

**PENGARUH PICLORAM DAN *NAPHTHALENE ACETIC ACID* (NAA)
TERHADAP PEMBENTUKAN KALUS PRIMER PADA
EMBRIOGENESIS SOMATIK *IN VITRO* UBI KAYU (*Manihot esculenta*
Crantz) KLON UJ-5 DENGAN MENGGUNAKAN EKSPAN POTONGAN
DAUN**

Skripsi

Oleh

Ifan Maulana Putra



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

ABSTRAK

PENGARUH PICLORAM DAN *NAPHTHALENE ACETIC ACID* (NAA) TERHADAP PEMBENTUKAN KALUS PRIMER PADA EMBRIOGENESIS SOMATIK *IN VITRO* UBI KAYU (*Manihot esculenta* *Crantz*) KLON UJ-5 DENGAN MENGGUNAKAN EKSPLAN POTONGAN DAUN

Oleh

IFAN MAULANA PUTRA

Salah satu upaya untuk memperbaiki sifat genetik ubi kayu adalah dengan pendekatan bioteknologi melalui transformasi genetik tanaman dengan syarat ketersediaan kultur morfogenik melalui embriogenesis somatik. UJ-5 adalah klon unggulan yang banyak ditanam oleh petani di Lampung. Keunggulan ubi kayu jenis ini adalah mampu memproduksi tinggi dan memiliki kadar pati yang tinggi. Penelitian ini bertujuan menghasilkan bahan tanaman dalam perbaikan genetik tanaman ubi kayu klon UJ-5 dengan beberapa konsentrasi picloram dan tambahan NAA pada media induksi kalus embriogenik. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktorial (2x4). Faktor pertama adalah umur eksplan (E) terdiri atas dua taraf, E1 = daun muda, E2 = daun tua. Faktor kedua yaitu konsentrasi picloram (M) yang terdiri atas 4 taraf, M1 = 7,5 mg/l, M2 = 10 mg/l, M3 = 12,5 mg/l, M4 = 15 mg/l picloram dengan penambahan NAA 6 mg/l setiap perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu induksi kalus tercepat diperoleh pada E1 yaitu 8,98 HST, sedangkan pada E2 diperoleh 15,27 HST. Umur eksplan yang berpengaruh nyata terhadap rata-rata skoring pembentukan kalus per eksplan 1 MSI adalah E1 dengan skor 1,24 (25%), sedangkan E2 diperoleh skor 0,21 (5%). Seluruh perlakuan berhasil menginduksi kalus, sehingga didapatkan persentase eksplan berkalus adalah 100%. Persentase eksplan berembrio pada E1 diperoleh pada media IKP dengan konsentrasi picloram 7,5 mg/l yang disubkultur ke media IES dengan konsentrasi picloram + NAA yang sama yaitu 25%. Sedangkan pada E2 diperoleh persentase eksplan yang berembrio pada media IKP dengan konsentrasi picloram 15 mg/l yang disubkultur ke media IKP (Picloram 0 mg/l + NAA 0 mg/l) sebesar 25%. Interaksi antara picloram dan umur

eksplan berpengaruh nyata terhadap bobot segar kalus primer 4 MSI dengan bobot kalus tertinggi diperoleh pada konsentrasi picloram 7,5 mg/l pada E1 yaitu 1,88 gram. Sedangkan pada E2 diperoleh bobot kalus tertinggi pada konsentrasi picloram 15 mg/l sebesar 1,73 gram.

