

## Induksi dan Kultur Suspensi *Friable Embryogenic Callus* Ubi Kayu Menggunakan Kultivar Lokal dan Jenis Auksin yang Berbeda

### *Induction and Suspension Culture of Cassava Friable Embryogenic Callus Using Local Cultivar and Different Types of Auxins*

Endah Cahyani Simamora<sup>✉</sup>, Slameto, Didik Pudji Restanto

Master of Agronomy Study Program, Faculty of Agriculture, University of Jember, Jember, Indonesia

<sup>✉</sup>Corresponding author email: cahyanisimamora@gmail.com

**Article history:** submitted: September 18, 2023; accepted: March 22, 2024; available online: March 30, 2024

**Abstract.** *Cassava (Manihot esculenta)* has become a prioritized commodity and easy to cultivate. Generative propagation is challenging thus induction of *Friable Embryogenic Callus (FEC)* needs to be conducted. However, there are several challenges in generating embryogenic callus, such as the genotypes and the exploration of methods and protocols for FEC induction from various cassava cultivars. The study started from *in vitro* culture multiplication of cassava plants, callus induction from swollen structures formed by the development of axillary buds, followed by FEC induction from several cultivars, namely Kaspro (V1), Ketan (V2), and Kuning (V3) on GD medium followed by proliferation in suspension culture with the application of auxin was picloram at 12 mg.L<sup>-1</sup> (P1), 20 mg.L<sup>-1</sup> (P2), and 2,4-D 12 mg.L<sup>-1</sup> (P3). The results showed the highest FEC frequency is Kaspro at 51,26 %, and FEC scores of 4 indicated a high ability to form FEC. The highest increase in fresh weight was observed in P1 at 1.19 grams, and V2P1 at 0.64 grams. The highest suspension volume was found in treatment VIP2, while the highest cell viability was observed in V3P2.

**Keywords:** *cassava; Friable Embryogenic Callus; picloram; suspension culture*

**Abstrak.** Tanaman ubi kayu (*Manihot Esculenta*) merupakan komoditas yang diprioritaskan serta mudah untuk dibudidayakan. Perakitan tanaman ubi kayu memiliki kesulitan dikembangkan secara generatif sehingga dibutuhkan pendekatan kultur jaringan melalui induksi *Friable Embryogenic Callus*. Beberapa kendala dalam menghasilkan kalus yang embriogenik yaitu genotip serta eksplorasi dari metode dan protokol induksi FEC dari beberapa varietas ubi kayu masih terbatas. Penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu induksi FEC pada media GD dengan perlakuan kultivar yang berbeda yaitu Kaspro (V1), Ketan (V2), Kuning (V3) pada media GD, dilanjutkan dengan proliferasi pada kultur suspensi dengan perlakuan jenis auksin yaitu picloram 12 mg.L<sup>-1</sup> (P1), 20 mg.L<sup>-1</sup> (P2), dan 2,4-D 12 mg.L<sup>-1</sup> (P3) dan perbedaan kultivar. Hasil penelitian yang diperoleh yaitu respon kalus dari kultivar lokal menunjukkan rerata frekuensi dan skor FEC tertinggi terdapat pada Kultivar Kaspro sebesar 51,26% dan skor 4 sebagai kategori kemampuan membentuk FEC tinggi. Pertambahan berat segar tertinggi terdapat pada perlakuan P1 yaitu 1,19 gram serta perlakuan V2P1 yaitu 0,64 gram. Volume suspensi tertinggi terdapat pada perlakuan VIP2 serta viabilitas sel tertinggi terdapat pada perlakuan V3P2.

**Kata kunci:** *Friable Embryogenic Callus; kultur suspensi; picloram; ubi kayu*

## PENDAHULUAN

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 sehingga dibutuhkan usaha peningkatan tanaman ubi kayu dengan produktivitas yang tinggi dan kejelasan varietas melalui pemenuhan kebutuhan benih varietas unggul. 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 (Wen et al., 2020).

Salah satu teknologi perakitan tanaman secara vegetatif menggunakan sel somatik adalah hibridisasi somatik atau transformasi genetik. Teknologi tersebut membutuhkan protoplas sehingga protoplas dapat diisolasi melalui FEC (*Friable Embryogenic Callus*) yang memiliki karakteristik kuning pucat, bertekstur remah, terdiri atas sejumlah unit sel embriogenik. 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 suspensi. Metode suspensi telah banyak dimanfaatkan untuk propagasi tanaman, produksi metabolit sekunder, menyediakan propagul untuk transformasi genetik dan isolasi protoplas (Liu et al., 2022 ; Wen et al., 2020). 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 di atas *orbital shaker* sehingga mampu memisahkan agregat sel, mengatasi distribusi bentuk sel agar lebih seragam serta menyediakan oksigen dan nutrisi dalam media dapat merata dan homogeni untuk menjaga respirasi sel tetap optimal (Kong et al., 2020).

Berdasarkan metode yang dikembangkan oleh Taylor et al. (1996) bahwa jenis auksin yang dapat menginduksi FEC adalah *picloram* sehingga untuk meningkatkan proliferasi sel di media suspensi ditambahkan *picloram* 12 mg.L<sup>-1</sup>. Kemudian menurut Lentz et al. (2018) FEC yang dikulturkan pada media dengan penambahan *picloram* 20 mg.L<sup>-1</sup> dapat meningkatkan proliferasi pada kultivar ubi kayu asal Brazil. Beberapa kultivar juga mampu menginduksi kalus sampai terbentuk somatik embrio dengan pemberian 2,4-D hingga 40% (Slameto et al., 2023). Selain faktor zat pengatur tumbuh yang mampu menginduksi FEC, terdapat beberapa kendala dalam menghasilkan kalus yang embriogenik yaitu genotip dari tanaman.

