media terbaik.

Tabel 3. Banyaknya tunas (%) dari enam kultivar ketela pohon yang membentuk akar pada berbagai media.

Kultivar	Media					
	S0	S1	S2	S3	S4	S5
Adira II	66,7	0	26,7	73,3	0	53,3
Adira IV	60,0	0	0	66,7	53,3	60,0
Bic 137	66,7	0	0	53,3	0	66,7
Bic 317	53,3	0	0	53,3	20,0	0
Bic 319	53,3	0	53,3	53,3	13,3	13,3
Bic 323	100,0	0	0	46,7	13,3	0



Gambar 2 Akar planlet ketela pohon yang membengkak menyerupai umbi mikro (A). Penampakan akar normal dari planlet ketela pohon (B).

Tabel 4. Jumlah rata-rata akar yang terbentuk per tunas dari 6 kultivar ketela pohon pada berbagai media.

Kultivar	Media					
	S0	S1	S2	S3	S4	S5
Adira II	3,67 ^a	0,00 ^d	1,00 ^{cd}	1,73 ^{bc}	1,53 ^{bc}	2,33 ^b
Adira IV	1,20 ^{cd}	0,00 ^d	0,00 ^d	3,00 ^{ab}	2,53 ^b	0,00 ^d
Bic 137	2,80 ^b	0,00 ^d	0,00 ^d	1,40 ^c	3,07 ^{ab}	3,53 ^a
Bic 317	1,40 ^c	0,00 ^d	0,00 ^d	1,00 ^{cd}	0,00 ^d	1,00 ^{cd}
Bic 319	2,33 ^b	0,00 ^d	1,00 ^{cd}	1,00 ^{cd}	0,53 ^{cd}	3,53 ^a
Bic 323	2,20 ^{bc}	0,00 ^d	0,00 ^d	1,67 ^{bc}	1,27 ^{cd}	3,40 ^{ab}

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada $P < 0,01$ menurut uji Duncan.

Pengaruh Subkultur Tunas Ketela Pohon terhadap Pembentukan Tunas Majemuk

Subkultur menurunkan kemampuan tunas membentuk tunas majemuk. Subkultur pertama menurunkan jumlah tunas majemuk yang terbentuk per eksplan pada kedua kultivar yang dicobakan baik pada media S1, S4, maupun S5 (Tabel 5). Oleh sebab itu, perlu dilakukan usaha untuk mencari eksplan atau media terbaik untuk menekan penurunan pembentukan tunas majemuk pada ketela pohon. Pada *Artocarpus heterophyllus* banyaknya subkultur memperlambat terbentuknya tunas aksilar namun meningkatkan jumlah akar yang terbentuk (Amin dan Jaiswal, 1993).

Tabel 5. Jumlah tunas majemuk yang terbentuk per eksplan setelah tiga kali subkultur pada media S1, S4, dan S5. Masing-masing subkultur dilakukan setelah satu bulan.

Kultivar Adira IV				
Media	SK0	SK1	SK2	SK3
S1	7,50 ^a	4,08 ^{bc}	3,58 ^{cd}	3,33 ^{cd}
S4	7,00 ^a	4,25 ^{bc}	3,42 ^{cd}	2,25 ^d
S5	7,58 ^a	3,67 ^{cd}	3,92 ^{bcd}	2,83 ^{cd}
Kultivar Adira II				
S1	7,33 ^a	5,08 ^b	3,75 ^{cd}	3,75 ^{cd}
S4	7,42 ^a	5,42 ^b	3,25 ^{cd}	2,83 ^{cd}
S5	7,08 ^a	5,33 ^b	3,33 ^{cd}	3,58 ^{cd}

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada $P < 0,01$ menurut uji Duncan

Tabel 6. Jumlah tunas majemuk yang terbentuk per eksplan yang berasal dari tunas 1, tunas 2, tunas 3, dan tunas 4 pada media S4.