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

**PENGARUH PICLORAM DAN NAPHTHALENE ACETIC ACID (NAA)
TERHADAP PEMBENTUKAN KALUS PRIMER PADA EMBRIOGENESIS
SOMATIK *IN VITRO* UBI KAYU (*Manihot esculenta Crantz*) KLON UJ-5
DENGAN MENGGUNAKAN EKSPAN POTONGAN DAUN**

Oleh

IFAN MAULANA PUTRA

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 : **PENGARUH PICLORAM DAN NAPHTHALENE ACETIC ACID (NAA) TERHADAP PEMBENTUKAN KALUS PRIMER PADA EMBRIOGENESIS SOMATIK *IN VITRO* UBI KAYU (*Manihot esculenta Crantz*) KLON UJ-5 DENGAN MENGGUNAKAN EKSPLAN POTONGAN DAUN**

Nama : **Ifan Maulana Putra**

NPM : 1814161034

Program Studi : Agronomi


Fakultas : Pertanian



1. Komisi Pembimbing

Pembimbing Pertama

Pembimbing Kedua


Fitri Yelli, S.P., M.Si., Ph.D.
NIP 197905152008122005


Prof. Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc.
NIP 196104021986031003

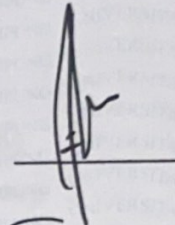
2. Ketua Jurusan Agronomi dan Hortikultura


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

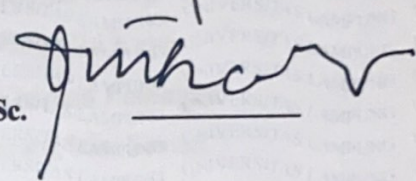
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Fitri Yelli, S.P., M.Si., Ph.D.

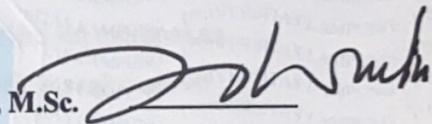


Sekretaris : Prof. Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc.



Penguji

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



2. Dekan Fakultas Pertanian



Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.
NIP 196110201986031002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 30 Agustus 2022

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini, menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul **“Pengaruh Picloram dan *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) terhadap Pembentukan Kalus Primer pada Embriogenesis Somatik *In Vitro* Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz) Klon UJ-5 dengan Menggunakan Eksplan 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, 30 Agustus 2022



Ifan Maulana Putra

NPM 1814161034

RIWAYAT HIDUP



Penulis yang bernama Ifan Mauulana Putra dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 21 April 2000 merupakan anak pertama dari dua bersaudara dari Bapak Supriyadi dan Ibu Ida Rahayu S. Adik penulis bernama Reva Aulia Ramadhani. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SDN 3 Way Urang Kecamatan Kalianda pada tahun 2006 – 2012. Pendidikan menengah pertama penulis ditempuh di SMP N 1 Kalianda pada tahun 2013 – 2015. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan menengah atas di SMA N 1 Kalianda dan lulus pada tahun 2018.

Tahun 2018 penulis melanjutkan pendidikan di Universitas Lampung, Jurusan Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian. Pada tahun 2021, penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata di Kelurahan Wai Lubuk, Kecamatan Kalianda, dan pada tahun yang sama penulis juga melaksanakan Praktik Umum di BPTP Lampung. Penulis juga berkesempatan menjadi asisten praktikum mata kuliah Bioteknologi Pertanian, dan Kultur Jaringan Tanaman. Penulis juga aktif pada kegiatan organisasi mahasiswa sebagai anggota Kaderisasi dan Organisasi periode 2019–2020 dan sebagai Wakil Ketua Umum HIMAGRHO periode 2021. Selama penyusunan tugas akhir penulis melaksanakan penelitian kultur jaringan di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

PERSEMBAHAN

Sebagai rasa bakti, hormat, dan tanggung jawab,
kupersembahkan karya sederhana ini Kepada:

Keluarga yang kucintai dan kusayangi
Bapak Supriyadi, Ibu Ida Rahayu S, dan Adik Reva Aulia
Ramadhani

Almamater tercinta
Universitas Lampung

“Jangan pernah berhenti untuk belajar, karena hidup tak pernah berhenti untuk mengajarkan”

(Prof. Dr. Ir. Dwi Hapsoro M.Sc.)

“Tanamkan kejujuran pada setiap elemen kehidupan sebagai bekal untuk menggapai masa depan”

(Fitri Yelli, S.P. M.Si., Ph.D.)