Varietas lokal ubi kayu di Indonesia memiliki karakter yang beragam berdasarkan genotip tanaman ubi kayu tersebut sehingga pendekatan kultur in vitro dalam perakitan tanaman ubi kayu membutuhkan pemahaman mengenai kemampuan menghasilkan kalus embriogenik sehingga metode yang dilakukan diharapkan dapat menghasilkan ubi kayu yang memiliki karakter cita rasa yang baik sehingga bisa ditanam oleh petani. Menurut Diniyah et al. (2018) ubi kayu dibedakan berdasarkan kadar HCN (*Hydrogen cyanide*) umbi yaitu umbi manis

dengan kadar HCN rendah yaitu <100 mg.kg<sup>-1</sup> serta umbi pahit yaitu kadar HCN >100 mg.kg<sup>-1</sup>. Sifat-sifat unggul yang diharapkan dapat diperoleh dari penggabungan karakter dari varietas ubi kayu seperti Varietas Ketan yang termasuk umbi manis dan ubi kayu varietas lokal Kuning yang memiliki kadar beta karoten yang tinggi dan rasa manis sehingga sangat berpotensi untuk dikembangkan, tetapi hasil produksi yang diperoleh belum efektif (Supatmi et al., 2018) sedangkan terdapat varietas lokal ubi kayu Kaspro yang termasuk umbi pahit dan memiliki produktivitas tinggi yaitu 35 ton per hektar dibanding varietas jenis umbi manis yang produktivitasnya sekitar 25 ton per hektar (Pranowo, 2021). Hal tersebut sesuai dengan pendapat Rossin & Rey (2011) bahwa terdapat perbedaan signifikan dari kemampuan setiap kultivar ubi kayu untuk menghasilkan kalus yang embriogenik serta 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 memengaruhi tingkat proliferasi sel sehingga dibutuhkan peningkatan proliferasi sel agar didapatkan sel yang *viable*. Induksi dan kultur suspensi FEC pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan eksplan dari beberapa kultivar lokal tanaman ubi kayu sehingga tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui respon induksi kalus dari beberapa kultivar lokal pada media induksi FEC dan tingkat proliferasi kalus beberapa kultivar lokal pada perbedaan jenis auksin pada media suspensi.

## METODE

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan November 2022 sampai Juni 2023 di Laboratorium Ekofisiologi dan Kultur Jaringan Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember. Alat dan bahan digunakan dalam pelaksanaan penelitian adalah botol, pinset, gunting, pisau scalpel, pH-Meter, *autoclave*, *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), bunsen, petridish, erlenmeyer, *rotary shaker*, mikroskop

cahaya merk Leica EZ4HD dan OptiLab, eksplan tanaman in vitro ubi kayu kultivar lokal sesuai perlakuan berupa *axillary bud* (AB), media Murashige and Skoog (MS), media Gresshoff and Doy (GD), *Benzylaminopurine* (BAP), *Picloram*, *Dichlorophenoxy acetic acid* (2,4-D), *Naphtalene Acetic Acid* (NAA).

Penelitian disusun dengan Rancangan Acak Lengkap. Sebelum dilakukan kultur suspensi terlebih dahulu dilakukan evaluasi kemampuan tiap kultivar lokal untuk membentuk FEC melalui perlakuan jenis kultivar yaitu Kaspro (V1), Ketan (V2) dan Kuning (V3) diulang sebanyak 6 kali. Kemudian rancangan percobaan kultur suspensi dilakukan dengan rancangan acak lengkap faktorial dengan dua faktor diulang sebanyak tiga kali. Dua faktor tersebut yaitu kultivar tanaman ubi kayu terdiri atas tiga taraf yaitu Kultivar Kaspro, Kuning, Ketan dan jenis auksin pada kultur suspensi terdiri atas tiga taraf yaitu *Picloram* 12 mg.L<sup>-1</sup> (P1), *Picloram* 20 mg.L<sup>-1</sup> (P2) dan 2,4-D mg.L<sup>-1</sup> (P3) sehingga diperoleh 9 kombinasi perlakuan yaitu V1P1, V2P1, V3P1, V1P2, V2P2, V3P2, V1P3, V2P3, V3P3.

Tahap awal dari penelitian yaitu induksi *swollen* dari kultur in vitro pada media *Cassava Auxiliary Medium* (CAM) yaitu pada MS dengan penambahan BAP 10 mg.L<sup>-1</sup>, setelah *swollen* tumbuh kemudian dipindahkan ke media CIM (*cassava induction medium*) yaitu pada media MS dengan penambahan *picloram* 12 mg.L<sup>-1</sup>. Kalus yang terbentuk kemudian diinduksi pada media GD dengan penambahan *picloram* 12 mg.L<sup>-1</sup> untuk induksi FEC, FEC yang telah terbentuk diuji kemampuan regenerasinya pada media regenerasi dengan tiga tahapan yaitu pematangan embrio di media MS dengan penambahan NAA 1 mg.L<sup>-1</sup> selama 3 minggu kemudian dipindahkan pada media induksi tunas yaitu MS dengan penambahan BAP 0,1 mg.L<sup>-1</sup> kemudian pada media pemanjangan tunas yaitu MS dengan penambahan BAP 0,4 mg.L<sup>-1</sup>. Setelah diketahui kemampuan regenerasi tiap varietas, kemudian FEC dipindahkan pada

media suspensi untuk proliferasi sel yaitu pada media GD dengan penambahan auksin sesuai perlakuan.

