BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan yang berasal dari potongan tunas aksiler dan daun muda ubi kayu klon Adira-4 ternyata mampu diinduksi menghasilkan pertumbuhan yang dikehendaki. Tunas aksiler dan kalus yang terbentuk dari masing-masing eksplan menunjukkan pertumbuhan dan diferensiasi yang berbeda, tergantung zat pengatur tumbuh yang digunakan. Data selengkapnya dapat dilihat pada uraian di bawah ini.

IV.1. Pembentukan dan Penggandaan Tunas Aksiler

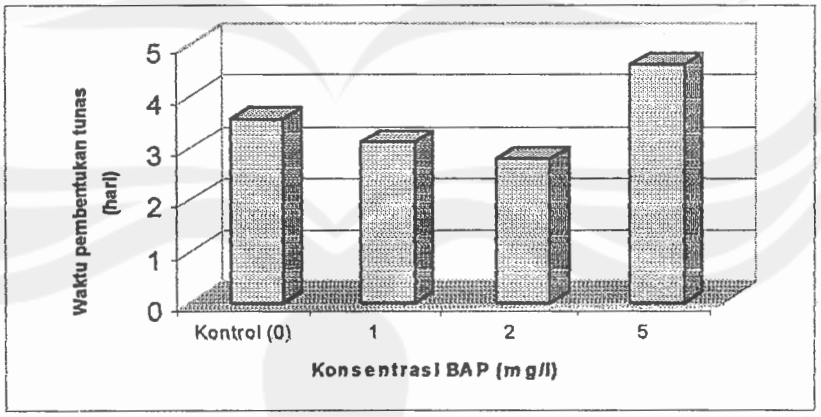
IV.1.1. Pembentukan Tunas Aksiler

Salah satu aspek yang paling penting dan menarik dari perbanyakan sel secara *in vitro* adalah kemampuan tumbuhan untuk beregenerasi dan memperbanyak diri dari kultur sel dan jaringan. Tipe yang paling sederhana dari perbanyakan tumbuhan secara *in vitro* adalah pertumbuhan tunas aksiler yang dirangsang dengan perlakuan zat pengatur tumbuh tertentu untuk memecah dormansi dan menghasilkan cabang-cabang tunas (Gamborg dan Phillips, 1995).

Eksplan yang berasal dari potongan tunas aksiler ubi kayu ternyata berhasil tumbuh dalam medium kultur dengan penambahan zat pengatur tumbuh BAP. Hasil uji Anava juga menunjukkan bahwa konsentrasi zat pengatur tumbuh berpengaruh

sangat nyata terhadap waktu pembentukan tunas aksiler pada ubi kayu klon Adira-4 (Tabel Lampiran 3). BAP yang digunakan secara umum berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan tunas ubi kayu dan semua eksplan yang dikultur mampu membentuk tunas. Tunas yang terbentuk umumnya menunjukkan keragaman morfologi, baik daun dan batang, tergantung dari konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan.

Inisiasi tunas aksiler tercepat pada klon Adira-4 terjadi pada hari ke- 2.76 setelah pengkulturan, yang diperoleh dari medium yang mengandung 2.0 mg/l BAP (Tabel Lampiran 4). Tunas yang terbentuk memiliki morfologi normal antara lain, daun dan batang berwarna hijau, tidak keriput, tinggi tanaman normal dan tidak kerdil. Pembentukan tunas aksiler paling lambat, yaitu 4.60 hari setelah pengkulturan diperoleh dari medium yang mengandung 5.0 mg/l BAP (Gambar 1).



Gambar 1. Pengaruh BAP terhadap rata-rata waktu pembentukan tunas pada kultur potongan batang ubi kayu klon Adira-4.

Hasil yang dapat diperoleh dari data di atas menunjukkan bahwa inisiasi tunas aksiler dari potongan batang ubi kayu klon Adira-4 sangat dipengaruhi oleh

konsentrasi sitokinin (BAP) yang ditambahkan ke dalam medium. Penambahan konsentrasi BAP yang diberikan mampu mempercepat waktu pembentukan tunas yang terjadi, kecuali pada konsentrasi 5.0 mg/l BAP. Penambahan 5.0 mg/l BAP cenderung menghambat waktu inisiasi tunas. Hal ini juga dilaporkan dalam penelitian Konan *et al.* (1997) bahwa pembentukan tunas aksiler ubi kayu kultivar TMS 30555 terjadi rata-rata pada 2 - 3 hari setelah pengkulturan di dalam medium MS dengan penambahan BAP, TDZ, zeatin dan kinetin pada konsentrasi 10.0 dan 15.0 mg/l. Peningkatan konsentrasi sitokinin yaitu 20.0 mg/l mengakibatkan eksplan berubah warna menjadi coklat dan lambat pertumbuhannya.

Sitokinin sebagai turunan adenin berperan aktif memacu pembelahan sel pada kultur *in vitro* dan mempercepat pertumbuhan tunas (George dan Sherrington, 1984). Pemberian sitokinin (BAP) pada taraf konsentrasi 5.0 mg/l pada kultur ubi kayu yang ternyata memperlambat inisiasi tunas aksiler kemungkinan disebabkan kelebihan sitokinin pada jaringan tanaman, sehingga mengakibatkan tunas terhambat pertumbuhannya. Hu dan Whang (1983) juga menyatakan bahwa adanya konsentrasi sitokinin yang tinggi di dalam medium dapat menghambat pemanjangan tunas dan menurunkan ukuran tunas yang tumbuh.

