

**PENGGUNAAN PICLORAM DAN *NAPHTHALENE ACETIC ACID* (NAA)
PADA EMBRIOGENESIS SOMATIK UBI KAYU (*Manihot esculenta*
Crantz.) KLON UNILA UK-1 MENGGUNAKAN EKSPLAN
POTONGAN DAUN**

(Skripsi)

Oleh

**PANCA RAHAYU ANGGI
NPM 1854161006**



**JURUSAN AGRONOMI DAN HORTIKULTURA
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

PENGUNAAN PICLORAM DAN *NAPHTHALENE ACETIC ACID* (NAA) PADA EMBRIOGENESIS SOMATIK UBI KAYU (*Manihot esculenta* Crantz.) KLON UNILA UK-1 MENGGUNAKAN EKSPAN POTONGAN DAUN

Oleh

PANCA RAHAYU ANGGI

Pendekatan bioteknologi melalui transformasi genetik merupakan upaya yang efektif untuk memperbaiki sifat genetik ubi kayu dengan syarat ketersediaan kultur morfogenik melalui embriogenesis somatik. Unila UK-1 belum pernah dilaporkan untuk perbanyakkan dengan embriogenesis somatik. Tujuan penelitian ini mengetahui konsentrasi picloram, jenis eksplan, dan interaksinya untuk menginduksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial (2 x 5). Faktor pertama yaitu eksplan (E) terdiri atas dua taraf, E1 = daun muda dan E2 = daun tua. Faktor kedua yaitu konsentrasi picloram (M) yang terdiri atas 5 taraf, M0 = 0 mg/l, M1 = 7,5 mg/l, M2 = 10 mg/l, M3 = 12,5 mg/l, dan M4 = 15 mg/l picloram dengan penambahan 6 mg/l NAA pada masing-masing perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bobot kalus primer tertinggi dihasilkan pada konsentrasi picloram 0 mg/l + NAA 6 mg/l. Jenis eksplan yang memberikan pengaruh terbaik terhadap waktu muncul kalus primer dan persentase kalus per eksplan yaitu eksplan daun muda dengan waktu tercepat eksplan membentuk kalus 10,33 HST dan *scoring* 2,01 (kalus terbentuk >25 % hingga 50 % pada eksplan). Persentase eksplan berkalus dan eksplan yang berembrio tertinggi yaitu pada konsentrasi picloram 15 mg/l + NAA 6 mg/l. Embrio terbanyak dihasilkan pada konsentrasi picloram 10 mg/l + NAA 6 mg/l. Berdasarkan variabel kunci yaitu persentase eksplan berkalus dan berembrio, konsentrasi picloram terbaik untuk menginduksi kalus primer dan kalus embriogenik pada ubikayu klon Unila UK-1 adalah konsentrasi picloram 15 mg/l + NAA 6 mg/l pada eksplan daun muda.

Kata kunci : Embriogenesis somatik, Kalus primer, NAA, Picloram, Singkong

**PENGGUNAAN PICLORAM DAN *NAPHTHALENE ACETIC ACID* (NAA)
PADA EMBRIOGENESIS SOMATIK UBI KAYU (*Manihot esculenta*
Crantz.) KLON UNILA UK-1 MENGGUNAKAN EKSPLAN
POTONGAN DAUN**

Oleh

PANCA RAHAYU ANGGI

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA PERTANIAN**

Pada

**Jurusan Agronomi dan Hortikultura
Fakultas Pertanian, Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

Judul Skripsi : **PENGGUNAAN PICLORAM DAN NAPHTHALENE ACETIC ACID (NAA) PADA EMBRIOGENESIS SOMATIK UBI KAYU (*Manihot esculenta* Crantz.) KLON UNILA UK-1 MENGGUNAKAN EKSPAN POTONGAN DAUN**

Nama : **Panca Rahayu Anggi**

NPM : 1854161006

Program Studi : Agronomi

Fakultas : Pertanian

MENYETUJUI

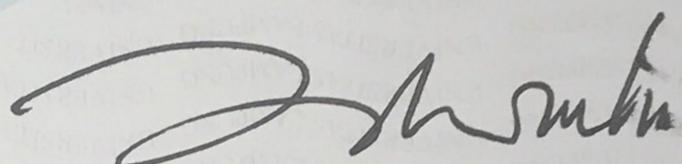
1. Komisi Pembimbing

Pembimbing Pertama



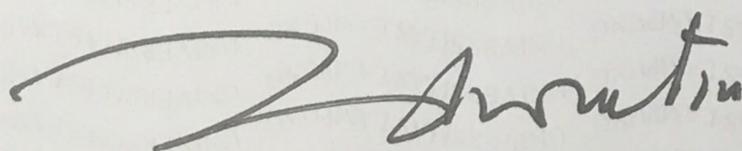
Fitri Yelli, SP., M.Si., Ph.D.
NIP 197905152008122005

Pembimbing Kedua



Prof. Dr. Ir. Setyo Dwi Utomo, M.Sc.
NIP 196110211985031002

2. Ketua Jurusan Agronomi dan Hortikultura



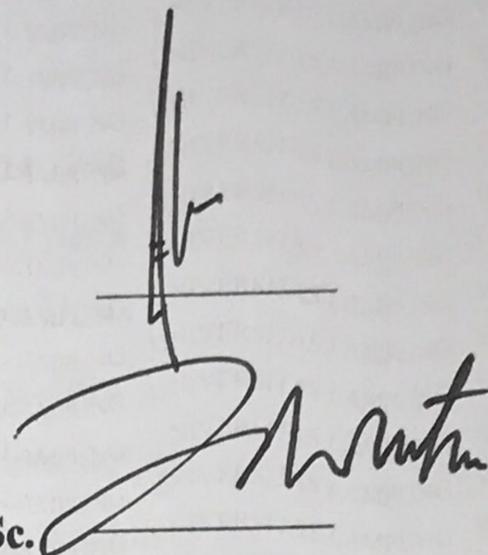
Prof. Dr. Ir. Setyo Dwi Utomo, M.Sc.
NIP 196110211985031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua

: Fitri Yelli, SP., M.Si., Ph.D.



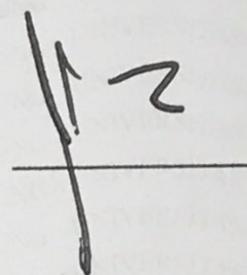
Sekretaris

: Prof. Dr. Ir. Setyo Dwi Utomo, M.Sc.

Penguji

Bukan Pembimbing

: Ir. Ardian, M.Agr.



2. Dekan Fakultas Pertanian



Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.

NIP 196110201986031002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 29 Agustus 2022

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini, menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul **“Penggunaan Picloram dan *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) pada Embriogenesis Somatik Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) Klon Unila UK-1 Menggunakan Eskplan Potongan Daun”** merupakan hasil karya saya sendiri dan bukan hasil karya orang lain. Semua hasil yang tertuang dalam skripsi ini telah mengikuti kaidah penulisan karya ilmiah Universitas Lampung. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa skripsi ini merupakan hasil salinan atau dibuat oleh orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan ketentuan akademik yang berlaku.

Bandar Lampung, 29 Agustus 2022



Panca Rahayu Anggi
NPM 1854161006

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama Panca Rahayu Anggi lahir di Panjang pada tanggal 28 Maret 2000 dari pasangan almarhum Bapak H. Zulkifli Lubis dan Ibu Misnawati. Penulis merupakan anak terakhir dari 5 bersaudara. Kakak pertama bernama Rahman Effendi, kakak kedua bernama Mila Apriyanti, Amd.Keb. Kakak ketiga bernama Briptu Putra Yansyah, SIP., dan kakak keempat bernama Bripda Hari Agustian. Penulis bertempat tinggal di Desa Sukatani, Kecamatan Kalianda, Kabupaten Lampung Selatan, Lampung. Penulis telah menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri 6 Sukatani pada tahun 2012. Pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 1 Kalianda pada tahun 2015. Pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Kalianda pada tahun 2018.

Penulis merupakan mahasiswa aktif di program studi Agronomi, Jurusan Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung yang diterima pada tahun 2018 melalui jalur Seleksi Mandiri Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SMMPTN). Penulis juga aktif pada kegiatan organisasi mahasiswa sebagai anggota Bidang Dana dan Usaha periode 2019 – 2020 dan sebagai Sekretaris Bidang Dana dan Usaha HIMAGRHO periode 2021. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata di Kelurahan Wai Lubuk, Kecamatan Kalianda, Kabupaten Lampung Selatan, Lampung pada bulan Februari – Maret 2021. Penulis melaksanakan program Praktik Umum (PU) di Unit Produksi Benih Sekincau (UPB), yang berlokasi di Sekincau, Lampung Barat, Lampung pada bulan Agustus – September 2021. Penulis juga pernah menjadi asisten dosen dalam mata kuliah Pemuliaan Tanaman pada tahun 2021.

**Karya Ini Kupersembahkan Kepada Orang-Orang Tersayang Alm.
Ayah, Mama, Sak Efen, Cek Yayan, Ci Ila, Bang Hari, dan Nakan-
Nakan Cicha** 

Almamater Tercinta Universitas Lampung

**Beri nilai dari usahanya jangan dari hasilnya
Baru kita bisa mengerti kehidupan.
-Albert Einstein-**

**Apapun yang menjadi takdirmu, akan mencari jalannya
menemukanmu
-Ali bin Abi Thalib ra-**

**Jika Allah SWT memilihmu
tandanya kamu mampu
-rntgstr-**

***Fear will make you always try your best*
-Panca Rahayu Anggi-**

**Jangan berduka, apapun yang hilang darimu akan kembali lagi dalam
wujud lain
-Jalaludin Rumi-**

SANWACANA

Puji syukur alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, hidayah serta karunia-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan judul **“Penggunaan Picloram dan *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) pada Embriogenesis Somatik Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) Klon Unila UK-1 Menggunakan Eskplan Potongan Daun”** yang merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana Pertanian di Universitas Lampung.

Dengan selesainya penulisan skripsi ini tentu tidak terlepas dari segala bantuan, arahan, nasihat, motivasi, dan bimbingan dari berbagai pihak, sehingga dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih banyak kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Setyo Dwi Utomo, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Agronomi dan Hortikultura dan pembimbing kedua atas bimbingan, nasihat, pengarahan, serta kritik dan saran selama proses menyelesaikan skripsi ini.
3. Ibu Fitri Yelli, S.P., M.Si., Ph.D., selaku pembimbing utama yang sudah penulis anggap sebagai ibu selama di perkuliahan, terima kasih banyak karena telah memberikan waktu, bimbingan, nasihat, pengarahan, kritik dan saran, serta semangat kepada penulis sehingga skripsi ini dapat selesai.
4. Bapak Ir. Ardian, M.Agr., selaku penguji atas nasihat, pengarahan, serta kritik dan saran selama penulis menyelesaikan skripsi ini.
5. Bapak Prof. Dr. Ir. Soesiladi Esti Widodo, M.Sc., selaku dosen pembimbing akademik penulis.