Variabel pengamatan yang diamati pada induksi FEC adalah frekuensi FEC (%), skor pembentukan FEC mulai dari tidak terbentuk FEC = 0, persentase kalus ≤10% = 1, persentase kalus 11 – 25% = 2, persentase 26 – 50% = 3, 51 – 75 % = 4, persentase lebih dari 75% = 5. Kemudian pada kultur suspensi yaitu volume sel (ml) dengan metode CVS (*cell after sedimentation*), berat segar kalus (gram) dikalkulasi sebagai nilai *growth index* (GI), viabilitas sel dengan metode *haemocytometer* dan histologi kalus. Analisis data dilakukan dengan analisis sidik ragam atau *analysis of variance* (ANOVA) dan data yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) taraf 0,05.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengaruh Jenis Kultivar terhadap FEC

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 Ketan yang membentuk kalus sebesar 7,87%. 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 skor rata-rata terendah yaitu 0,17 yang berbeda dari dua varietas lainnya (Tabel 1).

Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa kemampuan kalus membentuk FEC akan meningkatkan nilai skor varietas dalam membentuk FEC. Hal tersebut menunjukkan bahwa ZPT *picloram* mampu menginduksi kalus sebab telah terjadi sinergi antara genotip dan kerja *picloram*. Hal tersebut telah dijelaskan sebelumnya bahwa frekuensi pembentukan kalus dari eksplan mengindikasikan terjadi efek antara interaksi genotip dan auksin yang diaplikasikan (Ahmad et al., 2021).

**Tabel 1.** Pengaruh jenis varietas terhadap frekuensi FEC dan skor FEC

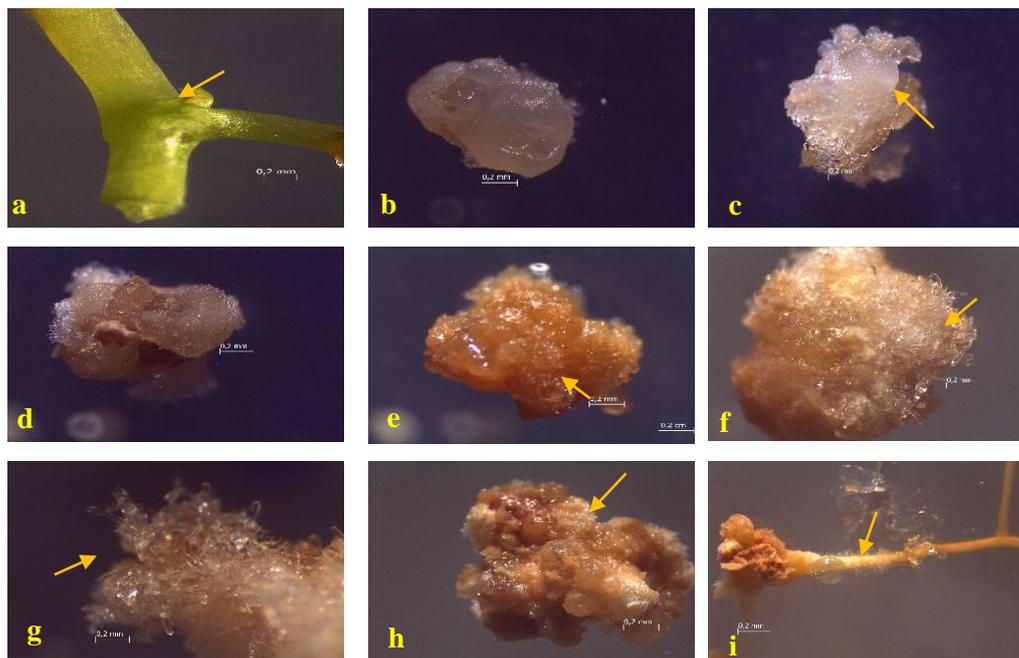
Perlakuan	Frekuensi FEC (%)	Skor FEC
Ketan	7,87±9,34 <sup>a</sup>	0,17±0,4 <sup>a</sup>
Kuning	43,58±27 <sup>a</sup>	2±2,45 <sup>b</sup>
Kaspro	51,26±7,68 <sup>a</sup>	4±0,63 <sup>b</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti huruf (notasi) yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) taraf 0,05

### Tahapan Regenerasi FEC

Kalus yang diinduksi pada media CIM kemudian dipindahkan pada media GD untuk induksi kalus sekunder (Gambar 1-d). Media GD memungkinkan untuk meningkatkan jumlah sel embriogenik dengan penambahan auksin dengan konsentrasi tinggi. Media GD sebelumnya telah menunjukkan keberhasilan pembentukan FEC pada genotip asal Indonesia yaitu Adira 4 (Raemakers et al., 2006). Berdasarkan Gambar 1-e FEC dapat diinduksi pada media GD selanjutnya dapat

berkembang ke fase torpedo (Gambar 1 f-g). Kemudian kalus embriogenik (Gambar 1-h) pada media GD dipindahkan pada media NAA 1 mg.L<sup>-1</sup> selanjutnya kalus kultivar kaspro menunjukkan potensi regenerasi kalus ditandai dengan pertumbuhan akar pada kalus embriogenik (Gambar 1.i). Pembentukan akar dimulai dengan terjadinya metabolisme cadangan nutrisi yaitu karbohidrat sehingga menghasilkan energi dan memicu terjadinya pembentukan jaringan baru (Pratiwi et al., 2023).