Tunas yang terbentuk pada tiap-tiap perlakuan yang diujikan cenderung mengalami perubahan setelah dikulturkan lebih dari dua minggu dalam medium inisiasi tunas. Peristiwa ini diawali dengan perubahan warna daun ubi kayu dari hijau menjadi kuning, layu dan akhirnya gugur.

IV.1.2. Penggandaan Tunas Aksiler

Tunas aksiler yang dihasilkan dari kultur *in vitro* ubi kayu ini kemudian disubkultur ke medium perlakuan yang sama untuk merangsang terjadinya penggandaan tunas. Penggandaan tunas yang terjadi dengan pembentukan tunas lateral pada kultur disebabkan hilangnya dominansi apikal karena penambahan sitokinin eksogen yang membantu perkembangan tunas lateral atau tunas aksiler dengan menurunkan dominansi apikal (Junairiah, 1994).

Zat pengatur tumbuh BAP yang ditambahkan mampu meningkatkan jumlah tunas dan berpengaruh sangat nyata menurut uji Anava yang dilakukan. (Tabel Lampiran 5, 7 dan 9). Penambahan BAP secara umum mampu meningkatkan jumlah tunas aksiler yang dihasilkan pada umur 4, 7 dan 10 minggu dan masing-masing perlakuan menunjukkan respon yang baik

Tabel 1.Pengaruh BAP Terhadap Jumlah Tunas yang terjadi pada Kultur Potongan Tunas Aksiler Ubi Kayu Klon Adira-4.

Perlakuan	Mg/l	Jumlah tunas			Rata-rata
		4 minggu	7 minggu	10 minggu	
Kontrol	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00[d]
BAP	1.00	2.53	3.47	3.70	3.23 [c]
	2.00	3.80	4.17	4.47	4.15 [b]
	5.00	4.10	5.30	5.90	5.10 [a]
Rata-rata		2.86 [b]	3.51 [a]	3.77 [a]	

Angka dalam kolom dan baris yang berbeda diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata menurut uji Duncan ($\alpha = 0.05$)

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa rata-rata jumlah tunas terbanyak diperoleh pada medium yang mengandung 5.0 mg/l BAP, yaitu sebesar 5.10 tunas, tetapi dari pengamatan visual tunas yang dihasilkan tidak diimbangi dengan kualitas tunas tersebut. Tunas cenderung pendek, kerdil dan berkumpul membentuk roset pada pangkal batang serta sulit untuk dipisahkan (Gambar 2). Uji Duncan yang dilakukan juga menunjukkan bahwa masing-masing perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata dalam hal rata-rata jumlah tunas yang dihasilkan.

Pertumbuhan tunas dengan morfologi normal dan jumlah tunas relatif banyak, yaitu 4.15 tunas pada penelitian ini dihasilkan dari medium yang mengandung 2.0 mg/l BAP. Tunas yang dihasilkan mempunyai keragaman normal dengan warna daun dan batang hijau serta pertumbuhan batang yang normal (Gambar 2).

PERPUSTAKAAN
FAKULTAS BIOLOGI
ATMA JAYA
ARTA

Gambar 2. a). Pertumbuhan terbaik tunas aksiler ubi kayu (*Manihot esculenta*) klon Adira-4 dalam medium MS + 2.0 mg/l BAP, b). Pertumbuhan tunas aksiler ubi kayu klon Adira-4 yang berbentuk roset dalam medium MS + 5.0 mg/l BAP. a) dan b) berumur 4 minggu setelah pengkulturan.

Peningkatan jumlah tunas yang dihasilkan dengan meningkatnya konsentrasi BAP diduga disebabkan oleh kemampuan sitokinin dalam meningkatkan sintesis protein dan menghambat degradasi protein dan klorofil, menurunkan kecepatan respirasi sehingga sel tetap vigor (Weaver, 1972). Menurut Hu dan Whang (1983), BAP merupakan jenis sitokinin yang efektif dan konsisten untuk merangsang penggandaan tunas dalam kultur meristem, kultur pucuk dan kultur tunas, yang diikuti kemudian oleh kinetin dan 2-iP. Hal ini juga ditegaskan oleh Pierik (1987) bahwa kebutuhan tanaman akan sitokinin mungkin akan bervariasi dalam jenis dan konsentrasi, namun sebagian besar tanaman memberikan respon yang baik pada pemberian sitokinin BAP.

Hal serupa juga dijumpai pada penelitian Sharp *et al.* (1984), yaitu peningkatan konsentrasi *benzyladenine* (BA) ternyata meningkatkan jumlah tunas ubi kayu yang dihasilkan dan jumlah tunas yang terjadi meningkat pada konsentrasi antara 2.5 - 5.0 µM. Bentuk roset yang terdiri atas masing-masing 10 - 20 nodus diperoleh pada konsentrasi BA maksimal yang ditambahkan dan tergantung pada varietas ubi kayu, sedangkan konsentrasi di atas 5.0 µM BA ternyata menurunkan jumlah tunas yang terjadi.

Pertumbuhan tunas abnormal (roset) yang terbentuk dalam medium yang mengandung 5.0 mg/l BAP dalam percobaan ini juga diduga disebabkan oleh kelebihan sitokinin dalam jaringan tanaman. Menurut Bhojawani dan Razdan (1983) serta Salisbury dan Ross (1995), sitokinin yang ditambahkan ke dalam medium hanya

berperan dalam sitokinesis tetapi tidak dalam meningkatkan pertumbuhan organ, sehingga semakin tinggi konsentrasi sitokinin maka jumlah tunas yang dihasilkan akan semakin banyak tetapi pertumbuhan masing-masing tunas akan terhambat.