Kultivar	Tunas 1.	Tunas 2	Tunas 3	Tunas 4
Adira II	5,50 ^{ab}	4,67 ^{bc}	3,50 ^{cd}	2,50 ^d
Adira IV	6,17 ^a	3,83 ^{cd}	2,67 ^d	2,33 ^d
Bic 323	5,67 ^a	3,33 ^{cd}	3,00 ^{cd}	2,50 ^d

Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada $P < 0,01$ menurut uji Duncan

Pengaruh Umur Eksplan terhadap Kemampuan Membentuk Tunas Majemuk

Umur eksplan juga mempengaruhi kemampuan tunas tunggal berkembang membentuk tunas majemuk. Tunas primer yaitu tunas yang terbentuk langsung dari batang stek merupakan eksplan yang terbaik untuk pembentukan tunas majemuk (Tabel 6). Internodus yang diambil dari tunas yang muncul dari batang sekunder (umurnya lebih tua) masih tetap mampu membentuk tunas majemuk, namun jumlah tunas yang dihasilkan lebih rendah dari internodus yang diisolasi dari tunas primer. Umur eksplan juga mempengaruhi pembentukan dan pertumbuhan tunas majemuk tanaman *Halesia carolina* dan *Malus domestica* (Brand, 1993). Pada kedua tanaman ini jumlah tunas majemuk bervariasi tergantung pada konsentrasi BA yang ditambahkan pada media dan umur eksplan, sedangkan pertumbuhan tunas yang lambat diperoleh dari eksplan yang muda, meningkat pada umur tertentu dan menurun sangat tajam pada eksplan yang lebih tua. Regenerasi tunas daun *Gerbera hybrida* juga menurun seiring dengan meningkatnya umur eksplan (Reynoird *et al.*, 1993).

KESIMPULAN

Pada beberapa kultivar ketela pohon yang diteliti penambahan BAP secara terpisah atau dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh lainnya diperlukan untuk pembentukan tunas majemuk. Media MS tanpa zat pengatur tumbuh sesuai untuk perakaran karena dapat menstimulasi perakaran yang normal. Subkultur dan umur tanaman menurunkan jumlah tunas terbentuk dari tunas tunggal yang ditanam pada beberapa media.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian kegiatan penelitian Riset Unggulan Terpadu III berjudul "Penghambatan Ekspresi Gen Linamarase dengan Penerapan Teknologi Gen 'Antisense' Linamarase untuk Memperoleh Tanaman Ketela Pohon Bebas HCN".

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, M.N. and V.S. Jaiswal. 1993. *In vitro* response of apical bud explants from mature trees of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 33: 59-65.
- Arias-Garson, D.I. and R.T. Sayre. 1993. Tissue specific inhibition of transient gene expression in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). Plant Science. 93: 121-130.
- Brand, M.H. 1993. Initiating cultures of *Helesia* and *Malus*: influence of flushing stage and benzyladenine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 33: 129-132.
- Cabral, C.B., F.J.L. Aragao, K. Matsumoto, D.C. Monte-Nethich, and E.L. Rech. 1992. Cassava tissue culture: Multiple shoots and somatic embryogenesis. In Roca, W.M. and A.M. Thro (Eds.). Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network. Cartagena de Indias, Colombia. 180-184.
- Konan, N.K., R.S. Sangwan, and B.S. Sangwan. 1994. Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 37: 91-102.
- Luong, H.T., P.R. Shewry, and P.A. Lazzeri. 1995. Transient gene expression in cassava somatic embryos by tissue electroporation. Plant Science. 107: 105-115.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497. 9-157
- Mycock, D.J., J. Wesley-Smith, and P. Berjak. 1995. Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. Annals of Botany 75: 331-336.
- Raemakers, C.J.J.M., C.M. Schavemaker, E. Jacobsen, and R.G.F. Visser. 1993. Improvements of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). Plant Cell Reports. 12: 226-229.
- Reynold, J., D. Chriqui, M. Noin, S. Brown, and D. Marie. 1993. Plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several *Gerbera* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 33: 203-210.
- Salehuzzaman, S.N.I.M., E. Jacobsen, and R.G.F. Visser. 1994. Expression patterns of two starch biosynthetic genes in *in vitro* cultured cassava plants and their induction by sugars. Plant Science. 98: 53-62.
- Stamp, J.A. and G.G. Henshaw. 1986. Adventitious regeneration in cassava. In L.A. Withers and P.G. Alderson (Eds.). Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications. Butterworths. London. Boston. Singapore. Sydney. pp. 14.