**Gambar 1.** Tahapan regenerasi pada Kultivar Kaspro. Induksi *swollen* dari *auxillary bud* 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 pada media NAA (i).

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 (Gambar 2). Kemampuan Kultivar Ketan untuk membentuk FEC rendah sehingga skor pembentukan FEC dikategorikan skor rendah atau varietas rekalsitran. Berdasarkan penelitian (Mongomake et al., 2015) diketahui bahwa beberapa kultivar kalus rekalsitran mengalami kegagalan menyinkronkan interaksi antara genotip dan fitohormon meskipun kultivar rekalsitran mampu membentuk struktur kalus proembriogenik atau globular, fase kalus tersebut sulit untuk berkembang menjadi fase torpedo atau embrio. Kultivar Kuning diketahui memiliki potensi untuk regenerasi melalui pembentukan calon tunas pada media NAA pada 20 HST. *Swollen* dapat tumbuh menjadi kalus (Gambar 2 c-d). Kemudian dipindahkan pada media GD sehingga muncul kalus primer dan terbentuk fase globular (Gambar 2 e). Kemudian kalus disubkultur pada media GD dan membentuk fase *heart* dan torpedo (Gambar 2f). Kultivar Kuning diketahui memiliki potensi untuk regenerasi melalui pembentukan calon tunas di media NAA pada 20 HST (hari setelah tanam). *Swollen* dapat tumbuh menjadi kalus (Gambar 2 c-d). Kemudian dipindahkan pada media GD sehingga muncul kalus primer dan terbentuk fase globular (Gambar 2e). Kemudian kalus disubkultur pada media GD sehingga membentuk fase *heart* dan torpedo (Gambar 2f). Ketan diketahui memiliki kemampuan regenerasi rendah sebab kalus yang diinduksi pada media GD tidak menunjukkan adanya pertumbuhan dan perkembangan kalus sekunder. Kemudian ketika disub-kultur pada media NAA tetap tidak menunjukkan respon akar atau tunas (Gambar 3).

### Volume Media Suspensi

Volume suspensi diamati setiap interval 7 hari sekali sampai dengan 28 HST. Volume yang diamati adalah volume endapan dari kalus. Berdasarkan Gambar 4 dapat diketahui bahwa volume akhir tertinggi terdapat pada perlakuan V1P2 dengan rerata volume secara

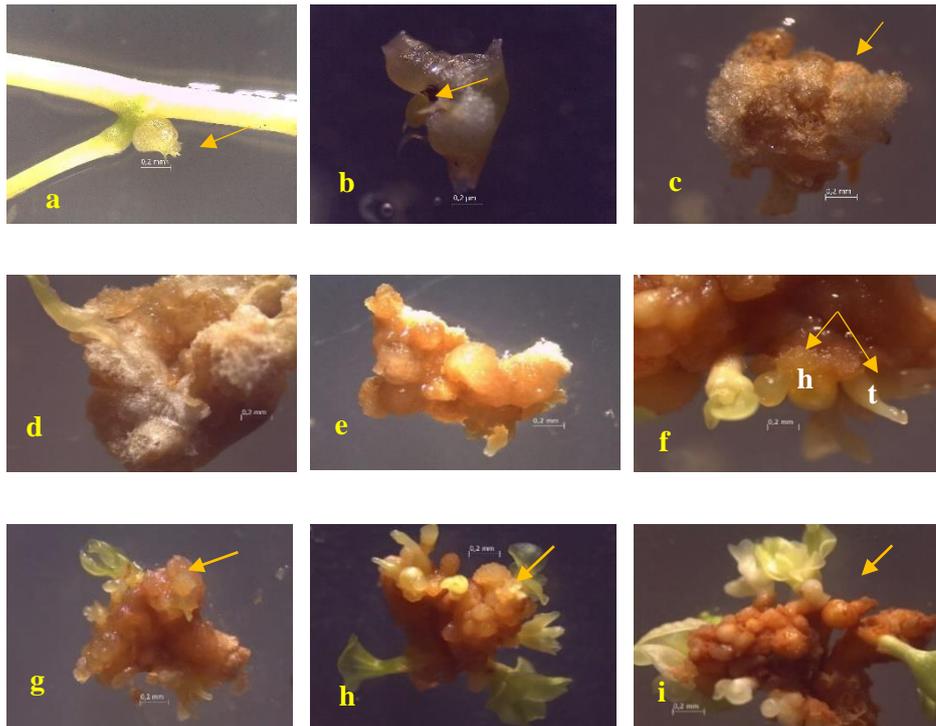
berurutan mulai dari 1,33 ml pada 7 HST sampai 21 HST dan mengalami kenaikan volume menjadi 1,5 ml pada 28 HST. Kemudian volume terendah pada hari terakhir pengamatan perlakuan V2P3 menunjukkan nilai rata-rata volume terendah yaitu 0,6 ml. V1P2 menunjukkan kenaikan volume pada hari ke 28 HST sedangkan perlakuan V3P1, V1P1, V2P1, V3P2, V2P2 dan V2P3 menunjukkan kenaikan volume pada 14 HST. Kemudian tidak terjadi kenaikan volume pada V1P3. Perlakuan P1 dapat meningkatkan volume kalus pada 14 HST dan 21 HST pada Kultivar Kuning sedangkan pada kenaikan volume hanya terjadi pada 14 HST dan 21 HST pada Ketan dan Kaspro (Gambar 4).