6. Kedua orang tua dan kakak-kakak tercinta, Bapak tersayang almarhum H. Zulkifli Lubis, dan Ibu Misnawati, Abang Rahman Effendi, Kakak Mila Apriyanti, Amd. Keb., Abang Briptu Putra Yansyah, dan Abang Bripda Hari Agustian.
7. Titin Agustin, Ifan Maulana Putra, dan Susanto sebagai teman satu penelitian yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi, terima kasih untuk suka dan duka yang dialami selama penelitian ini.
8. Ibu Hayane Adeline Warganegara, S.P., M.Si., sebagai Pembina dan pembimbing di Laboratorium Kultur Jaringan (Ilmu Tanaman) Universitas Lampung.
9. Mba Rahmadyah Hamiranti, M. Alipha Hapiyatna, Ajeng Windi Astuti, Ni Sayu Putu Arianti, Meisy Lestari, Mba Siti Munawaroh, Mba Emi Yunida, Mba Forensy Galennica, Mba Mitha Doveranti, sebagai mba dan teman yang selalu memberikan semangat kepada penulis selama penelitian di laboratorium kultur jaringan (Ilmu Tanaman).
10. Teman-teman terdekat yang telah banyak membantu dan memberikan motivasi serta semangat kepada penulis, Fina Octia, Eva Yuliyanti, Asih Devi Triyani, Muhammad Maqrus, Vidia Dwi Kurnianti, dan Wahyudi.
11. Semua teman-teman Agronomi dan Hortikultura angkatan 2018 tercinta yang telah kebersamai penulis selama masa perkuliahan.
12. PT. Indofood Sukses Makmur Tbk. sebagai pemberi dana penelitian dalam program Indofood Riset Nugraha (IRN) periode 2021-2022.

Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan atas bantuan yang diberikan kepada penulis. Penulis sangat menyadari masih banyak kekurangan dalam skripsi ini, akan tetapi penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca.

Bandar Lampung, 29 Agustus 2022

Penulis,

Panca Rahayu Anggi

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.5 Kerangka Pemikiran.....	6
1.6 Hipotesis	9
II. TINJAUAN PUSTAKA	10
2.2 Deskripsi Tanaman Ubi kayu.....	10
2.2 Kultur Jaringan dan Embriogenesis Somatik Ubi kayu	11
2.3 Potensi Daun Ubi kayu sebagai Bahan Baku Nori	13
2.4 Penelitian Transformasi Genetik Ubi kayu	14
III. METODE PENELITIAN	16
3.1 Waktu dan Tempat	16
3.2 Alat dan Bahan.....	16
3.3 Metode	17
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	18
3.4.1 Penyiapan bahan tanam	18

3.4.2 Sterilisasi alat.....	18
3.4.3 Sterilisasi botol	19
3.4.3.1 Tahap pertama	19
3.4.3.2 Tahap kedua.....	19
3.4.4 Pembuatan media.....	20
3.4.4.1 Media pre-kondisi.....	20
3.4.4.2 Media induksi kalus primer	22
3.4.4.3 Media induksi embriogenesis somatik	22
3.4.4.4 Media regenerasi tunas	23
3.4.4.5 Sterilisasi media.....	23
3.4.4.6 Sterilisasi eksplan	23
3.4.5 Penanaman eksplan.....	24
3.4.5.1 Penanaman tunas stek ubi kayu	24
3.4.5.2 Penanaman eksplan ke media induksi kalus Primer	25
3.4.5.3 Induksi embriogenesis somatik	25
3.5 Variabel Pengamatan	26
3.5.1 Pengamatan visual	26
3.5.2 Waktu muncul kalus primer.....	26
3.5.3 Persentase eksplan berkalus	26
3.5.4 Persentase kalus per eksplan (<i>scoring</i>)	27
3.5.5 Bobot kalus primer.....	27
3.5.6 Jumlah embrio per eksplan	28
3.5.7 Persentase eksplan berembrio	28
3.6 Analisis Data.....	28
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Hasil Pengamatan.....	30
4.1.1 Pengamatan visual kalus primer	30
4.1.2 Rekapitulasi analisis ragam.....	34
4.1.2.1 Waktu muncul kalus primer	34
4.1.2.2 Persentase eksplan berkalus	35

4.1.2.3 Persentase kalus per eksplan (<i>scoring</i>).....	36
4.1.2.4 Bobot kalus primer	36
4.1.2.5 Jumlah embrio per eksplan.....	37
4.1.2.6 Persentase eksplan berembrio.....	38
4.2 Pembahasan.....	41
V. KESIMPULAN.....	49
5.1 Kesimpulan.....	49
5.2 Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN.....	57

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi media Murashige dan Skoog (1962).....	21
2. Komposisi media induksi kalus primer.....	22
3. <i>Scoring</i> pembentukan kalus per eksplan.....	27
4. Rekapitulasi analisis ragam pengaruh konsentrasi picloram dan eksplan terhadap induksi kalus primer ubi kayu klon Unila UK-1.....	34
5. Pengaruh konsentrasi picloram dan jenis eksplan terhadap persentase eksplan berkalus (%) ubi kayu klon Unila UK-1	35
6. Pengaruh konsentrasi picloram terhadap bobot kalus primer ubi kayu klon Unila UK-1 pada 4 MST	37
7. Persentase eksplan berembrio (%)	39
8. Jumlah embrio somatik per eksplan dari induksi embriogenesis somatik kalus primer	40
9. Pengaruh konsentrasi picloram dan eksplan ubi kayu terhadap waktu muncul kalus primer.....	58
10. Uji homogenitas pengaruh konsentrasi picloram dan eksplan ubi kayu terhadap waktu muncul kalus primer.	58
11. Analisis ragam pada variabel waktu muncul kalus primer ubi kayu klon Unila UK-1.....	59
12. Hasil uji BNT pengaruh eksplan dan konsentrasi picloram terhadap waktu munculnya kalus primer ubi kayu klon Unila UK-1.....	59
13. Pengaruh konsentrasi picloram dan eksplan ubi kayu terhadap	

persentase eksplan berkalus	59
14. Uji homogenitas pengaruh konsentrasi picloram dan eksplan ubi kayu terhadap persentase eksplan berkalus.....	60
15. Analisis ragam pada variabel persentase eksplan berkalus pada ubi kayu Klon Unila UK-1.	60
16. Pengaruh konsentrasi picloram dan eksplan ubi kayu terhadap persentase kalus per eksplan.....	61
17. Uji homogenitas pengaruh konsentrasi picloram dan eksplan ubi kayu terhadap persentase kalus per eksplan.....	61
18. Analisis ragam pada variabel persentase kalus per eksplan.....	62
19. Hasil uji BNT pada variabel persentase kalus per eksplan	62
20. Pengaruh konsentrasi picloram dan eksplan ubi kayu terhadap bobot kalus primer	62
21. Uji homogenitas pengaruh konsentrasi picloram dan eksplan ubi kayu terhadap bobot kalus primer.....	63
22. Analisis ragam pada variabel bobot kalus primer pada ubi kayu klon Unila UK-1.....	63
23. Transformasi data pengaruh konsentrasi picloram dan eksplan ubi kayu terhadap bobot kalus primer.....	64

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bagan kerangka pemikiran.....	8
2. Regenerasi kultivar ubi kayu dengan embriogenesis somatik	13
3. Keragaan pembentukan kalus per eksplan berdasarkan <i>scoring</i>	27
4. Visual kalus ubi kayu klon Unila UK-1 pada setiap eksplan per 1 MST	31
5. Visualisasi kalus.....	32
6. Visual kalus embrio somatik pada ubi kayu klon Unila UK-1	33
7. Visual tunas dari embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1.....	33
8. Diagram pengaruh eksplan terhadap waktu muncul kalus primer ubi kayu klon Unila UK-1.....	35
9. Diagram pengaruh eksplan terhadap persentase kalus per eksplan ubi kayu klon Unila UK-1.....	36
10. Pengaruh eksplan terhadap bobot kalus primer ubi kayu klon Unila UK-1 pada 4 MST.....	37

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) adalah tanaman tropis yang ditanam karena akarnya yang menebal berpati dan memiliki nilai manfaat yang tinggi.

Toleransinya terhadap kondisi lingkungan yang merugikan, adaptasi terhadap tanah yang buruk dan waktu panen yang fleksibel, menjadikan ubi kayu sebagai komponen penting dalam ketahanan pangan di negara-negara berkembang. Selain itu, ubi kayu dapat dijadikan sumber makanan pokok dan bahan baku industri, yaitu sebagai bahan baku pembuatan tepung tapioka, makanan ternak, dan bioenergi atau bioethanol (Saelim, 2006). Empat provinsi produsen ubi kayu terbesar di Indonesia adalah Lampung, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Jawa Barat yang menyumbang sekitar 76,37% dari total produksi ubi kayu di Indonesia. Provinsi Lampung merupakan salah satu sentra produksi ubi kayu terbesar dengan rata-rata produksi pada tahun 2012- 2016 sebesar 7,74 juta ton. Produksi ini mengalami penurunan dalam kurun waktu tersebut yaitu dari 8,38 juta ton pada tahun 2012 menjadi 6,57 juta ton pada tahun 2016 dengan produktivitas yang juga mengalami penurunan dari 26,44 ton per hektar pada tahun 2015 menjadi 26,17 ton per hektar pada tahun 2016 (Badan Pusat Statistik, 2018).

Penurunan produktivitas ubi kayu tersebut, disebabkan oleh beberapa kendala biotik dan abiotik seperti penyakit, hama, gulma, dan kekeringan. Selain kendala tersebut, ada beberapa kendala lain, termasuk senyawa sianogenik beracun, dan kandungan protein yang sangat rendah (1-2 % berat kering). Oleh karena itu, untuk meningkatkan hasil panen, sifat-sifat penting telah diintrogressi melalui

pemuliaan tradisional, yang mengarah ke perbaikan besar dalam ketahanan terhadap hawar bakteri dan virus, meningkatkan kandungan protein, dan kualitas pati melalui pemuliaan. Beberapa sifat penting untuk perbaikan genetik ubi kayu dilaporkan telah berhasil dilakukan melalui pemuliaan tanaman secara konvensional sehingga menghasilkan tanaman yang tahan terhadap bakteri dan virus (Okogbenin *et al.*, 2007), peningkatan kandungan protein (Chavez *et al.*, 2005) dan peningkatan kualitas pati (Ceballos *et al.*, 2007). Akan tetapi, pemuliaan secara konvensional pada ubi kayu menemui beberapa kendala diantaranya adalah (1) sistem pembungaan yang tidak teratur, (2) benih sedikit, viabilitas dan daya perkecambahan benih rendah (Sanghera *et al.*, 2010), (3) tingginya tingkat heterozigositas dan penyerbukan silang atau penyerbukan sendiri terjadi secara alami sehingga tingkat hibridisasi seksualnya tinggi, genetiknya sangat beragam dengan tetua yang tidak dapat dipastikan akibatnya membutuhkan waktu siklus pemuliaan yang lama untuk mendapatkan sifat yang diinginkan (Danso dan Elegba, 2017). Oleh karena itu, perlu adanya upaya lain yang lebih efektif dan efisien untuk memperbaiki sifat genetik dari tanaman ubi kayu tersebut yaitu melalui pendekatan bioteknologi, salah satunya melalui transformasi genetik tanaman.