Bentuk pertumbuhan roset ini juga ditemukan pada kultur *in vitro* gladiol dan beberapa kultivar pisang. Penambahan 5.0 mg/l kinetin cenderung menghasilkan tunas yang berbentuk roset pada pangkal batang kultur tanaman gladiol kultivar Malang Strip dan Holand Putih (Sukarni, 1998). Yusnita, Mantja dan Hapson (1996) *dalam* Sukarni (1998) juga melaporkan bahwa semakin tinggi konsentrasi BA (5.0 mg/l) yang ditambahkan ke dalam medium semakin meningkatkan jumlah tunas yang dihasilkan, namun mutu tunas yang terbentuk semakin rendah karena berbentuk roset, pendek-pendek dan abnormal.

Penelitian terhadap beberapa kultivar ubi kayu asal Amerika Selatan dan Afrika yang dikulturkan pada medium MS dengan penambahan 5.0 mg/l BAP ternyata menunjukkan hal yang berbeda. Eksplan tumbuh normal dan 33 % dari eksplan yang diuji menghasilkan antara lima sampai sepuluh tunas. Konsentrasi 10.0 mg/l BAP yang ditambahkan meningkatkan jumlah tunas yang ada, tetapi persentase eksplan yang mampu memproduksi tunas hanya 9 % (Konan *et al.*, 1997).

Penggunaan BAP untuk merangsang pertumbuhan dan penggandaan tunas aksiler telah banyak dilakukan terhadap tanaman lain. Hutabarat (1997) melaporkan bahwa konsentrasi BAP yang ditambahkan ke dalam medium ternyata berhasil menggandakan tunas pada beberapa kultivar pisang. Konsentrasi 3.5 mg/l BAP

menghasilkan jumlah tunas terbanyak pada pisang Kepok Brot dan Kepok Gabu. BAP pada konsentrasi 7.0 mg/l dan 10.5 mg/l ternyata efektif menggandakan tunas pisang, masing-masing pada Klutuk Susu, Kepok Sobot, Batu, Klutuk Wulung dan Klutuk. Nugroho (1996) juga melaporkan bahwa konsentrasi BAP 1.0 mg/l mampu menghasilkan jumlah tunas terbesar, yaitu 7 tunas (58.3 %) pada tanaman *Macadamia integrifolia.*

Penggandaan tunas yang terjadi dapat diketahui dengan mengukur kecepatan penggandaan tunas dari masing-masing perlakuan dengan cara memindahkan tunas-tunas yang telah terbentuk ke dalam medium yang sama dalam jangka waktu tertentu. Uji Anava menunjukkan bahwa penambahan zat pengatur tumbuh berpengaruh sangat nyata terhadap laju penggandaan tunas yang terjadi (Tabel Lampiran 14).

Tabel 2. Pengaruh BAP Terhadap Laju Penggandaan Tunas Aksiler Ubi Kayu Klon Adira-4.

Perlakuan	Mg/l	Jumlah tunas per tiga minggu			Rata-rata
		sk1*)	sk2	sk3	
Kontrol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00 [c]
BAP	1.00	2.46	1.51	1.15	1.71 [a]
	2.00	1.57	1.12	1.09	1.26 [b]
	5.00	1.12	1.35	1.12	1.19 [b]
Rata-rata		1.29 [a]	0.99 [b]	0.84 [c]	

*) sk = sub kultur

Angka dalam kolom dan baris yang berbeda diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata menurut uji Duncan ($\alpha = 0.05$).

Laju penggandaan tunas tercepat berdasarkan data Tabel. 2 yaitu 1.71 tunas setiap tiga minggu diperoleh dari medium yang mengandung 1.0 mg/l BAP dan

menunjukkan beda nyata dengan laju penggandaan tunas terendah yaitu 1.19 tunas setiap tiga minggu dari medium yang mengandung 5.0 mg/l BAP (Tabel Lampiran 15). Tunas yang berasal dari medium kontrol, tanpa penambahan BAP tidak menunjukkan adanya laju penggandaan tunas. Tunas hanya bertambah tinggi dan tidak menghasilkan anakan. Laju penggandaan sebesar 0.00 setiap tiga minggu ini kemungkinan disebabkan lebih berperannya auksin endogen dalam pemanjangan tunas ke arah vertikal karena ketidakhadiran BAP yang ditambahkan ke dalam medium (Galston dan Davies, 1970).

Uji Duncan yang dilakukan juga menunjukkan adanya beda nyata antara laju penggandaan tunas pada subkultur pertama, kedua dan ketiga (Tabel Lampiran 16). Subkultur pertama menghasilkan laju penggandan tunas yang tercepat sebesar 1.29 untuk kemudian mengalami penurunan pada sukultur kedua dan ketiga. Laju penggandaan tunas pada ubi kayu klon Adira-4 yang mengalami penurunan pada subkultur ketiga juga dijumpai pada kultur gladiol hasil penelitian Sukarni (1998).

IV.2. Perakaran

IV.2.1. Pembentukan Akar

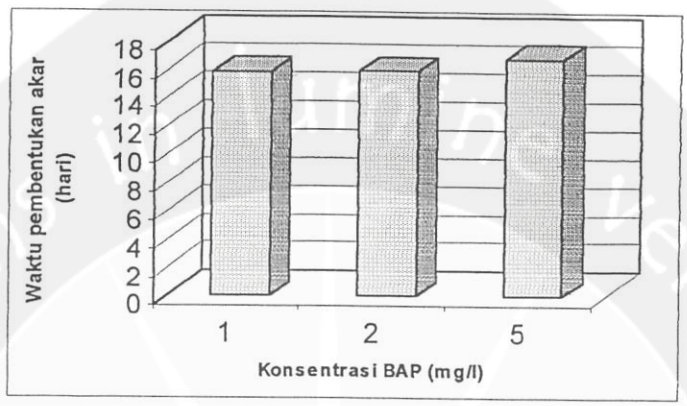
Tunas-tunas yang dihasilkan dari proses kultur *in vitro* ini kemudian dipindahkan ke dalam medium baru yang mengandung auksin untuk merangsang pembentukan akar. Jenis auksin yang digunakan adalah *indolebutyric acid* (IBA) dalam tarap konsentrasi 1.0 mg/l.