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya. Dia mendapat (pahala) dari (kebajikan) yang dikerjakannya dan dia mendapat (siksa) dari (kejahatan) yang diperbuatnya”

(Q.S. Al-baqarah:286)

“Hidup yang tidak teruji adalah hidup yang tidak layak untuk dihidupi. Tanda manusia masih hidup adalah ketika ia mengalami ujian, kegagalan, dan penderitaan”

SANWACANA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas limpahan Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Picloram dan *Napthalene Acetic Acid* (NAA) terhadap Pembentukan Kalus Primer pada Embriogenesis Somatik *In Vitro* Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz) Klon UJ-5 Menggunakan Eksplan Potongan Daun”**. Pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih 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 Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
3. Ibu Fitri Yelli, S.P., M.Si., Ph.D., selaku Pembimbing Utama sekaligus pemberi ide penelitian yang telah memberikan nasihat, saran, dan meluangkan waktu untuk bimbingan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Bapak Prof. Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc., selaku Pembimbing Kedua yang telah meluangkan waktu, nasihat, saran, dan bimbingannya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Bapak Prof. Dr. Ir. Setyo Dwi Utomo, M.Sc., selaku penguji yang telah memberikan nasihat dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

6. Ibu Dr. Ir. Maria Viva Rini, M.Sc., selaku pembimbing akademik penulis yang telah memberikan nasihat dan saran selama penulis kuliah di Jurusan Agronomi dan Hortikultura.
7. Panca Rahayu Anggi, Titin Agustin, Susanto selaku partner penelitian ubi kayu yang telah memberi bantuan, semangat, dan motivasinya selama penulis melaksanakan penelitian.
8. Keluarga besar Laboratorium Kultur Jaringan 2021 , Mba Hayane Adeline Warganegara, Mba Rahmadyah Hamiranti, Mba Dwi Septiani, Mba Aulia Shaffna, M Alipha, Ajeng Windi, Ni Sayu Putu, Meisy Lestari, Mba Emi Yunida, Mba Muna, Mba Alen, Mba Mitha yang telah memberikan bantuan, semangat, motivasinya, dan telah meramaikan suasana Laboratorium.
9. Sahabat Presidium Inti: Rafi Satya Bagaskara, Adinda Nurulita, Tarissa Bunga yang telah kebersamai penulis dalam keadaan suka maupun duka pada masa kepengurusan HIMAGRHO periode 2021, memberikan semangat dan motivasinya.
10. Anggota-anggota HIMALANG: Galang Fairroman, M Alipha, M Maqrus, Rafi Satya, Amir Hakam, dan Cahya Adi yang telah memberikan semangat dan motivasi, serta menjadi tempat keluh kesah penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
11. Secara khusus penulis menyampaikan Terima kasih sebesar-besarnya kepada Ibunda Ida Rahayu S dan Ayahanda Supriyadi, serta adinda Reva Aulia Ramadhani, atas curahan kasih sayang, dorongan moril dan materil, sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan.
12. Semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung kepada penulis dalam melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	i
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan.....	5
1.3 Kerangka Pemikiran	5
1.4 Hipotesis	8
II. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Botani Tanaman Ubi Kayu	9
2.2 Kultur Jaringan dan Embriogenesis Somatik Ubi Kayu	10
2.3 Penggunaan Zat Pengatur Tumbuh	12
2.4 Kalus Embriogenik.....	13
III. METODE PENELITIAN	14
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	14
3.2 Alat dan Bahan	14
3.3 Metode Penelitian.....	15
3.4 Pelaksanaan Penelitian	16
3.4.1 Sterilisasi Alat	16
3.4.2 Pembuatan Media.....	17
3.4.3 Persiapan Eksplan	19
3.4.4 Sterilisasi Tunas Ubi Kayu Sumber Eksplan	19
3.4.5 Penanaman Eksplan	20
3.4.6 Induksi Embrio Somatik	21