Transformasi genetik pada tanaman adalah mentransfer gen asing yang diperoleh dari tanaman, virus, bakteri, hewan, atau manusia pada suatu spesies tanaman tertentu. Gen asing yang diperoleh dari makhluk hidup tertentu tersebut direkayasa secara molekuler sehingga bisa disisipkan ke dalam genom tanaman (Dwiyani *et al.*, 2016). Transformasi genetik pada tanaman ubi kayu telah banyak berhasil dilakukan seperti pada penelitian Zainuddin *et al.*, (2012), didapatkan tiga ras ubi kayu yaitu kultivar 2nd Agric (TME3), Oko-iyawo (TME7), and Abbey-ife (TME14) yang diperoleh dari ETH Zurich dan Institut Pertanian Tropis Internasional (IPTI, Nigeria). Kultivar tersebut merupakan kultivar pilihan petani yang telah diidentifikasi tahan atau toleran terhadap penyakit *Cassava Mosaic Disease* (CMD) yang disebabkan oleh patogen berupa virus CMV (*Cassava Mosaic Virus*). Protokol transformasi genetik yang disesuaikan akan penting untuk memobilisasi sifat-sifat yang lebih baik ke dalam genotipe ubi kayu yang

produksinya terbatas karena CMD (*Cassava Mosaic Disease*) tersebut. Prasyarat penting untuk mengembangkan sistem transformasi genetik adalah ketersediaan kultur morfogenik yang dapat dengan mudah digunakan dalam teknik transfer gen. Pada ubi kayu, prosedur yang paling efisien untuk menghasilkan kultur morfogenik adalah melalui embriogenesis somatik, yang telah menjadi komponen penting dari sistem transformasi genetik pada ubi kayu (Mongomake *et al.*, 2015).

Menurut Hapsoro dan Yusnita (2018), embriogenesis somatik adalah proses pembentukan embrio secara *de novo* (terbentuk baru) dari jaringan eksplan yang sebelumnya tidak bermeristem. Embrio yang terbentuk disebut dengan embrio somatik karena berasal dari sel-sel somatik eksplan. Pembentukan embrio somatik secara adventif dapat terjadi secara langsung dari permukaan jaringan eksplan atau secara tidak langsung dengan didahului terbentuknya kalus pada permukaan eksplan. Embriogenesis somatik merupakan suatu proses di mana sel somatik (baik haploid maupun diploid) berkembang membentuk tanaman baru melalui tahap perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet. Pada proses ini terjadi pembentukan organisme yang berasal dari satu atau beberapa kumpulan sel somatik. Embrio yang berasal dari sel somatik ini mempunyai struktur bipolar yaitu mempunyai bakal tunas dan akar. Hal ini merupakan keuntungan dari perbanyakannya dengan embrio somatik dibandingkan dengan pembentukan tunas adventif yang bersifat unipolar. Tahapan perkembangan embrio dalam embriogenesis somatik menyerupai embrio zigotik yaitu mulai dari tahap globular, hati, torpedo dan kotiledon (Mongomake *et al.*, 2015).

Pembentukan embriogenesis somatik dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis dan umur eksplan, eksplan yang bersifat meristematik memberikan peluang keberhasilan yang tinggi untuk membentuk embrio somatik. Jaringan embriogenik telah digunakan sebagai target transformasi genetik maupun regenerasi tanaman ubi kayu transgenik (Taylor *et al.*, 2001). Kalus embriogenik adalah media yang efektif untuk transformasi genetik melalui teknik *particle bombardment* maupun Agrobakterium. Joseph *et al.* (2004), juga menggunakan kalus embriogenik sebagai bahan penelitian induksi mutasi pada ubi kayu melalui iradiasi sinar- γ .

Kalus embriogenik merupakan kalus yang mempunyai potensi untuk beregenerasi menjadi tanaman melalui organogenesis atau embriogenesis. Sedangkan kalus non embriogenik adalah kalus yang mempunyai kemampuan sedikit atau tidak mempunyai kemampuan untuk beregenerasi menjadi tanaman (Sutjahjo, 1994). Eksplan yang berasal dari jaringan somatik seperti daun pucuk juga dapat digunakan untuk inisiasi sistem regenerasi tanaman yang efisien. Oleh karena itu, Szabados *et al.*, (1987), menggunakan tunas pucuk dan daun muda ubi kayu yang berasal dari kultur *in vitro* sebagai eksplan (Priadi, 2006). Sumber nitrogen dan gula, merupakan faktor utama dalam memacu morfogenesis secara *in vitro*. Menurut Hapsoro dan Yusnita (2018), auksin memegang peranan penting pada embriogenesis somatik. Auksin merupakan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang dapat menginduksi embriogenesis somatik. Beberapa jenis auksin yang dilaporkan pada penelitian ubi kayu adalah 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D), *Naphthalene Acetic Acid* (NAA), Dicamba, Thidiazuron (TDZ), *Indole Acetic Acid* (IAA), dan picloram. Namun, picloram merupakan jenis auksin yang paling banyak digunakan karena mampu menginduksi terbentuknya embrio (Mongomake *et al.*, 2015). Untuk konsentrasi aplikasi picloram bervariasi, tergantung pada desain perlakuan dan genotipe tanaman. Sebagian besar aplikasi picloram untuk hasil terbaik adalah 10-12 mg/l (Saelim *et al.*, 2006).

Studi regenerasi telah menunjukkan bahwa frekuensi dan efisiensi embriogenesis somatik bergantung pada genotipe, dan tidak semua kultivar ubi kayu dapat membentuk embrio somatik. Studi regenerasi melalui jalur embriogenesis somatik perlu dipelajari untuk semua kultivar tanaman ubi kayu yang potensial. Unila UK-1 merupakan salah satu klon ubi kayu hasil seleksi oleh tim peneliti dari Fakultas Pertanian Universitas Lampung yaitu Prof. Setyo Dwi Utomo bersama tim peneliti ubi kayu Unila. Klon ini merupakan keturunan F1 dari tetua betina klon Sayur Liwa dengan ciri-ciri memiliki bentuk lobus daun linier, warna pucuk daun hijau keunguan, warna permukaan atas tangkai daun hijau, warna permukaan bawah tangkai daun hijau kemerahan, dan warna batang hijau (Utomo *et al.*, 2019). Unila UK-1 memiliki nama lain yaitu SL 201 dan klon ini belum pernah dilaporkan sebelumnya untuk perbanyakan dengan embriogenesis somatik,

sehingga merupakan fenomena baru yang perlu diteliti prosedur embriogenesis somatiknya. Daun dari klon ini dapat digunakan sebagai bahan dasar nori pengganti rumput laut. Hal tersebut dikarenakan daun ubi kayu mengandung serat, vitamin A, karbohidrat, dan asam amino yang penting bagi tubuh sehingga dapat digunakan sebagai sayur dan olahan makanan lain, misalnya nori.

Nori adalah lembaran tipis yang dikeringkan atau dipanggang. Nori dapat dikonsumsi secara langsung sebagai makanan ringan, juga sebagai penyedap bumbu masakan khas Jepang. Selain itu, nori sering dimanfaatkan sebagai makanan diet karena memiliki kandungan nutrisi yang tinggi. Kandungan protein nori mencapai 25 – 50% berat kering, lemak 2 – 3% berat kering, dan berbagai macam vitamin (Urbano dan Goni, 2002). Kadar HCN pada bagian daun segar klon ini yaitu sebesar 0,0331 mg/g. Klon ini telah berhasil mendapatkan paten dengan nomor pendaftaran: SID 201807023 tanggal 10 September 2018 (Utomo *et al.*, 2019).

Berdasarkan hasil penelitian dan teori diatas maka penelitian ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi auksin yang tepat pada media induksi dengan jenis eksplan yang berbeda untuk mendapatkan embrio somatik melalui embriogenesis somatik yang berpeluang tinggi sebagai bahan tanaman dalam rekayasa genetika.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi picloram untuk induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*?
2. Bagaimana pengaruh jenis eksplan dalam induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*?
3. Apakah terdapat interaksi antara konsentrasi picloram dan jenis eksplan dalam induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi picloram untuk induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*.
2. Mengetahui pengaruh jenis eksplan dalam induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*.
3. Mengetahui interaksi antara konsentrasi picloram dan jenis eksplan dalam induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini akan menghasilkan suatu metode regenerasi *in vitro* melalui embriogenesis somatik pada klon Unila UK-1. Metode ini penting dalam proses perbaikan genetik tanaman dalam rangka menghasilkan varietas unggul yang akan bermanfaat bagi petani ubi kayu dan industri.