Konsentrasi BAP yang digunakan pada medium inisiasi tunas ternyata tidak berpengaruh terhadap waktu inisiasi akar ketika dipindahkan ke medium IBA 1.0 mg/l (Tabel Lampiran 17). Inisiasi akar tercepat terjadi pada hari ke- 15.81 dan 15.87 setelah pengkulturan yang diperoleh dari medium yang masing-masing berasal dari BAP 1.0 mg/lt dan 2.0 mg/l (Tabel Lampiran 18). Tunas yang berasal dari BAP 5.0 mg/l ternyata menghasilkan inisiasi akar paling lambat yaitu pada hari ke-16.77 setelah pengkulturan dalam medium yang mengandung IBA 1.0 mg/l (Gambar 3).

Pembentukan akar pada tunas yang berasal dari medium inisiasi tunas dengan penambahan BAP menunjukkan pertumbuhan akar yang lambat. Empat botol tunas dari sepuluh botol asal BAP 5.0 mg/l yang diujikan ternyata gagal membentuk akar dan tunas yang dikulturkan ini juga tidak berkembang dengan baik. Lambatnya inisisai akar ini kemungkinan disebabkan terjadinya perubahan rasio sitokinin dan auksin pada kultur sebagai akibat respon eksplan karena pemberian sitokinin dalam proses inisiasi tunas. Menurut Prawiranata *et al.* (1989), sitokinin yang ditambahkan ke dalam medium dapat menghambat pembelahan sel-sel meristem akar, sehingga akar sukar untuk tumbuh.

Akar yang dihasilkan dengan penambahan IBA 1.0 mg/l secara umum memiliki morfologi normal, tidak berkalus, berwarna putih dengan tekstur rapuh serta mudah putus (Gambar 4.I). Produksi akar secara spontan bahkan dijumpai pada perlakukan MS0 (kontrol) untuk inisiasi tunas apabila tunas dibiarkan tetap tumbuh dalam medium inisiasi dalam jangka waktu lebih dari 1 bulan (Gambar 4.II).

Terbentuknya akar secara spontan dalam medium kontrol untuk inisiasi tunas ini diduga karena dirangsang oleh auksin endogen pada ubi kayu (Galston dan Davies, 1970).



Gambar 3. Pengaruh BAP terhadap rata-rata waktu pembentukan akar pada kultur ubi kayu klon Adira-4 pada medium perakaran dengan penambahan IBA 1.0 mg/l.

ERPUSTAKAAN
ULTAS BIOLOGI
NIVERSITAS ATMA JAYA
OGYAKARTA

Gambar 4. I. Penampakan visual akar pada perlakukan IBA 1.0 mg/l umur 4 minggu setelah pengkulturan , a) Tunas dari MS0 yang dibiarkan tumbuh tanpa penambahan IBA, b) Tunas yang berasal dari BAP 1.0 mg/l, c) Tunas yang berasal dari BAP 2.0 mg/l dan d) Tunas yang berasal dari BAP 5.0 mg/l. a), b), c) dan d) semuanya memiliki akar normal.

PERPUSTAKAAN
FAKULTAS BIOLOGI
ATMA JAYA
ARTA

Gambar 4. II. Pertumbuhan planlet ubi kayu klon Adira-4 umur 4 minggu setelah pengkulturan dalam medium MS yang mengandung IBA 1.0 mg/l. a) Planlet dari MS0, b) Planlet yang berasal dari BAP 1.0 mg/l, c) Planlet yang berasal dari BAP 2.0 mg/l dan d) Planlet yang berasal dari BAP 5.0 mg/

IV.2.2. Jumlah Akar

Hasil uji Anava menunjukkan bahwa konsentrasi BAP pada medium inisiasi tunas berpengaruh nyata terhadap jumlah akar yang terjadi (Tabel Lampiran 19). Tunas-tunas yang berasal dari BAP ketika dipindahkan ke dalam medium IBA 1.0 mg/l secara umum menghasilkan akar dalam jumlah yang cukup dengan morfologi normal.

Tabel 3. Pengaruh BAP Terhadap Jumlah Akar Planlet Ubi Kayu Klon Adira-4 pada Medium Perakaran dengan Penambahan IBA 1.0 mg/l.

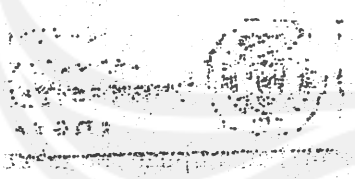
Konsentrasi BAP (mg/l)	Jumlah akar yang terbentuk
1.00	4.82 [a]
2.00	4.93 [a]
5.00	1.90 [b]

Angka yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata menurut uji Duncan ($\alpha = 0.05$).