3.4.7	Variabel Pengamatan	21
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	24
4.1	Hasil Penelitian.....	24
4.1.1	Penampilan visual kalus primer	24
4.1.2	Visualisasi embrio somatik	26
4.1.3	Rekapitulasi Analisis Ragam	27
4.1.3.1	Waktu muncul kalus primer	28
4.1.3.2	Bobot segar kalus 4 MSI.....	29
4.1.3.3	Persentase eksplan berkalus 4 MSI.....	30
4.1.3.4	Persentase Pembentukan Kalus per Eksplan 1 MSI.....	30
4.1.3.5	Persentase eksplan berembrio.....	31
4.2	Pembahasan	32
V.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	40
5.1	Kesimpulan.....	40
5.2	Saran.....	40
	DAFTAR PUSTAKA	42
	LAMPIRAN.....	47

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi media Murashige dan Skoog (1962).....	17
2. ZPT dan konsentrasi induksi kalus primer yang ditambahkan ke dalam media dasar Murashige dan Skoog (1962).....	18
3. Media induksi kalus embriogenik	18
4. Skoring pembentukan kalus primer per eksplan	23
5. Rekapitulasi analisis ragam pengaruh klon ubi kayu dan konsentrasi picloram	28
6. Pengaruh interaksi antara umur eksplan dan konsentrasi picloram terhadap bobot segar kalus primer 4 MSI	29
7. Persentase eksplan membentuk kalus pada semua perlakuan.....	30
8. Persentase eksplan berembrio (%)	32
9. Pengaruh umur eksplan dan konsentrasi picloram terhadap waktu muncul kalus primer 4 MSI.	48
10. Hasil analisis ragam pengaruh umur eksplan dan konsentrasi picloram terhadap waktu muncul kalus primer 4 MSI.....	48
11. Hasil uji BNT pengaruh umur eksplan terhadap waktu muncul kalus primer 4 MSI.	49
12. Pengaruh umur eksplan dan konsentrasi picloram terhadap bobot segar kalus primer 4 MSI.	49
13. Hasil analisis ragam pengaruh umur eksplan dan konsentrasi picloram terhadap bobot segar kalus primer 4 MSI.....	50
14. Tabel interaksi pengaruh umur eksplan dan konsentrasi picloram terhadap bobot segar kalus primer 4 MSI.....	50

15. Pengaruh umur eksplan dan konsentrasi picloram terhadap persentase pembentukan eksplan 4 MSI.	50
16. Pengaruh umur eksplan dan konsentrasi picloram terhadap persentase pembentukan kalus per eksplan 1 MSI.....	51
17. Hasil analisis ragam pengaruh umur eksplan dan konsentrasi picloram terhadap persentase pembentukan kalus per eksplan 1 MSI.....	51
18. Hasil uji BNT pengaruh umur eksplan terhadap persentase pembentukan kalus per eksplan 1 MSI	52
19. Pengaruh umur eksplan dan konsentrasi picloram terhadap persentase pembentukan kalus per eksplan 4 MSI.....	52
20. Hasil analisis ragam pengaruh umur eksplan dan konsentrasi picloram terhadap pembentukan kalus per ekpslan 4 MSI	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bagan kerangka pemikiran.....	7
2. Bagan arah subkultur dari media induksi kalus primer.....	22
3. Keragaan pembentukan kalus per eksplan berdasarkan nilai skor...	24
4. Penampilan visual kalus pada eksplan berumur 1 MSI.	24
5. Penampilan visual kalus pada eksplan berumur 4 MSI	25
6. Visualisasi embrio pada eksplan daun muda; a) fase globular b) fase torpedo; c) fase kotiledon	26
7. Visualisasi embrio pada eksplan daun tua di media induksi embriogenesis somatik; a) fase globular; b) fase torpedo c) fase kotiledon	27
8. Penampilan kotiledon berumur 2 MST yang berasal dari E2 setelah disubkultur ke media BA 0,4 mg/l.....	27
9. Diagram pengaruh eksplan terhadap waktu muncul kalus primer ubi kayu.....	29
10. Diagram pengaruh umur eksplan terhadap persentase pembentukan kalus per eksplan 1 MSI.....	31