Perlakuan P2 yang dikombinasikan dengan kultivar menunjukkan bahwa kenaikan volume terjadi pada 14 HST dan 21 HST pada Kuning dan Ketan sedangkan pada Kaspro dikombinasikan dengan P2 menunjukkan kenaikan volume pada 28 HST. Kemudian perlakuan P3 yang dikombinasikan dengan kultivar pada Gambar 4, menunjukkan hasil bahwa kenaikan volume terjadi pada Kultivar Kuning dan Ketan pada 14 HST sedangkan Kaspro tidak mengalami kenaikan volume selama kultur suspensi. Pertumbuhan kultur suspensi dapat dilihat dari volume kalus pada kultur suspensi yang meningkat.

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 et al., 2019). Fase *lag* pada kultur suspensi yaitu pada 7 hari setelah tanam merupakan fase awal dari pertumbuhan kalus sehingga belum terdapat kenaikan volume (Gambar 4). Kemudian pada pengamatan hari ke-14 dan 21 kultur suspensi mengalami kenaikan volume sehingga fase tersebut merupakan fase eksponensial. Pengamatan hari ke 28 menunjukkan bahwa volume kalus tidak mengalami kenaikan kecuali pada perlakuan V3P1 dan V3P2. 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 eksplan FEC bahwa FEC harus

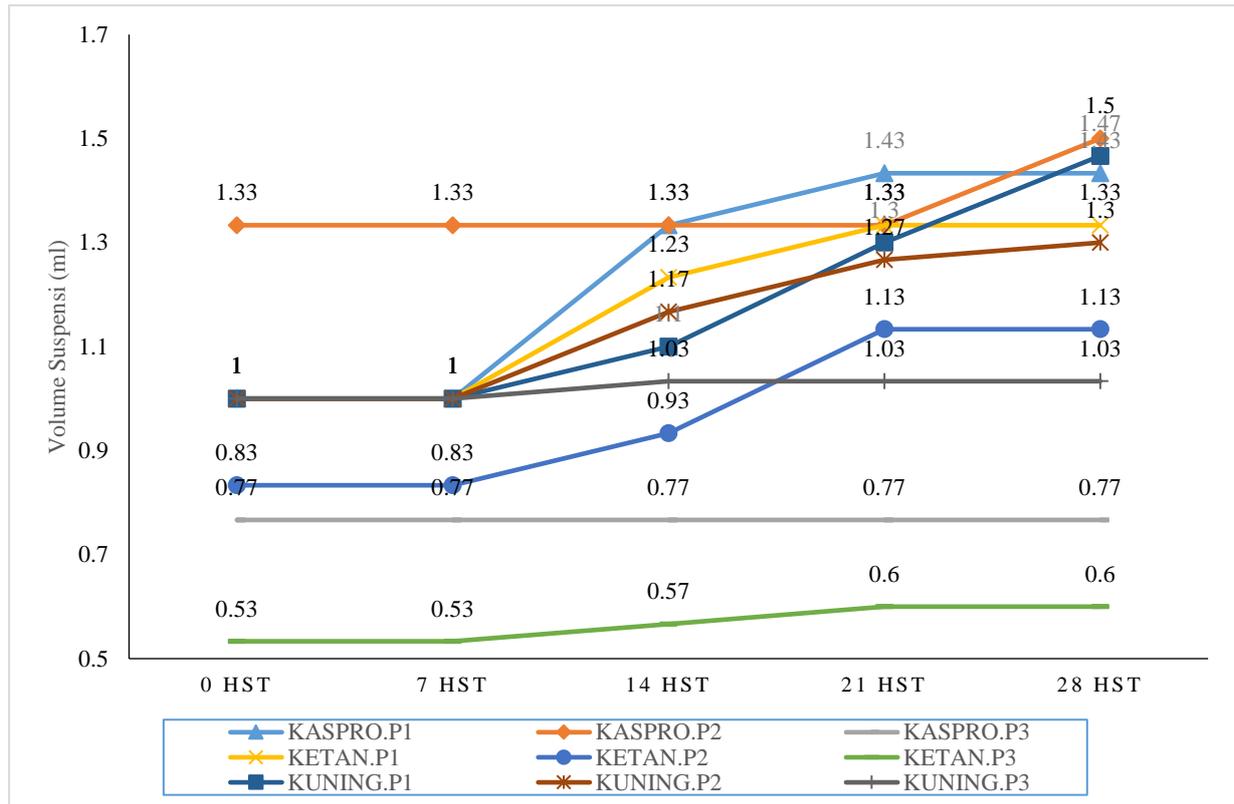
dipindahkan ke media pematangan kalus pada 21 HST (P. Zhang & Gruissem, 2004). Umumnya beberapa kultur suspensi dapat bertahan pada 28 HST seperti pada tanaman *Angelica sinensis* yang diketahui bahwa kultur suspensi kalus tanaman tersebut memasuki masa *stationary* di 28 HST (Y. H. Zhang et al., 2019).