Data pada Tabel 3 menunjukkan jumlah akar terbanyak diperoleh masing-masing pada planlet yang berasal dari BAP 1.0 mg/l dan BAP 2.0 mg/l setelah dipindahkan ke dalam medium MS dengan penambahan IBA 1.0 mg/l. Jumlah akar yang paling sedikit dijumpai pada planlet yang berasal dari BAP 5.0 mg/l. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi sitokinin yang tinggi pada medium inisiasi tunas cenderung akan menghambat perakaran dan jumlah akar yang terbentuk

IV.3. Aklimatisasi

Planlet dari masing-masing perlakuan yang berhasil berakar kemudian diaklimatisasi. Semua perlakuan yang diuji menunjukkan kemampuan bertahan hidup yang relatif tinggi, yaitu antara 70 % - 80 %. Planlet yang berasal dari medium inisiasi MS_0 dan dibiarkan tumbuh hingga timbul akar secara spontan bahkan mampu bertahan hidup hingga 90 % selama proses aklimatisasi (Tabel Lampiran 21). Planlet yang gagal bertahan hidup umumnya memiliki kenampakan kecil dan kurus serta jumlah akar yang sedikit, sehingga daya tahan tanaman menjadi berkurang ketika



dilakukan proses aklimatisasi. Prosentase planlet yang mampu bertahan hidup selama proses aklimatisasi disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Prosentase Planlet yang Mampu Bertahan Hidup Selama Aklimatisasi

Asal planlet sebelum dipindah ke medium perakaran IBA 1.0 mg/l	Mg/l	% planlet yang hidup
Kontrol	0.00	90.00 [a]
BAP	1.00	78.00 [ab]
	2.00	84.00 [ab]
	5.00	70.00 [b]

Angka yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata menurut uji Duncan ($\alpha = 0.05$).

Menurut Junairiah (1994), keberhasilan aklimatisasi tidak hanya dipengaruhi oleh komposisi medium aklimatisasi yang digunakan, tetapi juga dipengaruhi oleh medium kultur *in vitro* yang digunakan pada waktu inisiasi tunas. Planlet yang berasal dari medium kultur yang berbeda akan menghasilkan kualitas tunas yang berbeda yang menentukan keberhasilan dalam aklimatisasi.

TAKAAN
BIOLOGI
JAYA
KARTA

Gambar 5. Kenampakan planlet yang mampu bertahan hidup selama proses aklimatisasi.

IV.4. Pembentukan Tunas Adventif

IV.4.1. Pembentukan Kalus

Kalus merupakan massa jaringan yang belum terdiferensisasi dan terbentuk sebagai respon dari luka yang terjadi. Kalus biasanya diinduksi sebagai langkah awal dalam berbagai kultur *in vitro* untuk tujuan regenerasi tanaman sebagai ekspresi kemampuan totipotensi suatu sel yang dipengaruhi oleh konsentrasi zat pengatur tumbuh auksin atau sitokinin di dalam medium (Smith, 1992).

Waktu pembentukan kalus masing-masing perlakuan lebih cenderung dipengaruhi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam medium. Hasil uji Anava menunjukkan bahwa 2,4 D dan pikloram yang ditambahkan berpengaruh sangat nyata (Tabel Lampiran 23 dan 25) terhadap waktu pembentukan kalus potongan daun muda ubi kayu klon Adira 4. Pembentukan kalus ini untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Pengaruh 2,4 D dan Pikloram Terhadap Rata-Rata Waktu Pembentukan Kalus dari Potongan Daun Muda Ubi Kayu Klon Adira-4.

Perlakuan	mg/l	Rata-rata waktu pembentukan kalus (hari)
Kontrol	0.00	Tidak tumbuh kalus
2.4 D	2.00	12.43 ^{b}
	4.00	11.38 ^{b}
	6.00	13.87 ^{a}
Pikloram	5.00	8.71 ^{C}
	10.00	11.67 ^{B}
	15.00	12.86 ^{A}

Angka yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata menurut uji Duncan ($\alpha = 0.05$).

Pembentukan kalus tercepat terjadi pada hari ke- 8.71 setelah pengkulturan yang diperoleh dari medium yang mengandung 5.0 mg/l pikloram, sedangkan pembentukan kalus paling lambat terjadi pada hari ke- 13.87 setelah pengkulturan dalam medium yang mengandung 6.0 mg/l 2,4 D. Respon awal pembentukan kalus ubi kayu ini ditunjukkan dengan pembengkakan ibu tulang daun dan bagian tepi daun dari eksplan pada minggu pertama inisiasi. Pembengkakan jaringan ini menurut Evans *et al.* (1981) terjadi karena pengaruh faktor nutrisi dan penambahan zat pengatur tumbuh dalam sel tanaman. Pertumbuhan kalus semakin meningkat dengan bertambahnya umur kultur dan pada hari ke-18 semua kalus telah terbentuk menutupi seluruh permukaan eskplan.

Pembentukan kalus umumnya terjadi pada bagian-bagian eksplan yang mengalami pelukaan terutama yang bersentuhan dengan medium. Kalus yang tumbuh diawali dari ujung ibu tulang daun, kemudian melebar kebagian tepi dan sel-sel pada bagian tepi terus membelah hingga menutupi bagian eksplan secara keseluruhan.

Data pada Tabel 5 juga menunjukkan bahwa 2.4 D memiliki aktifitas tertinggi dalam menginduksi kalus, karena dengan penambahan 2.0 mg/l dan 4.0 mg/l sudah dapat menstimulasi pembentukan kalus meskipun waktu pembentukan kalus tercepat diperoleh dari medium dengan penambahan 5.0 mg/l pikloram. Jenis auksin 2,4 D merupakan zat pengatur tumbuh yang sering digunakan dalam kultur kalus dan memiliki aktifitas yang kuat untuk memacu dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga kultur kalus. Zat pengatur tumbuh 2,4 D dalam kultur

jaringan umumnya aktif pada konsentrasi 10^{-5} - 10^{-7} M (Galston dan Davies, 1970). Respon yang ditunjukkan akan berbeda-beda tergantung dari konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan dan jenis tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan.