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salah satu komoditas unggulan pertanian di Indonesia termasuk di Provinsi Lampung adalah ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz). Indonesia merupakan produsen ubi kayu terbesar keempat setelah Nigeria, Thailand, dan Brazil (FAO, 2016). Nigeria merupakan negara penghasil komoditi ubi kayu terbesar di dunia, FAO mencatat sepanjang tahun 2016 Nigeria mampu menghasilkan ubi kayu sebanyak 57.134.478 ton. Sementara, Thailand menempati urutan kedua dengan jumlah produksi ubi kayu pada tahun 2016 sebesar 31.161.000 ton. Kemudian, disusul Brasil menempati urutan ketiga dengan jumlah produksi ubi kayu sebesar 21.082.867 ton, dan Indonesia dengan jumlah produksi ubi kayu di Indonesia berdasarkan catatan FAO pada tahun 2016 sebanyak 20.744.674 ton (FAO, 2016).

Provinsi Lampung merupakan salah satu provinsi penghasil ubi kayu terbesar di Indonesia. Pada tahun 2013 produksi ubi kayu yang dihasilkan Provinsi Lampung mengalami kenaikan mencapai 8,33 juta ton umbi basah dengan luas panen 318.107 hektar. Produksi ini menyuplai sepertiga dari total produksi ubi kayu nasional (Badan Pusat Statistik, 2014). Diperkirakan kebutuhan ubi kayu pada tahun 2025 yaitu 30 juta ton ubi kayu segar, dan untuk memenuhi kebutuhan tersebut diperlukan peningkatan produksi ubi kayu sekitar 27% (Suryana, 2006). Oleh karena itu, perlu adanya upaya untuk meningkatkan produksi dan produktivitas ubi kayu tersebut antara lain dengan cara penyediaan benih bermutu dan berkualitas tinggi dari varietas unggul. Perakitan varietas unggul ubi kayu dapat dilakukan melalui perbaikan genetik, baik melalui persilangan konvensional

maupun melalui pendekatan bioteknologi tanaman atau rekayasa genetik, salah satunya yaitu melalui transformasi genetik.

Perakitan varietas unggul ubi kayu secara konvensional telah dilakukan terutama untuk merakit varietas yang memiliki kandungan nutrisi yang tinggi, tahan terhadap stres dan cekaman serta mempunyai kandungan pati yang tinggi (Ceballos, 2012). Namun ada beberapa faktor yang menyebabkan keterbatasan dalam metode pemuliaan tradisional yaitu keterbatasan sumber genetik yang bermanfaat, heterozigositas dan allopoloidi pada genom *cassava*, sistem pembungaan yang tidak teratur, benih sedikit, viabilitas dan daya perkecambahan benih rendah (Sanghera *et al.*, 2010).

Untuk mengatasi permasalahan tersebut dilakukan pendekatan bioteknologi salah satunya melalui transformasi genetik tanaman. Transformasi genetik merupakan salah satu kegiatan manipulasi genetik dengan melakukan introduksi DNA rekombinan yang sebelumnya telah disisipkan ke dalam vektor sel inang yang sesuai. Perbaikan sifat tersebut menggunakan sel target berupa embrio somatik yang diperoleh melalui teknik kultur jaringan jalur embriogenesis somatik (Fitriani, 2016). Keberhasilan transformasi genetik bergantung pada kemampuan sel target untuk berkembang menjadi tanaman utuh. Transformasi genetik melalui jaringan embriogenik merupakan metode yang efektif untuk perbaikan genetik ubi kayu (Priadi dan Sudarmonowati, 2006).