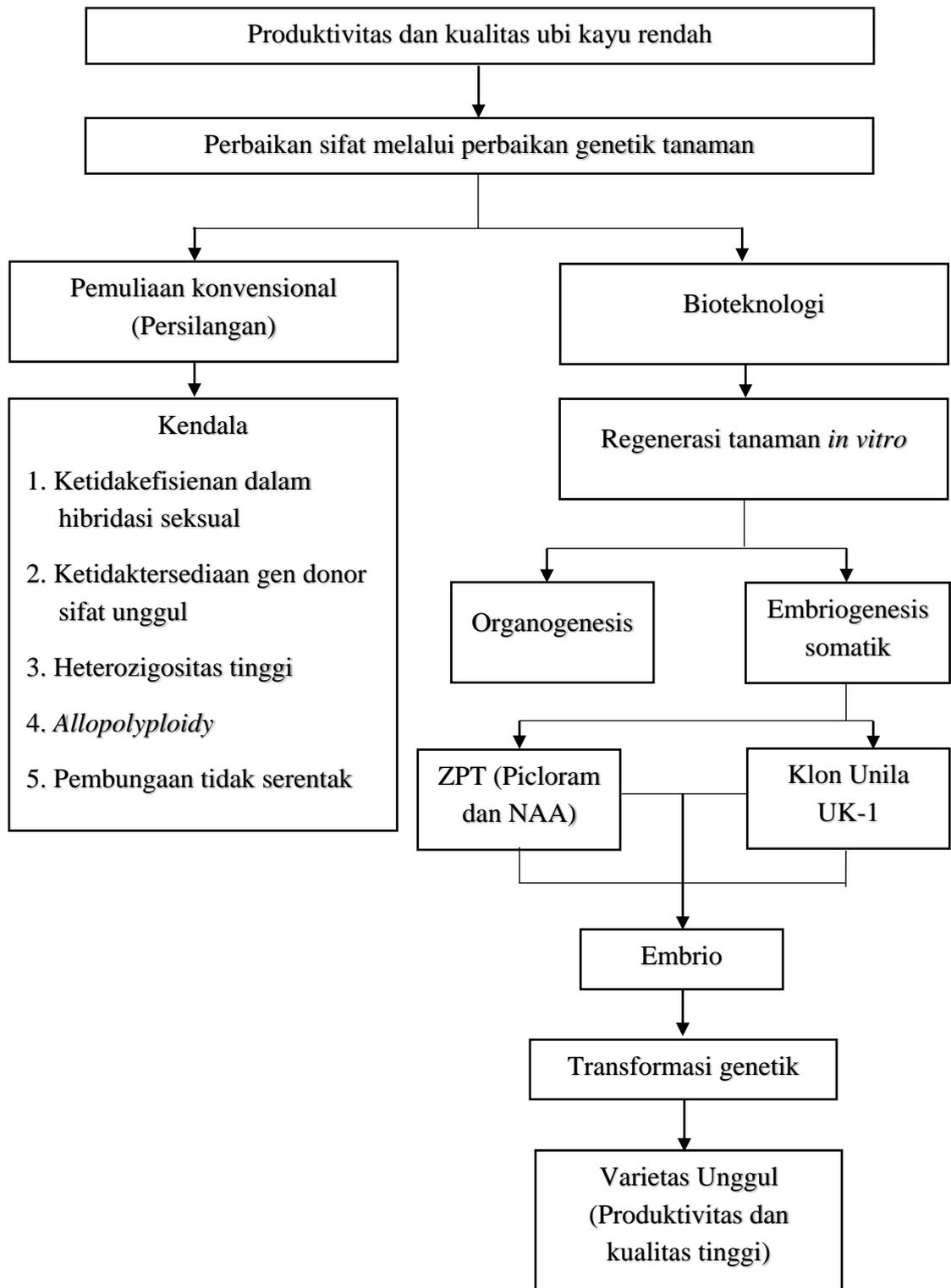
1.5 Kerangka Pemikiran

Permintaan ubi kayu mengalami peningkatan, baik untuk dikonsumsi langsung maupun sebagai bahan baku berbagai industri seperti biodiesel dan bioetanol. Sehingga, akan memacu kebutuhan ubi kayu dan akan mendorong pemerintah untuk terus meningkatkan produksi ubi kayu sebagai bahan pangan alternatif yang mendukung ketahanan pangan nasional. Akan tetapi, produktivitas dan kualitas dari ubi kayu masih rendah dikarenakan beberapa kendala seperti hama, penyakit, dan kekeringan, serta memiliki kadar sianogenik beracun yang tinggi sehingga perlu dipertimbangkan saat dikonsumsi. Oleh karena itu, perlu adanya perbaikan sifat melalui perbaikan genetik tanaman yang dapat dilakukan dengan pendekatan melalui pemuliaan secara konvensional maupun bioteknologi.

Pemuliaan secara konvensional memiliki beberapa kendala seperti ketidakefisienan dalam hibridisasi seksual, ketidakterediaan gen donor sifat unggul, heterozigositas tinggi, *Allopolyploidy*, dan pembungaan yang tidak serentak. Dikarenakan beberapa kendala tersebut, maka dilakukan perbaikan genetik melalui pemuliaan tanaman secara bioteknologi salah satunya dengan cara transformasi genetik. Transformasi genetik merupakan suatu kegiatan mentransfer gen asing yang diperoleh dari tanaman, virus, bakteri, hewan, atau manusia pada suatu spesies tanaman tertentu untuk mendapatkan tanaman transgenik.

Transformasi genetik membutuhkan jaringan tanaman yang menjadi target gen dalam proses transformasi tersebut. Embrio diketahui merupakan sel target yang sangat efisien untuk transformasi genetik pada ubi kayu. Embrio yang dihasilkan melalui proses embriogenesis somatik secara *in vitro* bersifat spesifik genotipe, maka untuk setiap genotipe harus dicari metode embriogenesisnya.

Pada penelitian ini digunakan ubi kayu klon Unila UK-1 yang dijadikan sebagai sumber eksplan dan diinduksi dalam media dengan zat pengatur tumbuh (ZPT) picloram dengan konsentrasi yang berbeda untuk mengetahui konsentrasi manakah yang paling efektif dalam menginduksi kalus embriogenesis somatik ubi kayu tersebut. Unila UK-1 merupakan salah satu klon ubi kayu hasil seleksi oleh tim peneliti dari Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Klon Unila UK-1 merupakan klon ubi kayu yang daunnya sesuai untuk bahan dasar pembuatan nori pengganti rumput laut. Meskipun daunnya sesuai dalam pembuatan nori, klon ini masih mempunyai beberapa kendala genetik seperti tidak tahan terhadap hama dan penyakit. Untuk itu dibutuhkan suatu teknologi untuk menjadikan klon ini selain daunnya yang cocok untuk pembuatan nori, juga memiliki keunggulan-keunggulan lainnya seperti tahan terhadap penyakit dan memiliki umbi yang berkadar pati tinggi, serta dapat diperbanyak secara cepat melalui embriogenesis somatik secara *in vitro*. Uraian kerangka pemikiran di atas, disusun dalam bentuk bagan pada Gambar 1.



Gambar 1. Bagan kerangka pemikiran.

1.6 Hipotesis

Berdasarkan kerangka pemikiran yang telah disampaikan, hipotesis yang didapat yaitu sebagai berikut.

1. Terdapat pengaruh konsentrasi picloram untuk induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*.
2. Terdapat pengaruh jenis eksplan dalam induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*.
3. Terdapat interaksi antara konsentrasi picloram dan jenis eksplan dalam induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tanaman Ubi Kayu

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) merupakan bahan makanan pokok yang mempunyai kandungan karbohidrat yang tinggi sehingga dimanfaatkan sebagai pakan, pati (*starch*), etanol, bioplastik, dan industri pangan (Ceballos, 2012). Dibandingkan dengan tanaman berumbi lainnya karbohidrat yang dihasilkan oleh ubi kayu 40% lebih tinggi dibandingkan dengan padi dan 25% dibandingkan dengan jagung. Komposisi umbi pada ubi kayu terdiri atas air 70%, tepung 24%, serat 2%, protein 1% dan senyawa lain 1% (Tonukari, 2004).

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) merupakan tanaman monoceus yaitu tumbuhan yang mempunyai bunga jantan dan bunga betina pada satu individu. Bunga betina tanaman ubi kayu mekar 10-14 hari lebih awal dari bunga jantan pada cabang yang sama (Ceballos *et al.*, 2012) sehingga ubi kayu merupakan tanaman menyerbuk silang. Menurut Jennings dan Iglesias (2002), penyerbukan sendiri bisa terjadi ketika bunga jantan dan bunga betina pada cabang yang berbeda atau pada tanaman yang berbeda tapi genotipe yang sama membuka secara bersamaan, sedangkan waktu berbunga ubi kayu bergantung pada genotipe dan juga kondisi lingkungan tumbuh (Ceballos, 2012).

Faktor-faktor yang berhubungan dengan proses pembentukan dan pertumbuhan ubi kayu antara lain: (a) cahaya berhubungan dengan proses fotosintesis pada tanaman; (b) aerasi tanah yang mendukung respirasi akar; (c) ketersediaan unsur hara; (d) aktivitas hormon IAA oksidase di dalam akar; (e) kandungan air tanah;

(f) kepadatan tanah yang berhubungan dengan struktur tanah bagi pertumbuhan dan perkembangan akar (Kamal, 2005).

Tanaman ubi kayu diperbanyak dengan menggunakan setek batang atau dengan biji yang merupakan hasil perkawinan silang. Namun cara setek merupakan cara yang paling umum digunakan oleh petani untuk tujuan perbanyak dan penanaman sedangkan akar tidak termasuk organ reproduktif. Pada saat panen petani memotong dan membuang cabang-cabang yang muda kemudian akar dipotong dan batang utama diikat masing-masing sebanyak 50 batang per ikat. Posisi vertikal digunakan pada saat penyimpanan dilakukan di bawah pohon atau ditutup dengan plastik untuk mengurangi penguapan dan batang menjadi kering. Pada saat akan menanam, petani memotong-motong batang utama tersebut dengan panjang sekitar 20 cm dengan 5-7 buku. Jadi setiap batang menghasilkan sekitar 5-7 hasil potongan (setek) tapi hal itu dipengaruhi oleh umur dan karakteristik varietas (Ceballos, 2012).

Provinsi Lampung sebagai produsen terbesar ubi kayu di Indonesia, telah melakukan kegiatan perakitan varietas unggul ubi kayu. Sampai tahun 2015, Prof. Dr. Ir. Setyo Dwi Utomo dan tim sudah menghasilkan lebih dari 100 klon ubi kayu hasil introduksi, eksplorasi dan hibridisasi. Pada tahun 2015 juga telah dilakukan evaluasi klon- klon tersebut dan juga dilakukan hibridisasi. Tujuan dari perakitan varietas unggul diharapkan menghasilkan ubi kayu dengan mutu hasil dan produksi yang tinggi (Utomo, 2015).

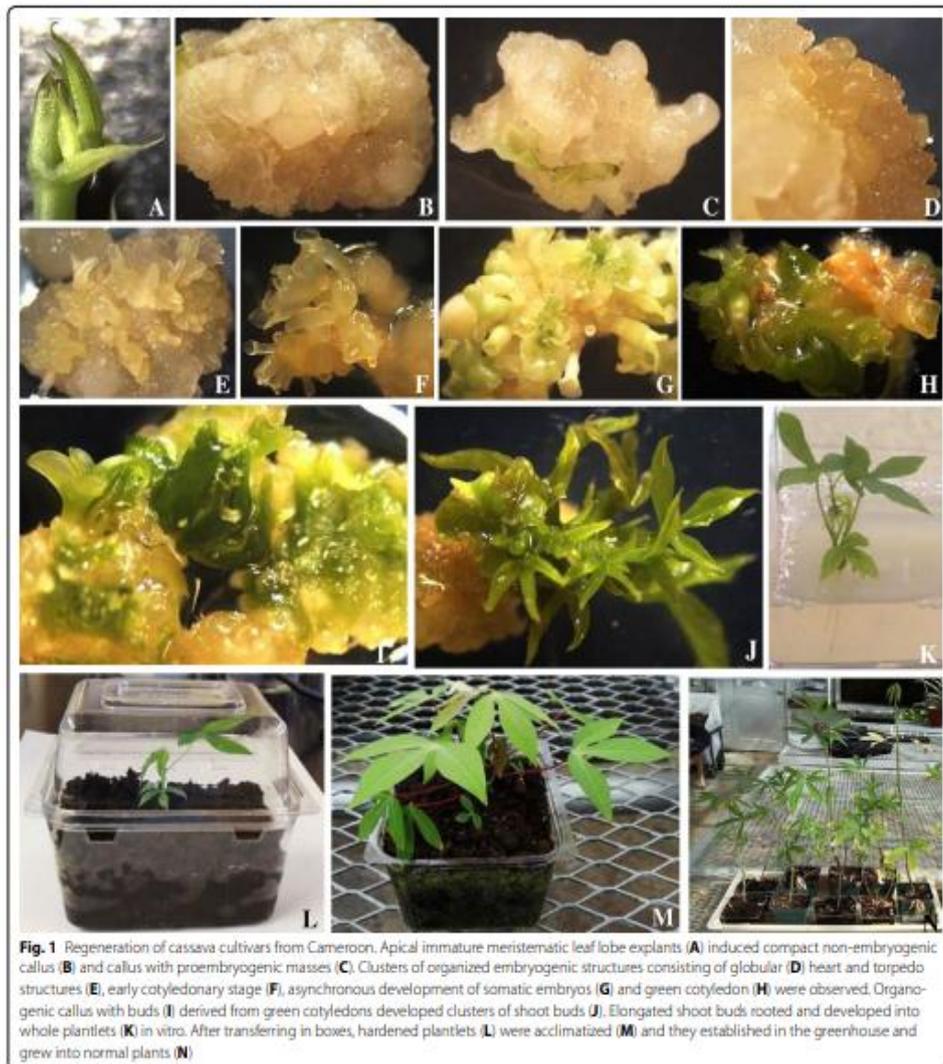
2.2 Kultur Jaringan dan Embriogenesis Somatik Ubi Kayu

Pada perakitan varietas unggul tanaman ubi kayu untuk sifat tanaman berdaya hasil dan berkadar pati atau mengandung etanol tinggi, tahan hama dan penyakit, berumur genjah dan mempunyai kandungan vitamin yang tinggi, serta dapat dilakukan melalui berbagai pendekatan.