Penggunaan pikloram 5.0 mg/l yang ternyata mampu menginduksi kalus tercepat pada kultur ubi kayu ini disebabkan pikloram merupakan zat pengatur tumbuh yang sangat cepat diserap daun dan akar untuk kemudian diangkut keseluruh tanaman serta efektif sebagai pengganti 2,4 D yang diperlukan untuk terjadinya embriogenesis jika penggunaan 2,4 D gagal untuk regenerasi tanaman (Sudarmonowati dan Henshaw, 1996). Penelitian Sudarmonowati dan Henshaw (1996) pada beberapa kultivar ubi kayu menunjukkan bahwa konsentrasi pikloram yang cukup tinggi dibutuhkan untuk menginduksi kalus ubi kayu dibandingkan dengan jenis tanaman lain yang hanya membutuhkan 1 - 2 mg/l untuk induksi kalus dan regenerasi akar.

IV.4.2. Pertumbuhan Kalus

Pertumbuhan kalus semakin meningkat dengan bertambahnya waktu pengamatan yang ditunjukkan dengan bertambahnya ukuran kalus. Salah satu cara untuk mengetahui pertumbuhan kalus adalah dengan mengukur berat basah kalus yang dihasilkan selama periode pertumbuhan tertentu. Menurut Gamborg dan Phillips (1995), pengukuran berat basah kalus merupakan cara yang paling baik untuk

memonitor pertumbuhan kalus sepanjang waktu penelitian tanpa merusak kalus yang ada.

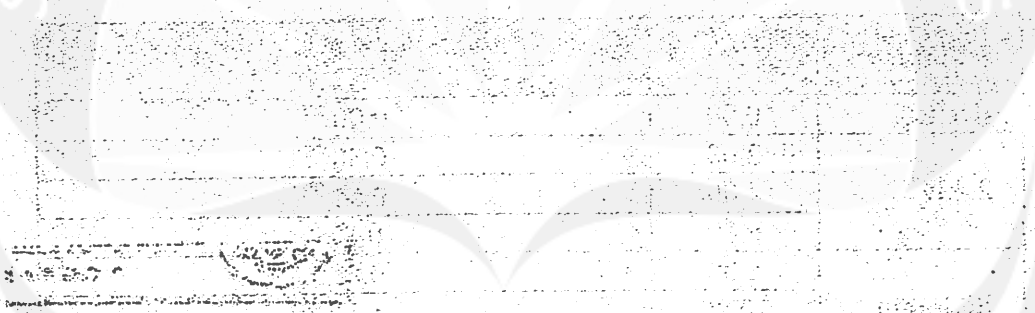
Uji Anava menunjukkan bahwa zat pengatur tumbuh yang ditambahkan berpengaruh sangat nyata terhadap berat basah kalus dari masing-masing perlakuan (Tabel Lampiran 27 dan 29). Berat basah terbesar diperoleh dari kalus yang dikulturkan dalam medium dengan penambahan 10.0 mg/l pikloram. Penambahan 2,4 D pada taraf konsentrasi 2.0 mg/l ternyata menghasilkan berat kalus terendah dari semua perlakuan yang dicobakan.

Tabel 6. Rata-Rata Berat Basah Kalus dari Potongan Daun Muda Ubi Kayu Klon Adira-4 dengan Penambahan 2,4 D dan Pikloram.

Perlakuan	mg/l	Rata-rata berat basah kalus (gr)
Kontrol	0.00	0.00 ^{cB}
2.4 D	2.00	0.38 ^{bc}
	4.00	0.54 ^{ab}
	6.00	0.87 ^{a}
Pikloram	5.00	0.85 ^{A}
	10.00	1.14 ^{A}
	15.00	0.77 ^{A}

Angka yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata menurut uji Duncan ($\alpha = 0.05$).

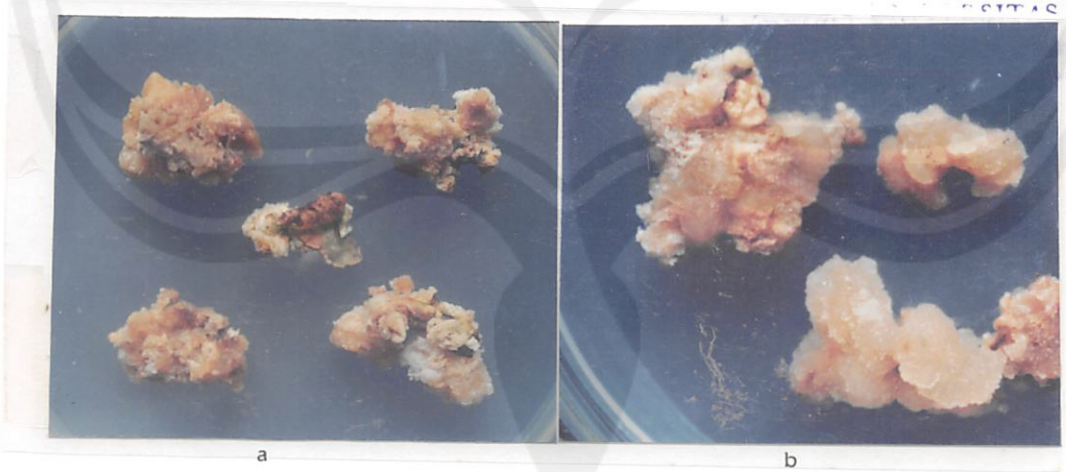
Pengamatan visual terhadap kalus menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang berarti antara warna kalus yang dihasilkan pada perlakuan 2,4 D dengan pikloram (Gambar 6). Kalus yang dihasilkan pada penelitian ini umumnya berstruktur remah dan berwarna putih kekuningan. Penambahan pikloram cenderung