**Gambar 2.** Tahapan regenerasi FEC pada Kultivar Kuning. Induksi *swollen* dari *axillary bud* 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 globular 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<sup>-1</sup> (h) regenerasi kalus embrio somatik pada media BAP 0,4 mg. L<sup>-1</sup> (i)



**Gambar 3.** Tahapan regenerasi pada varietas ketan. Induksi *swollen* dari *axillary bud* pada media CAM (a), *swollen* 4 HST pada media CIM (b), kalus fase globular pada media GD (c)



**Gambar 4.** Kenaikan volume kalus pada kultur suspensi

### Berat Segar Kalus

Peningkatan berat segar kalus dikalkulasikan menjadi nilai *growth index* yaitu peningkatan berat segar kalus pada media kultur suspensi. 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 segar kalus ditimbang hingga didapatkan W1 (berat segar kalus di akhir pengamatan). Kemudian dihitung selisih antara berat akhir dan berat awal serta dibagi berat awal sehingga didapatkan nilai *growth index*.

Nilai rerata tertinggi dari *growth index* adalah perlakuan V2P1 dengan nilai 0,64 gram tetapi tidak berbeda dari perlakuan lainnya kemudian nilai rerata terendah terdapat pada perlakuan V3P3, V2P3, V3P1. Nilai terendah tersebut menunjukkan tidak terjadinya peningkatan *growth index* (Tabel 2). Peningkatan biomassa pada suspensi dapat dipengaruhi oleh pembelahan dan perkembangan sel ditinjau dari proliferasi. Hal tersebut disebabkan oleh jenis dan konsentrasi auksin sehingga auksin menjadi

penentu dalam meningkatkan proliferasi sel pada media suspensi (Tripathi et al., 2021).

Peningkatan proliferasi kalus embriogenik pada tanaman ubi kayu dapat dipicu oleh jenis auksin yaitu picloram 12 mg.L<sup>-1</sup> (Lentz et al. (2018). Penggunaan media suspensi dengan penambahan auksin akan meningkatkan kemungkinan terbentuknya kalus embriogenik sebab penambahan auksin akan mempengaruhi perkembangan kalus menuju embriogenesis dan fase maturase untuk memungkinkan terjadinya regenerasi. Apabila *growth index* stagnan dapat dimungkinkan akibat terjadinya penurunan laju biomassa kalus akibat dari pembelahan sel yang kurang optimal sehingga fase perkembangan kalus selanjutnya tidak optimal (Silvina et al., 2022). 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 et al., 2021).

**Tabel 2.** Pengaruh kultivar dan jenis auksin terhadap berat segar

Perlakuan	Berat Segar (gram)
V3P3	0±0a
V2P3	0±0a
V3P1	0±0a
V1P2	0,19±0,02ab
V2P2	0,2±3,40abc
V3P3	0,39±0,02bcd
V3P2	0,39±0,08bcd
V1P1	0,55±0,09cd
V2P1	0,64±0,07d

Keterangan: Angka yang diikuti huruf (notasi) yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) taraf 0,05.

**Tabel 3.** Pengaruh jenis auksin terhadap berat segar kalus (*Growth Index*)

Perlakuan	<i>Growth index</i> (gram)
P1	1,19±1,04ab
P2	0,77±0,34a
P3	0,39±0,67a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf (notasi) yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) taraf 0,05.

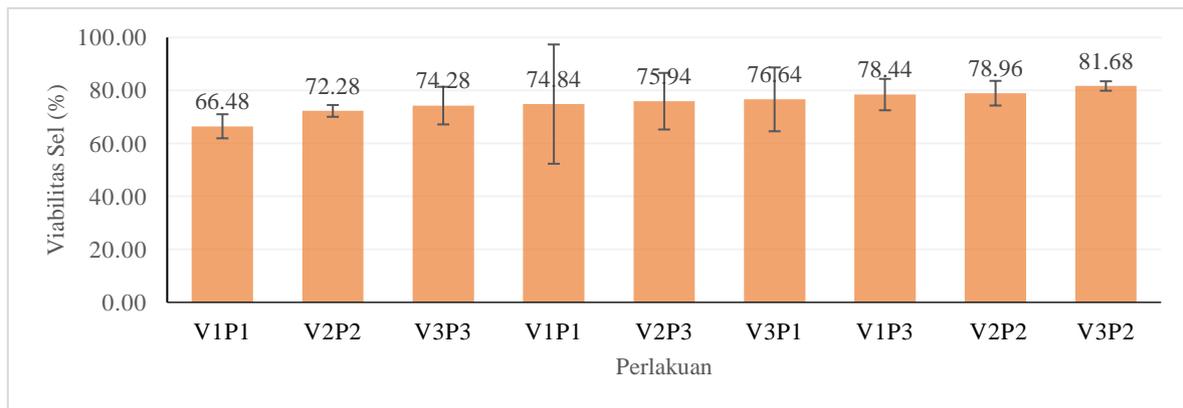
Diketahui perlakuan jenis auksin P1 menunjukkan rata-rata perlakuan tertinggi dibanding P2 dan P3 dan terdapat perbedaan antar perlakuan (Tabel 3). Beberapa hal yang memengaruhi kultur suspensi adalah eksplan berupa FEC yang tergantung pada sifat genotip dan komposisi media beserta ZPT. Hasil penelitian yang telah dilakukan sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa peningkatan berat segar kalus kultur suspensi dapat dipengaruhi oleh klon yang berbeda, hal tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh kemampuan proliferasi kalus yang diinduksi dan hormon endogen yang terdapat pada inisiasi awal kalus (Karyanti et al., 2021).