Pada dasarnya regenerasi tanaman secara *in vitro* mengacu pada teori yang dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann yang menjelaskan bahwa setiap sel hidup mempunyai kemampuan untuk bereproduksi membentuk jaringan dan organ dan kemudian bisa berkembang menjadi individu baru yang sempurna jika ditumbuhkan pada media dan lingkungan yang sesuai. Teori inilah yang kemudian dijadikan dasar untuk melakukan manipulasi pada tingkat sel maupun jaringan tanaman menjadi individu baru yang utuh (Pardal, 2002). Hal ini pula yang melatarbelakangi lahirnya ilmu kultur jaringan tanaman. Menurut Hapsoro dan Yusnita (2018), kultur jaringan tanaman adalah pengkulturan bagian tanaman secara aseptik baik berupa sel, jaringan, organ, embrio, biji atau tanaman utuh secara *in vitro* (dalam tabung) dan ditumbuhkan pada media buatan dengan nutrisi lengkap, sumber energi serta bahan lain yang diperlukan tanaman (hampir selalu menggunakan zat pengatur tumbuh) dalam kondisi lingkungan fisik dan kimia yang terkontrol. Melalui kultur jaringan tanaman dapat diperbanyak kapan saja sesuai dengan kebutuhan karena faktor perbanyakannya tinggi, tidak membutuhkan tempat yang luas serta tidak dipengaruhi oleh faktor cuaca.

Menurut Purnamaningsih (2002), perbanyak tanaman melalui kultur jaringan dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik. Namun jalur embriogenesis somatik lebih mendapat perhatian karena disamping jumlah propagula yang dihasilkan lebih banyak dan waktu yang singkat, jalur regenerasi embriogenesis somatik juga mendukung program pemuliaan tanaman melalui rekayasa genetika. Untuk pembentukan embrio somatik, penggunaan eksplan yang berasal dari jaringan meristem akan lebih baik digunakan karena tingkat keberhasilannya lebih tinggi. Pada ubi kayu, embriogenesis somatik yang diinisiasi dari eksplan kotiledon atau daun mampu membentuk embrio awal (*primary embryos*). Embrio ini selanjutnya diinduksi untuk membentuk embriogenesis somatik sekunder (*secondary somatic embryogenesis*) melalui subkultur embrio pada media yang diperkaya dengan auksin. Melalui sistem kultur ini embrio yang dihasilkan lebih banyak dan siap untuk membentuk embrio yang matang (*mature embryos*) (Raemakers *et al.*, 1996).

Sistem regenerasi yang dapat diandalkan pada ubi kayu adalah melalui embriogenesis somatik (Mongomake *et al.*, 2015) dengan tahapan perkembangan seperti yang dapat dilihat pada Gambar 2 berikut ini.



Gambar 2. Regenerasi kultivar ubi kayu dengan embriogenesis somatik (Mongomake *et al.*, 2015).

2.3 Potensi Daun Ubi Kayu sebagai Bahan Baku Nori

Daun dari klon Unila UK-1 dapat digunakan sebagai bahan dasar nori pengganti rumput laut. Nori merupakan makanan khas yang berasal dari negara Jepang dengan bahan dasarnya adalah rumput laut (*Seaweeds*). Jepang memiliki 1500

spesies rumput laut yang dikelompokkan menjadi 3 kelompok besar algae yaitu Chlorophyta (249), Phaeophyceae (343) dan Rhodophyta (985) (Yoshida *et al.*, 2015). Masing-masing spesies rumput laut tersebut mempunyai peruntukan yang berbeda seperti spesies *Monostroma nitidum* digunakan untuk nori berbentuk selai dan soup dan *Ulva prolifera* untuk bahan pelengkap pada makanan seperti okonomiyaki (Tanaka, Ohno, dan Largo., 2020).

Berdasarkan hasil penelitian Utomo (2019), daun Unila UK-1 memiliki rasa sedikit pahit karena kandungan HCN yang tinggi. Tetapi kandungan HCN dapat diturunkan melalui beberapa proses diantaranya adalah melalui perebusan. Kadar HCN yang memenuhi standar konsumsi adalah dibawah 0,05 mg/gram. Melalui perebusan kadar HCN pada daun UNILA UK-1 turun menjadi 0,0331 mg/gram.

2.4 Penelitian Transformasi Genetik Ubi Kayu

Transformasi genetik tanaman bertujuan untuk memindahkan gen tertentu baik yang berasal dari tumbuhan, bakteri atau organisme lainnya kedalam inti sel tanaman, sehingga terjadi perubahan atau penambahan sifat yang dibawa oleh gen tersebut didalam tanaman yang dimasuki tanpa merubah sifat asli dari tanaman tersebut. Kegiatan transformasi genetik ini bermanfaat untuk meningkatkan kualitas dari tanaman dalam rangka merakit varietas unggul (tanaman transgenik). Pada tanaman ubi kayu ada beberapa karakteristik yang penting dilakukan perbaikan genetiknya yaitu; (1) Kandungan protein, karena ubi kayu rata-rata memiliki kandungan protein yang rendah yaitu berkisar antara 2-3% dari berat kering (Ceballos *et al.*, 2004), (2) Kandungan hidrogen sianida, karena tingginya kandungan zat ini didalam ubi kayu dapat membahayakan kesehatan manusia, (3) peningkatan kualitas pati, (4) fisiologi pascapanen dan penyimpanan, (5) ketahanan ubi kayu terhadap serangan hama dan penyakit tanaman (Fondong dan Rey, 2018).

Pada tahun 1996 telah dilaporkan tentang produksi transgenik pada ubi kayu dengan menggunakan metode *particle bombardment* sebagai alat untuk mengantarkan gen kedalam sel tanaman, dalam hal ini bahan yang digunakan adalah kalus embriogenik dan menggunakan aktifitas luciferase sebagai agen untuk menyeleksi sel transforman (Raemakers *et al.*, 1996). Transgenik ubi kayu yang mengekspresikan gen *cryIAa* tahan terhadap serangan hama lepidoptera yaitu *Helicoverpa armigera* berhasil dirakit pada tahun 2012 dan dinamakan dengan nama BT *cassava* (Duan *et al.*, 2013). Selain serangga, tanaman transgenik ubi kayu tahan terhadap serangan virus *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* (SLCMV) juga telah berhasil dirakit melalui teknologi RNAi sehingga tanaman yang dihasilkan bisa meningkat biomasnya yang sangat penting untuk produksi bioetanol (Ntui *et al.*, 2015).

Percobaan dengan menggunakan gen yang berasal dari tanaman model *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis vit1*, mampu meningkatkan akumulasi zat besi dalam umbi dan batang ubi kayu. Untuk tanaman ubi kayu rendah amilosa, perakitan tanaman transgenik dilakukan dengan cara menghambat ekspresi dari gen *granule-bound starch synthase I* (GBSSI) yaitu gen yang berperan untuk mensintesis amilosa sehingga kadar amilosa yang terbentuk rendah (Zhao *et al.*, 2011).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2021 sampai April 2022. Lokasi penelitian di Rumah Kaca Laboratorium Lapang Terpadu (LTPD) dan di Laboratorium Kultur Jaringan (Ilmu Tanaman) Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat standar untuk kultur jaringan. Alat-alat tersebut antara lain autoklaf *buddenberg*, autoklaf *tomy*, destilator, botol kultur, rak kultur, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), mikroskop binokuler *Olympus*, komputer, timbangan digital, timbangan analitik, karet, plastik, pinset, *scalpel*, *blade*, gelas ukur, *beaker*, erlenmeyer, rak kultur, kereta dorong, keranjang, bak air, ember, gayung, sabut pembersih, sikat pembersih, panci, spatula, *magnetic stirrer*, derigen, *box container*, mikropipet, pH meter, ubin, botol *schott*, *show case*, lap kain, mangkok mini, *sprayer*, kompor, tabung gas, korek api, kamera, *petridish*, bunsen dan alat tulis (buku, pena, pensil, penggaris).

Bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian ini antara lain stek ubi kayu klon Unila UK-1, media Murashige and Skoog (MS), ZPT (picloram, NAA, BA), tisu, kapas, *aquadest*, air, agar-agar, spirtus, detergen, *bayclin* (NaOCl), alkohol

70%, larutan *tween-20*, sukrosa, sabun cuci piring (*sunlight*), air steril, KOH 1 N, CuSO₄, dan HCl 1 N. Bahan tanam untuk induksi kalus primer berupa daun steril yang dihasilkan melalui penanaman stek ubi kayu di Rumah Kaca hingga membentuk tunas, kemudian tunas diambil ± 3 buku dari bagian pucuk dan di sterilisasi di Laboratorium, serta ditanam pada media $\frac{1}{2}$ MS dan di inkubasi sehingga mendapatkan tunas yang steril (terbebas dari mikroorganisme). Setelah itu, daun dari tunas tersebut digunakan untuk menginduksi kalus primer dengan ditanam pada media induksi kalus primer.

3.3 Metode

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial (2 x 5). Faktor pertama yaitu jenis eksplan (E) terdiri atas dua taraf yaitu E1 = daun muda (pucuk) dan E2 = daun tua (buku ketiga dari pucuk). Sedangkan faktor kedua yaitu konsentrasi picloram (M) yang terdiri atas 5 taraf yaitu M0 = 0 mg/l picloram + 6 mg/l NAA, M1 = 7,5 mg/l picloram + 6 mg/l NAA, M2 = 10,0 mg/l picloram + 6 mg/l NAA, M3 = 12,5 mg/l picloram + 6 mg/l NAA, dan M4 = 15,0 mg/l picloram + 6 mg/l NAA. Berdasarkan kedua faktor tersebut, maka diperoleh 10 kombinasi perlakuan. Sepuluh kombinasi perlakuan yang diperoleh adalah sebagai berikut:

1. E1M0 = daun muda + 0 mg/l picloram + 6 mg/l NAA
2. E1M1 = daun muda + 7,5 mg/l picloram + 6 mg/l NAA
3. E1M2 = daun muda + 10,0 mg/l picloram + 6 mg/l NAA
4. E1M3 = daun muda + 12,5 mg/l picloram + 6 mg/l NAA
5. E1M4 = daun muda + 15,0 mg/l picloram + 6 mg/l NAA
6. E2M0 = daun tua + 0 mg/l picloram + 6 mg/l NAA
7. E2M1 = daun tua + 7,5 mg/l picloram + 6 mg/l NAA
8. E2M2 = daun tua + 10,0 mg/l picloram + 6 mg/l NAA
9. E2M3 = daun tua + 12,5 mg/l picloram + 6 mg/l NAA
10. E2M4 = daun tua + 15,0 mg/l picloram + 6 mg/l NAA

Penelitian ini dilakukan sebanyak 5 ulangan (1 kali ulangan terdiri dari 3 botol dengan 1 botol terdiri dari 3 eksplan). Sehingga, total eksplan yang digunakan adalah 450 dan secara keseluruhan terdapat 50 satuan percobaan.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Penyiapan bahan tanam

Bahan tanam berupa setek ubi kayu klon UNILA UK-1 digunakan sebagai sumber eksplan untuk inisiasi embriogenesis somatik. Klon ini diambil dari petani di Kecamatan Tanjung Bintang, Kabupaten Lampung Selatan. Penanaman setek ini dilakukan di Rumah Kaca Laboratorium Lapang Terpadu (LTPD). Media tanam yang digunakan adalah media tanah, sekam, kompos, dan pukan dengan perbandingan 4:2:1:1. Media tersebut diaduk menggunakan cangkul hingga merata dan dimasukkan ke dalam *polybag* ukuran 20 x 35 cm. *Polybag* yang telah diisi tanah kemudian disusun di atas *bench* dalam rumah kaca yang telah dibersihkan dan disemprot pestisida. Setelah media tanam siap, batang ubi kayu dipotong dengan panjang ± 30 cm. Setek batang ubi kayu ditanam dan disiram secara rutin hingga menghasilkan tunas dalam waktu tertentu. Setelah dua minggu penanaman, tunas samping dari tanaman berumur 2 minggu di rumah kaca dipanen dan dibawa ke laboratorium untuk disterilisasi dan ditanam pada media *in vitro*.