menghasilkan kalus yang berair dengan permukaan licin serta warna kalus agak coklat, sedangkan 2,4 D menghasilkan kalus dengan warna lebih terang dan agak keras. Hal ini sesuai dengan pernyataan Dodds dan Robert (1982) bahwa selain jenis eksplan tekstur dan warna kalus juga dipengaruhi oleh macam zat pengatur tumbuh yang digunakan.

Kalus yang berumur lebih dari 4 minggu dalam medium yang mengandung pikloram 10.0 mg/lt berubah warna menjadi coklat dan semakin tinggi konsentrasi pikloram (15.0 mg/lt), warna kalus yang dihasilkan menjadi lebih coklat. Evans *et al.* (1981) menyatakan bahwa kalus akan semakin friabel dengan meningkatnya konsentrasi auksin atau dengan menurunnya konsentrasi sitokinin. Hal serupa juga dilaporkan pada kultur kalus tanaman nilam dan gladiol yang menjadi coklat dan ukurannya menjadi semakin kecil dengan meningkatnya konsentrasi pikloram yang diberikan (Sukarni, 1998).

PERPUSTAKAAN
FAKULTAS BIOLOGI
UNIVERSITAS ATMA JAYA
JAKARTA



Gambar 6. Pertumbuhan kalus ubi kayu klon Adira-4 dalam medium MS yang mengandung a) 4.0 mg/l 2,4 D dan b) 5.0 mg/l pikloram. a), b) masing-masing berumur 4 minggu setelah pengkulturan.

Perubahan warna kalus menjadi coklat dalam kasus ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu kemungkinan pertama adalah akibat dari pemberian auksin dalam kadar tinggi yang dapat bersifat toksik bagi jaringan tanaman. Pikloram dan 2,4 D merupakan jenis auksin yang aktivitasnya sangat tinggi dalam menghambat pembentukan klorofil pada kalus (George dan Sherrington, 1984). Kemungkinan kedua adanya akumulasi senyawa fenol dalam vakuola tanaman akibat pemberian auksin pada konsentrasi tinggi yang akan menghambat pembelahan sel. Senyawa fenol ini akan teroksidasi akibat adanya cahaya dan aktivitas enzim polifenol oksidase, sehingga menghasilkan quinon yang mengakibatkan warna coklat pada kalus (George dan Sherrington, 1984).

IV.4.3. Regenerasi Kalus Ubi Kayu

Kalus ubi kayu yang dihasilkan dalam penelitian ini ternyata gagal beregenerasi menghasilkan embrio somatik maupun tunas adventif setelah dipindahkan dalam medium dengan penambahan kinetin. Kalus yang berasal dari 2,4 D hanya menghasilkan pertumbuhan akar, sedangkan kalus yang berasal dari pikloram tidak menunjukkan respon. Kalus hanya berkembang dan bertambah ukuran saja.

Penelitian-penelitian kultur *in vitro* sebelumnya menunjukkan bahwa embriogenesis pada ubi kayu (hampir 100%) sangat tergantung pada genotip tanaman dan tiap kultivar menunjukkan respon yang berbeda. Menurut Pierik (1987) ada dua faktor yang mempengaruhi regenerasi tanaman dalam kultur *in vitro*, yaitu

faktor lingkungan dan faktor internal yang meliputi genotip tanaman, umur tanaman dan jaringan, asal jaringan, tingkat perkembangan serta fisiologi sel.

Konsentrasi kinetin yang ditambahkan dan 2,4 D serta pikloram yang digunakan pada medium inisiasi kalus berpengaruh nyata terhadap regenerasi kalus dalam membentuk akar sesuai uji Anava yang dilakukan (Tabel Lampiran 31). Pertumbuhan akar umumnya terjadi pada konsentrasi kinetin yang rendah dan hanya beberapa perlakuan saja yang mampu memproduksi akar dalam taraf konsentrasi kinetin yang lebih tinggi. Pengaruh kinetin terhadap waktu pembentukan akar pada kalus disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Pengaruh Kinetin Terhadap Rata-Rata Waktu Pembentukan Akar pada Kalus Ubi Kayu Klon Adira-4

Perlakuan		Rata-rata waktu inisiasi akar (hari ke-)
2.4 D (mg/l)	Kinetin (mg/l)	
2.00	1.00	9.92 [b]
	5.00	20.66 [ab]
	10.00	23.00 [a]
4.00	1.00	11.02 [ab]
	5.00	11.00 [ab]
	10.00	Tidak tumbuh akar
6.00	1.00	22.00 [ab]
	5.00	Tidak tumbuh akar
	10.00	Tidak tumbuh akar

Angka yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata menurut uji Duncan ($\alpha = 0.05$).

Data di atas menunjukkan bahwa kalus yang berasal dari 2,4 D 2.0 mg/l menghasilkan inisiasi akar tercepat setelah dipindahkan ke dalam medium regenerasi

kinetin 1.0 mg/l. Waktu inisiasi pembentukan akar dari kalus paling lambat dijumpai pada kalus yang berasal dari 2.0 mg/l 2,4 D setelah dipindahkan dalam kinetin 10.0 mg/l.