### Viabilitas Sel

Rerata persentase sel viabel tertinggi terdapat pada perlakuan V3P2 sebesar 81,68% kemudian nilai rerata terendah terdapat pada perlakuan V2P1 66,48%. Semakin tinggi nilai sel yang viabel maka

semakin tinggi kemungkinan sel embriogenik yang terdapat pada sampel kalus tersebut (Gambar 5). Menurut (Chan et al., 2020) sel yang hidup memiliki membran sel yang utuh sehingga zat pewarna seperti *tryphan blue* tidak mampu menembus sel, sel suspensi yang dicampur dengan zat pewarna tertentu kemudian divisualisasikan untuk menentukan sel yang menyerap atau tidak menyerap zat pewarna.

Sel viabel yang berhasil dideteksi berada di rentang 66,48% - 81,68%. Semakin tinggi jumlah sel viabel maka semakin tinggi kemungkinan kalus yang bersifat embriogenik sehingga masih mampu melakukan proliferasi. Hal tersebut didukung oleh penelitian Sumaryono & Riyadi (2016) 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*.

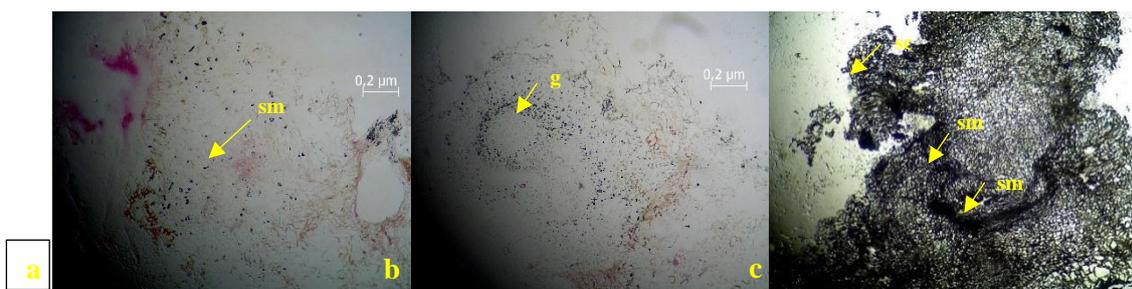


**Gambar 5.** Pengaruh perlakuan kultivar dan auksin terhadap viabilitas sel kultur suspensi

**Histologi**

Hasil histologi jaringan dapat diketahui melalui kalus yang diinduksi pada media CIM (*Casava Induction Medium*) atau media induksi kalus primer yang bersifat meristematik ditandai dengan ruang antar sel yang rapat sehingga bagian jaringan meristematik terlihat lebih gelap (Gambar 6a). Kalus yang berada pada media *Gresshoff and Doy* (GD) yaitu media induksi kalus primer menunjukkan adanya pola sel meristematik dengan jaringan yang rapat dan berwarna lebih gelap serta membentuk globular (Gambar 6b). Varietas Kaspro pada media P1 (Gambar 6c) menunjukkan bahwa kalus pada media suspensi membentuk fase

*heart* dan globular sehingga kalus dari media suspensi diketahui sesuai dengan tujuan dari kultur 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 sebab kalus pada fase globular mengindikasikan terdapatnya sel meristematik yang ditandai dengan perkembangan sel terus membelah (Restanto et al., 2022).



**Gambar 6.** Histologi kalus Kultivar Kaspro dari beberapa tahapan media. Kalus pada media CIM (a), kalus pada media GD (b), kalus pada media suspensi P1 (c). Kalus pada media suspensi (c) ge = globular sc = *secondary callus* h= kalus fase *heart* sm = sel meristematik

**SIMPULAN**

Respon induksi kalus dari beberapa kultivar lokal pada media induksi FEC menunjukkan rerata frekuensi dan skor FEC tertinggi terdapat pada Kultivar Kaspro sebesar 51,26% dan skor 4 sebagai kategori

kemampuan membentuk FEC tinggi. Tingkat proliferasi kalus pada jenis auksin yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan hasil suspensi FEC pada pertambahan berat segar dengan pemberian 12 mg.L<sup>-1</sup> picloram yang menghasilkan rata-rata berat segar yaitu 1,19 gram. Respon kalus menunjukkan berat