3.4.2 Sterilisasi alat

Prinsip dari teknik kultur jaringan adalah teknik aseptik. Sehingga alat dan bahan yang digunakan harus dalam kondisi yang aseptik untuk meminimalisir kegagalan akibat kontaminasi. Untuk mencapai kondisi tersebut perlu dilakukan sterilisasi. Sterilisasi alat diseksi (pinset, *scalpel*, cawan petri, ubin) dilakukan dengan cara membungkus alat dengan kertas dan dilapisi plastik tahan panas pada bagian luar.

Selain alat diseksi tersebut, terdapat beberapa tambahan alat dan bahan yang perlu disterilisasi, yaitu botol *schott*, gelas ukur, erlenmeyer, kapas, dsb. Alat-alat tersebut dimasukkan ke dalam autoklaf *Tomy* selama 30 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 kg/cm³. Setelah itu, alat-alat tersebut dikeluarkan dan diangin-anginkan pada ruangan ber-AC.

3.4.3 Sterilisasi botol

3.4.3.1 Tahap pertama

Tahap pertama dilakukan dengan memasukkan botol kotor ke dalam autoklaf *Budenberg* selama 120 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 kg/cm³. Kemudian, media sisa dikeluarkan dan botol dicuci menggunakan sabun cuci piring (*sunlight*) dengan menggosok botol sampai bersih. Botol yang telah dicuci, direndam pada air yang telah diberi 40 gram detergen dan 1,5 mg/l desinfektan (*bayclin*) selama 1 malam. Setelah itu, botol dicuci bersih dan dibilas dengan air mengalir. Kemudian, botol direndam dalam air panas selama 15 menit dan ditiriskan. Botol yang telah ditiriskan, kemudian ditutup plastik bagian atasnya dan diikat menggunakan karet.

3.4.3.2 Tahap kedua

Sterilisasi tahap dua dilakukan dengan memasukan botol yang telah ditutup plastik ke dalam autoklaf *Tomy* selama 30 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 kg/cm³. Setelah itu, botol disimpan dalam box penyimpanan.

3.4.4 Pembuatan media

Media yang diperlukan yaitu media pre-kondisi, media induksi kalus primer (M0, M1, M2, M3, dan M4), dan media induksi embriogenesis somatik (M0, M1, M2, M3, M4, dan SK1). Komponen-komponen yang terdapat pada masing-masing media adalah sebagai berikut:

3.4.4.1 Media pre-kondisi

Media pre-kondisi merupakan media yang digunakan untuk menumbuhkan setek batang ubi kayu agar menghasilkan tunas steril. Media yang digunakan yaitu media $\frac{1}{2}$ MS (Murashige dan Skoog, 1962). Media $\frac{1}{2}$ MS dibuat dengan mengambil setengah dari kebutuhan stok makro (10x) pada komposisi media MS, yaitu dari kebutuhan 100 ml diambil 50 ml untuk $\frac{1}{2}$ MS. Komposisi media MS dibuat dengan formulasi yang diuraikan pada Tabel 1.

Komponen-komponen yang diuraikan pada Tabel 1 tersebut selain agar-agar, dimasukkan ke dalam *beaker glass* berisi *aquadest* \pm 300 ml/l dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah itu, ditera menggunakan gelas ukur 1 L dengan menambahkan *aquadest* sampai batas 1000 ml. Kemudian, larutan dihomogenkan kembali dan diatur pH-nya hingga 5,8. Pengaturan pH dilakukan dengan menambahkan larutan KOH 1 N untuk menaikkan pH dan menambahkan larutan HCl 1 N untuk menurunkan pH. Setelah itu, larutan media dimasak dengan ditambahkan agar-agar dan diaduk agar tidak menggumpal hingga larutan mendidih. Larutan yang telah mendidih dimasukkan ke dalam botol kultur steril, setiap botol berisi \pm 25 ml media dan ditutup kembali menggunakan plastik.

Tabel 1. Komposisi media Murashige dan Skoog (1962)

No.	Komponen Media	Konsentrasi dalam Media MS (mg/l)	Konsentrasi dalam Larutan Stok (mg/l)	Komponen dalam 1 L Media
1.	Stok Makro (10x)	-	-	100 ml
	NH ₄ NO ₃	1650	16500	-
	KNO ₃	1900	19000	-
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	3700	-
	KH ₂ PO ₄	170	1700	-
2.	Stok Mikro A (100x)	-	-	10 ml
	H ₃ BO ₃	6,2	620	-
	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	1690	-
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	860	-
3.	Stok Mikro B (1000x)	-	-	1 ml
	KI	0,83	830	-
	Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	0,25	250	-
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	25	-
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	25	-
4.	Stok CaCl ₂ (100x)	-	-	10 ml
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	44000	-
5.	Stok Fe (100x)	-	-	10 ml
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	2780	-
	Na ₂ EDTA	37,5	3730	-
6.	Vitamin MS (100x)	-	-	10 ml
	Tiamin-HCl	0,1	10	-
	Piridoksin-HCl	0,5	50	-
	Asam Nikotinat	0,5	50	-
	Glisin	2	200	-
7.	Mio-Inositol (10x)	-	-	100 ml
	Mio-Inositol	100	1000	-
8.	Sukrosa	-	-	30 gram
9.	Agar-agar	-	-	7 gram

3.4.4.2 Media induksi kalus primer

Media induksi kalus primer dibuat dengan komposisi media MS (*Murashige and Skoog*, 1962) dengan menambahkan beberapa konsentrasi ZPT yang terdapat pada Tabel 2 sebagai berikut.

Tabel 2. Komposisi media induksi kalus primer

No.	Komponen Media	Volume dan Konsentrasi Larutan dalam 1 L Media
1.	Stok Makro (10x)	100 ml
2.	Stok Mikro A (100x)	10 ml
3.	Stok Mikro B (100x)	10 ml
4.	Stok CaCl ₂ (100x)	10 ml
5.	Stok Fe (100x)	10 ml
6.	Vitamin MS (100x)	10 ml
7.	Mio-inositol (10x)	100 ml
8.	Sukrosa	40 g/l
9.	Agar-agar	8 g/l
10.	CuSO ₄	4 μM
11.	NAA	6 mg/l
12.	Picloram	0 mg/l (M0) 7,5 mg/l (M1) 10 mg/l (M2) 12,5 mg/l (M3) 15 mg/l (M4)

3.4.4.3 Media induksi embriogenesis somatik

Media induksi embriogenesis somatik terdiri atas 3 media yaitu media yang sama dengan media induksi kalus primer (M0, M1, M2, M3, M4), media SK1, dan media 2,4-D. Media induksi kalus primer dibuat sesuai penjelasan pada poin

sebelumnya. Komponen media SK1 dibuat dengan menurunkan kadar auksin yaitu picloram menjadi 6 mg/l dan NAA 0,5 mg/l pada media induksi kalus primer. Media 2,4-D dibuat dengan komposisi media MS (*Murashige and Skoog*, 1962) ditambahkan dengan ZPT 2,4-D konsentrasi 8 mg/l.

3.4.4.4 Media regenerasi tunas

Pada fase kotiledon, embrio dipindahkan pada media MS yang ditambahkan BA dengan konsentrasi 0,2 mg/l dan 0,4 mg/l. Hal tersebut bertujuan untuk merangsang pertumbuhan tunas untuk menjadi plantlet.

3.4.4.5 Sterilisasi media

Sterilisasi media dilakukan dengan memasukan media yang telah dituang ke dalam botol kultur. Selanjutnya, diautoklaf untuk mensterilkan media dengan menggunakan autoklaf *Tomy ES-Series* selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 kg/cm³. Kemudian, media dikeluarkan dan disimpan dalam ruang kultur.

3.4.4.6 Sterilisasi eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan di ruang persiapan dan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC). Penanganan eksplan di ruang persiapan berupa pemotongan tunas 3 buku teratas dari tunas adventif yang ditumbuhkan di rumah kaca. Tunas dibersihkan dari daun dan tangkainya, kemudian eksplan dicuci pada air mengalir selama ± 1 jam. Setelah itu, tunas dipotong dengan panjang ± 5 cm dan dimasukan ke dalam *beaker* yang diberi air dan detergen sebanyak 4 gram (dua sendok takar). Kemudian, dikocok hingga seluruh permukaan tunas terkena larutan detergen (± 5 menit). Setelah itu, tunas dibilas dengan air sebanyak 3 kali dan dimasukan ke

dalam botol steril dengan kapasitas setengah dari botol kultur. Sterilisasi permukaan eksplan kemudian dilanjutkan di dalam LAFC. Sterilisasi dilakukan dengan menggunakan larutan *clorox* 20% dan ditambahkan dengan *tween-20* sebanyak 2 tetes/100 ml larutan, kemudian eksplan direndam dan dikocok agar semua permukaan eksplan mengenai larutan tersebut selama 15 menit. Selanjutnya dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali berturut-turut. Setelah dibilas, tunas dikocok kembali selama 1 menit dengan larutan alkohol 70% (70 ml alkohol + 30 ml air steril) dan dibilas 3 kali menggunakan air steril.