Akar yang dihasilkan dari kalus ini umumnya pendek-pendek dan gemuk, berwarna putih kekuningan dengan ujung akar berwarna hijau muda. Akar umumnya muncul dari bagian kalus yang bersentuhan dengan medium, bahkan pada beberapa perlakuan akar tampak mucul dari semua bagian kalus. Akar yang terjadi semakin berkembang dengan bertambahnya umur kultur. Kalus yang berasal dari 2.0 mg/l 2,4 D yang dipindah ke dalam medium kinetin 1.0 mg/l menghasilkan akar yang panjang dan banyak hingga menutupi bagian dasar medium.

PERPUSTAKAAN
FAKULTAS BIOLOGI
TMA JAYA
RTA

a b

Gambar 7. Akar yang terbentuk dari kalus ubi kayu klon Adira-4 setelah dipindahkan pada medium regenerasi kalus dengan penambahan kinetin. a) akar yang terbentuk panjang dan hampir menutupi kalus yang berasal dari 2.0 mg/l 2,4 D setelah dipindahkan ke medium 1.0 mg/l kinetin; b). kalus yang berasal dari pikloram dan hanya tumbuh dan bertambah ukuran dalam medium regenerasi dengan penambahan kinetin.

Akar yang terbentuk dari regenerasi kalus ini kemungkinan disebabkan lebih tingginya rasio auksin dibandingkan kinetin pada medium sebagai akibat dari tingginya konsentrasi auksin yang digunakan dalam medium induksi kalus. Konsentrasi auksin yang tinggi pada medium inisiasi kalus akan mengakibatkan melekatnya zat pengatur tumbuh ini pada membran sel yang dapat mengubah potensial membran dengan cepat, mengubah konfigurasi sebagian penyusun membran plasma dan mengakibatkan keluar masuknya zat-zat yang terlarut. Hal ini akan mengakibatkan terjadinya serangkaian perubahan secara perlahan-lahan dan pada akhirnya akan mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis sel (Prawiranata *et al.*, 1989.

Menurut Galston dan Davies (1970), perbandingan auksin dan sitokinin yang relatif tinggi akan menginduksi pembentukan akar pada kalus tembakau dan sebaliknya perbandingan yang rendah pada hormon-hormon tersebut merangsang produksi tunas. Hal ini juga ditegaskan oleh Bhojwani dan Razdan (1983) bahwa auksin selain berfungsi mendorong pembelahan kalus dan pembentukan kalus, auksin juga berperan dalam proses diferensiasi kearah pembentukan akar.

Tabel 8. Rata-rata Jumlah Akar yang Terbentuk dari Kalus Ubi Kayu Klon Adira-4 Setelah Dipindahkan ke dalam Medium dengan Penambahan Kinetin.

Perlakuan		Rata-rata jumlah akar yang terbentuk
2,4 D (mg/l)	Kinetin (mg/l)	
2.00	1.00	5.24 [b]
	5.00	1.00 [c]
	10.00	1.00 [c]
4.00	1.00	12.72 [a]
	5.00	1.90 [c]
	10.00	0.00 [c]
6.00	1.00	7.14 [b]
	5.00	0.00 [c]
	10.00	0.00 [c]

Angka yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata menurut uji Duncan (α =0.05)

Data tentang jumlah akar memperjelas bahwa konsentrasi kinetin 1.0 mg/l yang ditambahkan mampu menghasilkan jumlah akar terbesar dari masing-masing kalus ubi kayu. Uji Anava menunjukkan konsentrasi kinetin yang ditambahkan berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah akar yang dihasilkan (Tabel Lampiran 33). Peningkatan konsentrasi kinetin mengakibatkan jumlah akar yang terbentuk berkurang, bahkan kalus pada beberapa perlakuan tidak menunjukkan respon.

Dodds dan Roberts (1982) juga menyatakan bahwa inisiasi akar merupakan tipe organogenesis yang paling sering dijumpai dalam kultur *in vitro*, meskipun fenomena ini umumnya muncul pada tanaman yang dikembangkan dengan memotong bagian tanaman untuk memproduksi akar dalam sistem hortikultura

normal. Faktor-faktor yang mempengaruhi inisiasi akar pada kalus antara lain auksin, karbohidrat dan fotoperiode.

Diferensiasi akar juga ditemukan pada kultur tanaman kedelai dengan penambahan 2,4 D pada medium regenerasi. Intensitas pertumbuhan akar bahkan sangat tinggi sehingga hampir menutupi permukaan kalus (Andrini, 1993).

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian pada beberapa kultivar ubi kayu asal Afrika yang berhasil membentuk embrio somatik dengan penambahan 2,4 D. Penambahan konsentrasi 2.0 mg/l, 4.0 mg/l dan 6.0 mg/l 2,4 D ternyata dapat menghasilkan embrio somatik hingga 60 % (Sudarmonowati, 1988). Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jenis tanaman ubi kayu yang digunakan sebagai sumber eksplan.

Regenerasi akar umumnya lebih mudah terjadi dalam kultur *in vitro*, meskipun regenerasi akar ini bukanlah tujuan akhir dari proses-proses tersebut. Menurut Delita (1994), akar yang terbentuk dari regenerasi ini menunjukkan bahwa dalam kalus ubi kayu terdapat sel-sel meristematik. hanya saja kemungkinan komposisi medium yang digunakan belum tepat untuk mengarahkan sel-sel kalus membentuk tunas batang atau embrio. Munculnya akar dalam kasus ini dapat disebabkan oleh komposisi medium yang lebih menguntungkan untuk pertumbuhan akar daripada tunas batang atau embrio.