segar tertinggi yaitu pada perlakuan Ketan yang diinteraksikan dengan penambahan *Picloram* 12 mg.L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Laboratorium Ekofisiologi dan Kultur Jaringan, Program Studi Agronomi, Universitas Jember yang telah memfasilitasi analisis histologi jaringan pada penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- 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.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7717/peerj.11464>
- Chan, L. L. Y., Rice, W. L., & Qiu, J. (2020). Observation and quantification of the morphological effect of trypan blue rupturing dead or dying cells. *PLoS ONE*, *15*(1), 1–17.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227950>
- Diniyah, N., Subagio, A., Nur Lutfian Sari, R., Gita Vindy, P., & Ainur Rofiah, A. (2018). Effect of Fermentation Time and Cassava Varieties on Water Content and the Yield of Starch from Modified Cassava Flour (MOCAF). *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, *5*(2), 71.  
<https://doi.org/10.24198/ijpst.v5i2.15094>
- Karyanti, K., Tajuddin, T., Khairiyah, H., Sukarnih, T., Rahmadara, G., Hanifah, N. F., Rudiyan, Y., Kitagawa, S., Mira, F. R., & Saga, H. (2021). Proliferation Of Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.) Embryogenic Callus with Repeated Subcultures In Liquid Medium. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBi)*, *8*(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.29122/jbbi.v8i1.4715>
- Kong, E. Y. 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*(October 2019), 112125.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112125>
- Lentz, E. M., Eisner, S., McCallum, E. J., Schlegel, K., Campos, F. de A. de P., Grisse, W., & Vanderschuren, H. (2018). Genetic transformation of recalcitrant cassava by embryo selection and increased hormone levels. *Methods and Protocols*, *1*(4), 1–10.  
<https://doi.org/10.3390/mps1040042>
- Liu, Y., Liang, Q., Tang, D., Chen, Y., Zang, J., Zhao, W., Chen, J., Zhang, Q., & Yin, Z. (2022). Development of suspension culture technology and hormone effects on anthocyanin biosynthesis for red *Cyclocarya paliurus* cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *149*(1), 175–195.  
<https://doi.org/10.1007/s11240-021-02215-y>
- Mongomake, K., Doungous, O., Khatabi, B., & Fondong, V. N. (2015). Somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces from Cameroon. *SpringerPlus*, *4*(1), 1–12.  
<https://doi.org/10.1186/s40064-015-1272-4>
- Pranowo, D. (2021). Deskripsi Klon Tanaman Ubi Kayu (*Manihot Esculenta* Crantz) yang Ditanam Petani di Enam Kabupaten di Provinsi Lampung. *Inovasi Pembangunan : Jurnal Kelitbangan*, *9*(03), 271.  
<https://doi.org/10.35450/jip.v9i03.249>
- Pratiwi, B. I., Nugrahani, P., & Augustien K.,

- N. (2023). Pengaruh Nutrisi AB Mix dan Benzyl Amino Purine (BAP) terhadap Pertumbuhan Pisang (*Musa acuminata*) Var. Cavendish In Vitro. *Agro Bali : Agricultural Journal*, 6(1), 231–240.  
<https://doi.org/10.37637/ab.v6i1.1163>
- Raemakers, K., Pereira, I., van Putten, H. K., & Visser, R. (2006). Indirect Somatic Embryogenesis in Cassava for Genetic Modification Purposes. In V. M. Loyola-Vargas & F. Vázquez-Flota (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 101–109). Humana Press.  
<https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:101>
- 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).  
<https://doi.org/10.3390/agronomy9050218>
- Restanto, D. P., Farlisa, V. Y., Dewanti, P., Hariyono, K., & Handoyo, T. (2022). Induksi Somatic Embriogenesis dan Kultur Suspensi Sel Pada Tanaman Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume). *Agriprima : Journal of Applied Agricultural Sciences*, 6(2), 111–123.  
<https://doi.org/10.25047/agriprima.v6i2.448>
- 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.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.007>
- Silvina, F., Isnaini, I., & Ningsih, W. (2022). Induksi kalus daun binahong merah (*Basella rubra* L.) dengan pemberian 2, 4-D dan kinetin. *Jurnal Agro*, 8(2), 274–286.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.15575/14273>
- Slameto, Fariroh, I., Kriswanto, B., Restanto, D. P., & Hariyono, K. (2023). Somatic embryogenesis induction in four cassava landraces in East Java, Indonesia. *Journal of Plant Biotechnology*, 50, 11–18.  
<https://doi.org/10.5010/JPB.2023.50.002.011>
- Sumaryono, ., & Riyadi, I. (2016). Pertumbuhan biak kalus dan suspensi sel tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens) Growth of callus and cell suspension cultures of cinchona (*Cinchona ledgeriana* Moens). *E-Journal Menara Perkebunan*, 73(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v73i1.158>
- Supatmi, S., Rahman, N., & Hartati, N. S. (2018). Induksi, Multiplikasi dan Pertumbuhan Tunas Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz) Genotip Ubi Kuning Secara In Vitro. *Jurnal Biologi Indonesia*, 14(2), 191–200.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.14203/jbi.v14i2.3738>
- Taylor, N. J., Edwards, M., Kiernan, R. J., 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). *Nature Biotechnology*, 14(6), 726–730.  
<https://doi.org/10.1038/nbt0696-726>
- Tripathi, M. K., Tripathi, N., Tiwari, S., Tiwari, G., Mishra, N., Bele, D., Patel, R. P., Sapre, S., & Tiwari, S. (2021). Optimization of different factors for initiation of somatic embryogenesis in suspension cultures in sandalwood (*Santalum album* l.). *Horticulturae*, 7(5), 1–15.  
<https://doi.org/10.3390/horticulturae7050118>
- Wen, F., SU, W. pan, Zheng, H., YU, B. chi,

- MA, Z. feng, Zhang, P., & Guo, W. wu. (2020). Plant regeneration via protoplast electrofusion in cassava. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(3), 632–642. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62711-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62711-5)
- Zhang, P., & Gruissem, W. (2004). Production of Transgenic Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz). In I. S. Curtis (Ed.), *Transgenic Crops of the World: Essential Protocols* (pp. 301–319). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2333-0\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2333-0_23)
- 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*, 136(2), 313–322. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1517-3>