3.4.5 Penanaman eksplan

3.4.5.1 Penanaman tunas stek ubi kayu

Penanaman eksplan tunas satu buku pada media pre-kondisi (1/2 MS). Setelah semua prosedur sterilisasi dikerjakan maka eksplan ditanam didalam botol kultur. Penanaman tunas setek ubi kayu dilakukan dengan memotong bahan tanam (eksplan) yang telah disterilisasi menjadi lebih pendek, yaitu panjang 1 – 2 cm dengan adanya satu mata tunas pada setiap eksplan tersebut. Masing-masing botol kultur ditanami dengan 3 eksplan. Kemudian, dilakukan pelabelan sesuai waktu tanam dan disimpan dalam ruang kultur dengan suhu 23 ± 2 °C dan pencahayaan 24 jam. Penanaman ini akan menghasilkan tunas-tunas steril yang akan masuk ke media perlakuan. Selanjutnya, tunas-tunas yang steril akan diambil daunnya untuk ditanam ke media induksi kalus. Kalus merupakan sekumpulan sel *amorphouse* (tidak berbentuk) yang terbentuk dari sel-sel yang membelah terus menerus secara *in vitro*. Kalus primer adalah kalus yang terbentuk dari eksplan pada tahap inisiasi. Kalus sekunder adalah kalus yang terbentuk dari kalus primer.

3.4.5.2 Penanaman eksplan ke media induksi kalus primer

Eksplan daun dari tunas steril yang digunakan berupa daun muda yaitu daun buku pertama dari bagian pucuk dengan ukuran 2x2 mm, dan daun tua yaitu daun buku ketiga dari bagian pucuk dengan ukuran 5x5 mm. Daun dipotong menggunakan *blade* dengan bentuk persegi yang dibuang bagian tepi daunnya dan di tanam dengan meletakkan bagian bawah daun ke media perlakuan induksi kalus primer (IKP) yaitu pada berbagai konsentrasi media picloram (0; 7,5; 10; 12,5; dan 15 mg/l). Media ini diperkaya dengan ZPT NAA 6 mg/l. Setiap botol terdiri atas 3 eksplan daun. Kemudian, dilakukan pelabelan sesuai dengan perlakuan dan waktu penanaman. Selanjutnya kultur diinkubasi selama 4 minggu pada ruang gelap dengan suhu 23 ± 2 °C.

3.4.5.3 Induksi embriogenesis somatik

Kalus di subkultur setelah kalus berumur 3 – 4 minggu dalam media induksi kalus primer (IKP) dengan memindahkannya atau subkultur pada media induksi embrio somatik (IES) yang terdiri atas media dengan konsentrasi picloram sama dengan media induksi kalus primer dan media dengan kandungan auksin yang lebih rendah. Sebelum di subkultur, kalus ditimbang dan dipotong dengan berat $\pm 0,2$ gram. Kemudian, kalus di subkultur pada media induksi embrio somatik, dan setiap botol berisi tiga kalus. Kalus diinkubasi selama ± 4 minggu di ruang gelap, kemudian diamati pembentukan embrio dan jumlah embrio yang terbentuk. Kegiatan selanjutnya bertujuan untuk menginduksi embrio dan pematangan embrio. Media yang digunakan adalah media yang mengandung ZPT 2,4-D dengan konsentrasi 8 mg/l. Kemudian, digunakan media perlakuan yang mengandung sitokinin BA (Benzyl Adenin) dengan konsentrasi 0,2 mg/l dan 0,4 mg/l untuk perkecambahan embrio dan pembentukan tunas. Pada percobaan ini kalus diinkubasi dalam kondisi terang.

3.5 Variabel Pengamatan

3.5.1 Pengamatan visual

Pengamatan visual dilakukan dari eksplan potongan daun sampai eksplan membentuk kalus embriogenik. Pada pengamatan ini dilihat warna (warna kalus yang berasal dari eksplan daun dapat dilihat sejak tahap dikultur hingga tanaman membentuk kalus), bentuk, struktur (remah atau kompak), munculnya kalus pertama dari eksplan, serta embrio yang terbentuk dan fase kalus embrionik (globular, hati, torpedo, dan kotiledon).

3.5.2 Waktu muncul kalus primer

Pengamatan terhadap waktu muncul kalus dilakukan setiap 2 hari sekali sejak tanaman ditanam di media induksi kalus. Inisiasi pembentukan kalus primer dapat ditandai dengan bagian eksplan yang mengkerut, membesar, dan berwarna putih kekuningan.

3.5.3 Persentase eksplan yang membentuk kalus primer

Variabel ini didapatkan dengan menghitung jumlah eksplan yang membentuk kalus pada 4 MST (Minggu Setelah Tanam) dari masing-masing perlakuan berdasarkan jumlah eksplan keseluruhannya pada perlakuan tersebut. Persentase eksplan berkalus dihitung dengan rumus:

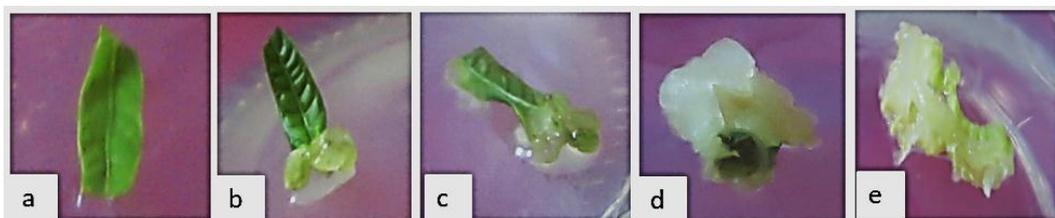
$$\text{Persentase Eksplan Berkalus} = \frac{\text{Jumlah Eksplan Berkalus}}{\text{Jumlah Seluruh Eksplan}} \times 100 \%$$

3.5.4 Persentase kalus per eksplan (*scoring*)

Persentase kalus per eksplan ditentukan dengan adanya skor menggunakan gambar dan interval persentase. Persentase pembentukan kalus pada eksplan dikelompokkan berdasarkan skor yang dapat dilihat pada Tabel 3 dan keragaan pembentukan kalus primer per eksplan untuk setiap nilai skor ditunjukkan pada Gambar 3.

Tabel 3. *Scoring* pembentukan kalus per eksplan

Skor	Interval Pembentukan Kalus per Eksplan (%)	Keterangan
0	0	Kalus belum terbentuk
1	$0 < x \leq 25$	Kalus terbentuk hingga 25 % pada eksplan
2	$26 < x \leq 50$	Kalus terbentuk > 25 % hingga 50 % pada eksplan
3	$51 < x \leq 75$	Kalus terbentuk > 50 % hingga 75 % pada eksplan
4	> 75	Kalus terbentuk > 75 % pada eksplan



Gambar 3. Keragaan pembentukan kalus per eksplan berdasarkan *scoring* a). skor 0, b). skor 1, c). skor 2, d). skor 3, e) skor 4 (Yelli, 2021) (*Unpublished*).

3.5.5 Bobot kalus primer

Bobot kalus primer ditimbang pada umur 4 minggu setelah tanam di media induksi kalus primer yaitu bertepatan dengan subkultur ke media induksi embrio somatik. Bobot kalus dihitung dengan menimbang sampel kalus di setiap perlakuan. Proses penimbangan kalus dilakukan secara steril di dalam LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*).

3.5.6 Jumlah embrio per eksplan

Embrio dapat diamati saat kalus berumur 4 minggu setelah tanam di media induksi embrio somatik. Pengamatan jumlah embrio per eksplan dilakukan menggunakan mikroskop binokuler *Olympus*.

3.5.7 Persentase eksplan berembrio

Variabel ini didapatkan dengan menghitung jumlah eksplan yang membentuk embrio pada 4 minggu setelah tanam dari masing-masing perlakuan berdasarkan jumlah eksplan keseluruhannya pada perlakuan tersebut. Persentase eksplan berembrio dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase Eksplan Berembrio} = \frac{\text{Jumlah Eksplan Berembrio}}{\text{Jumlah Seluruh Eksplan}} \times 100 \%$$

3.6 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila perlakuan menunjukkan perbedaan signifikan, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5% dengan model linier Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1,2,3,\dots,a \quad j = 1,2,3,\dots,b \quad \text{dan} \quad k = 1,2,3,\dots,u$$

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

μ : Rataan Umum.

A_i : Pengaruh Faktor A pada taraf ke-i.

B_j : Pengaruh Faktor B pada taraf ke-j.

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

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

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Konsentrasi picloram berpengaruh dalam menginduksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*, konsentrasi picloram 15 mg/l memberikan respon terbaik yang menghasilkan persentase eksplan berkalus tertinggi (96,30%) dan terendah (74,07%) dan persentase eksplan berembrio tertinggi (17,77%) dan terendah (4,44%).
2. Jenis eksplan yang berpengaruh dalam menginduksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro* adalah eksplan daun muda (pucuk) yang memberikan hasil terbaik pada variabel waktu muncul kalus primer, persentase kalus per eksplan, dan bobot kalus primer.
3. Tidak terdapat interaksi antara konsentrasi picloram dan eksplan dalam induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon Unila UK-1 secara *in vitro*.

5.2 Saran

Pada penelitian ini telah didapatkan prosedur embriogenesis somatik ubi kayu klon Unila UK-1, akan tetapi prosedur tersebut belum sampai pada tahap regenerasi hingga membentuk planlet, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih

lanjut untuk menghasilkan prosedur embriogenesis somatik yang lebih efisien, serta mendapatkan protokol terbaik dalam konversi embrio menjadi planlet hingga menjadi bibit yang telah diaklimatisasi. Untuk peneliti selanjutnya diharapkan dapat melakukan penelitian untuk memperbanyak embrio melalui siklus embrio somatik.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Shara, B., Taha, R.M., and Rashid, K. 2018. Biotechnological methods and limitations of micropropagation in papaya (*Carica papaya* L.) production [Review]. *The J. Anim. Plant Sci.* 28 : 1208-1226.
- Ansyarif, F., Ghazali, M., Muspiah, A., dan Kurnianingsih, R. 2020. Pengaruh ekstrak *Sargassum cristaefolium* pada multiplikasi *Dendrobium antennatum* Rchb.f secara *in vitro*. *Jurnal Ilmiah Biologi.* 8(1) : 18-24.
- Atehnkeng, J., Adetimirin, V.O., Ng, S.Y.C. 2006. Menjelajahi Afrika singkong (*Manihot esculenta* Crantz.) plasma nutfah untuk kompetensi embriogenik somatik. *Jurnal Bioteknologi Afrika.* 5(14) : 1324–1329.
- Badan Pusat Statistik (BPS). 2018. Produksi Ubi Kayu Menurut Provinsi (ton), 1993- 2015. <https://www.bps.go.id/linkTableDinamis/view/id/880>. Diakses 29 Juli 2021.
- Bhatia, S. (2015). Plant Tissue Culture. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences.* Academic Press. India. pp. 31–107.
- Campos, N. A., Panis, B., and Carpentier, S. C. 2017. Somatic embryogenesis in coffee: The evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Frontiers in Plant Science,* 8(1460) : 1 – 12.
- Ceballos, H., Sanchez, T., Morante, N., Fregene, M., Dufour, D., Smith, A.M., Denyer, K., Perez, J.C., Calle, F., and Mestres, C. 2007. Discovery of an amylose-free starch mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *J Agric Food Chem.* 55(18) : 7469 –7476.
- Ceballos, H., Kulakow, P., and Hershey, C. 2012. Cassava breeding: current status, bottlenecks and the potential of biotechnology tools. *Tropical Plant Biology.* 5(1) :73 – 87.
- Ceballos, H., Iglesias, C. A., Perez, J. C., and Dixon, A. G. O. 2004. Cassava Breeding : Opportunities and Challenges. *Plant Molecular Biology.* 56(4):503-516.

- Danso, K. E., and Elegba, W. 2017. *Optimisation of somatic embryogenesis in cassava*. Biotechnologies for Plant Mutation Breeding. Springer Cham. pp.73 – 89.
- Duan, X., Xu, J., and Ling, E. 2013. Expression of Cry1Aa in cassava improves tis insect resistance against *Helicoverpa armigera*. *Plant Mol Biol.* 83(2) : 131–141.
- Dwiyani, R., Yuswanti, H., Darmawati, P. A. I., dan Mayadewi, A. N. N. 2016. *Transformasi Genetik Pada Tanaman Melalui Agrobacterium tumifaciens*. Swasta Nulus. Denpasar.
- Fadilah, R., Ratnasari, E., dan Isnawati 2014. Induksi dan pertumbuhan kalus daun tin (*Ficus carica*) dengan penambahan berbagai kombinasi konsentrasi IBA dan Kinetin pada media MS secara *in vitro*. *Lentera Bio.* 3(3) : 141–146.
- Feitosa, T., Ferreira, L., Ponte, A., Jucá, L., dan Paiva, D. A. D. 2007. *Embriogenesis Somatik pada Genotipe Singkong dari Timur Laut Brasil*. pp. 201–206.
- Fitriani, H. 2016. *Friable Embryogenic Callus (FEC)* sebagai material perbaikan sifat unggul ubi kayu. *BioTrends.* 7(1) : 9–13.
- Fletcher, E. K. A., Amoako, T. N. E., and Twumasi. P. 2011. Effect of 2,4-D, explants type and cultivar on the callogenesis expression of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) in Ghana. *African Journal of Biotechnology.* 10(46) : 9396 – 9401.
- Fondong, Vincent N, and Chrissie Rey. 2018. Recent Biotechnological Advances in the Improvement of Cassava. *Intech Open Scienc.* 140 – 160.
- Guohua, M., Qiusheng, X., 2002. Induksi embriogenesis somatik dan tunas adventif dari daun singkong yang belum matang. *Sel Tumbuhan, Kultur Jaringan dan Organ.* 70 : 281–288.
- Hapsoro, D., dan Yusnita. 2018. *Kultur Jaringan : Teori dan Praktik*. Andi Publisher. Yogyakarta.
- Hapsoro, D., Setiawan, D., Hamiranti, R., dan Yusnita, Y. 2019. Pengaruh 2-IP, BA, 2,4-D, dan TDZ pada embriogenesis somatik *in vitro* kopi robusta unggul Lampung. *Jurnal Agrotek Tropika.* 7(3) : 527.
- Hendaryono, I. D. P. S. dan Wijayani, I. A. 1994. *Teknik kultur jaringan, pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman secara Vegetatif-Modern*. Kanisius. Yogyakarta.

- Jennings, D. L and Iglesias, C. 2002. *Breeding for Crop Improvement in Cassava Biology, Production and Utilization*, eds. R.J. Hillocks., J.M. Thresh and A.C. Belotti. *CAB International*. pp.149-164.
- Joseph, R., Yeoh, H. H., Loh, C. S. 2004. Induced Mutations in Cassava Using Somatic Embryos and The Identification of Mutant Plants With Altered Starch Yield and Composition. *Plant Cell Reports*. 23(2): 91-98.
- Lemma, R. B. 2011. *Factors influencing micropropagation and somatic embryogenesis of two, Kello and Qulle, cassava varieties*. Thesis. University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Master of Science in Biotechnology. 62 hlm.
- Mahadi, I., Wulandari, S., dan Omar, A. 2014. Pembentukan kalus tanaman rosella (*Hibiscus sabdariffa*) pada pemberian Naphthalene Acetic Acid (NAA) dan Benzyl Amino Purin (BAP) sebagai sumber belajar konsep bioteknologi. *Jurnal Biogenesis*. 11 (1) : 1 – 6.
- Mahadi, I., Syafi'I, W. dan Sari Y. 2016. Induksi kalus jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*) menggunakan hormon 2,4-D dan BAP dengan metode in vitro. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 21 (2) : 84 – 89.
- Meli, H., Noli, Z. A., dan Suwirmen. 2019. Induksi Kalus Tanaman Puspa (*Schima wallichii* (DC.) Korth) dengan Penambahan Beberapa Konsentrasi Benzyl Amino Purin (BAP) dan 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D). *Jurnal Biologi Universitas Andalas (J. Bio. UA.)*. 7(1) : 1–5.
- Mongomake, K., Doungous, O., Khatabi, B., and Fondong. V. N. 2015. Somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) landraces from Cameroon. *Springer Plus*. 4(477) : 1– 12.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. Media yang direvisi untuk pertumbuhan yang cepat dan bioassay dengan kultur jaringan tembakau. *Physiologia Plantarum*. 15 : 473
- Ntui, V.O., Kong, K., Khan, R. S., and Igawa, T. 2015. Resistance to Sri Lankan Cassava Mosaic Virus (SLCMV) in Genetically Engineered Cassava Cv. KU50 through RNA Silencing. *Plos One*. Pp. 1–23.
- Pardal, S. J. 2002. Perkembangan Penelitian Regenerasi dan Transformasi Pada Tanaman Kedelai. *Buletin AgroBio*. 5(2):37–44.
- Priadi, D., dan Sudarmonowati, E. 2006. Pengaruh komposisi media dan ukuran eksplan terhadap pembentukan kalus embriogenik beberapa genotip lokal ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.). *Biodiversitas*. 7(3):69-272.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Buletin AgroBio*. 5(2):51-58.

- Raemakers, CJJM., Sofiari, E., Taylor, N., Henshaw, G., Jacobsen, E., and Visser, RGF. 1996. Production of Transgenic Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Plants by Particle Bombardment Using Luciferase Activity as Selection Marker. *Molecular breeding : new strategies in plant improvement*. 2(4) : 339 – 49.
- Raemakers, K., Schreuder, M., Pereira, I., Munyikwa, T., Jacobsen, E., and Visser, R. 2001. Progress made in FEC transformation of cassava. *Euphytica*. 120:15–24.
- Raemakers, KJJM, Bessembinder, J., Staritsky, G., Jacobsen, E., Visser, RGF, 1993. Induksi, perkecambahan dan perkembangan tunas embrio somatik singkong. *Kultur Sel Tumbuhan, Jaringan dan Organ*. 33 : 151-156.
- Rasud, Y. dan Bustaman. 2020. Induksi kalus secara in vitro dari daun cengkeh (*Syzigium aromatic* L.) dalam media dengan berbagai konsentrasi auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*. 25 (1) : 67 – 72.
- Rossin, C. B., and 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.
- Rukmana, R. 2009. *Usaha Tani Kentang Sistem Mulsa Plastik*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Saelim, L., Phansiri, S., Netrphan, S., Suksangpanomrung, M., dan Narangajavana, J. 2006. Optimalisasi dari *In vitro* Embriogenesis Somatik Siklik dan Regenerasi Ubi Kayu Asia (*Manihot esculenta* Crantz.) untuk Sistem Manipulasi Genetik. *Jurnal Global Bioteknologi & Biokimia*. 1(1) : 07 – 15.
- Sanghera, G. S., Wani, S. H., and Kashyap, P. L. 2010. Application In Crop Plants. *New Biology*. pp. 34 – 77.
- Santoso, U dan Nursandi, F. 2002. *Kultur Jaringan Tanaman*. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang.
- Sholeha, W., Sugiharto, B., Setyati, D., and Dewanti, P. 2015. Induction somatic embryogenesis used 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) and Kinetin in spindle leaf explant sugarcane. *Jurnal Ilmu Dasar*. 16(1) : 17.
- Sudarmonowati, E., Hartati, R., Taryana, T. 2002. *Produksi Tunas, Regenerasi dan Evaluasi Hasil Ubi Kayu (Manihot esculenta) Indonesia Asal Kultur Jaringan di Lapangan*. Cibinong (ID): Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI.
- Sugiyama, M. 1999. Organogenesis *in vitro*. *Opinion on Plant Biology*. 2(1) : 61–64.

- Sunandar, A., Dorly, and Supena, E. D. J. 2017. Induction of somatic embryogenesis in sengon (*Falcataria moluccana*) with thidiazuron and light treatments. *Hayati Journal of Biosciences*. 24(2), 105–108.
- Sutjahjo, S. H. 1994. *Induksi Keragaman Somaklonal ke Arah Ketenggangan Terhadap Keracunan Aluminium pada Tanaman Jagung*. Progam Pasca Sarjana, IPB. Bogor.
- Szabados, L., R. Hoyos., and W. Roca. 1987. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Reports*. 6(3):248 – 251.
- Tanaka, K., Ohno, M., and Largo, D. B. 2020. An Update on the Seaweed Resources of Japan. *Botanica Marina*. (1):105–17.
- Taylor, N. J., Masona, M.V., Carcamo, R., Ho, T., Schöpke, C., Fauquet, C. M. 2001. Production of embryogenic tissues and regeneration of transgenic plants in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Euphytica*. 120 : 25 – 34.
- Titov, S., Bhowmik, S.K., Mandal, A., Alam, M.S. and Uddin, S.N. 2006. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa* spp. cv Kanthali floral bud explants. *Am. J Biochem Biotechnol*. 2(3) : 97-104.
- Tonukari N. J. 2004. Cassava and the future of starch. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7 : 1982–85.
- Urbano, M. G. and Goni. 2002. Bioavailability of nutrient in rats fed on edible seaweeds, nori (*Porphyra tenera*) and wakame (*Undaria pinnatifada*) as a source of dietary fibre. *J. Food Chem*. 76 : 281 – 286.
- Utomo S. D., Erwin Y., Yafizham, dan Edy, A. 2015. Perakitan Varietas Unggul Ubi Kayu Berdaya Hasil Tinggi Dan Sesuai Untuk Produksi Bioetanol Melalui Hibridisasi, Seleksi Dan Uji Daya Hasil. Proposal Penelitian Strategi Nasional. Hlm 12 – 13.
- Utomo, S. D., Napitupulu, K. D. Y., Sunyoto, dan Subeki. 2019. Uji Organoleptik Klon-Klon Daun Ubi Kayu Sayur. In: Seminar Nasional Perhimpunan Hortikultura Indonesia (PERHORTI). Bogor (*Unpublished*).
- Vidal, A.M., Costa, M.A.P.C., Souza, A.S., Almeida, W.A.B., Souza, F.V.D. 2014. *In vitro* regeneration and morphogenesis of somatic embryos of cassava. *Revista Ciencia Agronomica Journal*. 45 (3) : 558 – 565.
- Yelli, F. 2021. Keragaan Pembentukan Kalus Per Eksplan Berdasarkan *scoring*. Proposal Penelitian. Universitas Lampung. Lampung (*Unpublished*).

Zainuddin, I. M., Schlegel, K., Gruissem, W., and Vander schuren, H. 2012. Robust transformation procedure for the production of transgenic farmer-preferred cassava landraces. *Plant Methods*. 8 : 24.

Zhao, S., Dufour, D., Teresa, S., Ceballos, H., and Zhang, P. 2011. Development of waxy cassava with different biological and physico-chemical characteristics of starches for industrial applications. *Biotechnology and Bioengineering*. 108 : 1925–35.