Embriogenesis somatik merupakan proses yang sangat efisien untuk mikropropagasi dan regenerasi beberapa genotipe ubi kayu karena memungkinkan meningkatkan laju multiplikasi dan produksi embrio yang mampu berkembang menjadi tanaman utuh (Ibaraki dan Murata, 2001). Dari 26 keberhasilan transformasi genetik yang dilaporkan (Zhang *et al.*, 2017), 89% menggunakan sistem regenerasi tanaman via embriogenesis somatik (jaringan embriogenik) dan sisanya menggunakan organogenesis dari tunas. Embriogenesis somatik adalah proses pembentukan embrio secara *de novo* (terbentuk baru) dari jaringan eksplan yang sebelumnya tidak bermeristem (Hapsoro dan Yusnita, 2018).

Sistem regenerasi melalui embriogenesis somatik dapat terjadi melalui dua acara yaitu secara langsung tanpa melalui pembentukan kalus dan secara tidak langsung. Pada penelitian ini menggunakan embriogenesis somatik secara tidak langsung (*indirect somatic embryogenesis*) yang melalui pembentukan kalus. Kalus adalah sekumpulan sel yang membelah diri secara cepat sekaligus tidak memiliki karakteristik sel-sel dari bagian jaringan, organ, atau struktur tanaman tertentu. Pada embriogenesis somatik tidak langsung, dengan perlakuan tertentu sel-sel kalus dapat diarahkan untuk berubah menjadi sel-sel yang akan membentuk embrio. Sel-sel yang memiliki karakteristik dapat menjadi embrio disebut sel-sel embriogenik. Embriogenesis somatik banyak dimanfaatkan pada perbanyakan vegetatif tanaman secara massal untuk menghasilkan bibit tanaman dalam jumlah segar dalam waktu singkat. Selain itu, embriogenesis somatik *in vitro* juga dapat digunakan sebagai wahana untuk menghasilkan varietas unggul, misalnya melalui induksi variasi somaklonal, genom editing dan rekayasa genetika (Hapsoro dan Yusnita, 2018).

Kultur jaringan tanaman membutuhkan zat pengatur tumbuh (ZPT). Telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mendapatkan prosedur yang tepat dalam embriogenesis somatik tanaman ubi kayu terkait penggunaan jenis dan konsentrasi ZPT dalam rangka memperbanyak tanaman secara efektif dan efisien. Auksin memegang peranan penting pada embriogenesis somatik (Hapsoro dan Yusnita, 2018). Auksin merupakan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang dapat menginduksi embriogenesis somatik. Beberapa jenis auksin yang dilaporkan pada penelitian ubi kayu adalah 2,4-D, NAA, Dicamba, TDZ, IAA, dan Picloram. Dalam pembentukan embriogenesis somatik untuk fase pembentukan kalus dibutuhkan zat pengatur tumbuh jenis auksin kuat, sedangkan untuk fase selanjutnya konsentrasi auksin harus di kurangi dan kemudian di kombinasikan dengan sitokinin (Lestari, 2010).

Picloram adalah zat pengatur tumbuh golongan auksin kuat yang banyak digunakan dalam menginduksi kalus. Sementara itu Hankoua *et al.*, (2006) melaporkan bahwa 12 mg L⁻¹ picloram mampu menginduksi terbentuknya embrio somatik secara efisien pada sejumlah kultivar ubi kayu Afrika. Atehnkeng *et al.*

(2006) meneliti beberapa varietas ubi kayu Afrika dan memperoleh hasil embriogenik serupa dengan menggunakan dua konsentrasi picloram (8 dan 12 mg L⁻¹). Penelitian Taylor *et al.*, (1996) menunjukkan bahwa media GD yang ditambah picloram telah berhasil dalam menginduksi kalus embriogenik ubi kayu secara efisien, sedangkan media MS komposisi penuh maupun setengah komposisi direkomendasikan untuk diferensiasi dan perkembangan embrio somatik ubi kayu yang mampu berkecambah (Groll *et al.*, 2002). Beberapa penelitian tersebut menunjukkan bahwa kapasitas pembentukan embrio somatik tergantung pada genotipe, jenis eksplan, dan komposisi media.

UJ-5 adalah klon unggulan yang banyak ditanam oleh petani di Lampung. Keunggulan ubi kayu jenis ini adalah mampu memproduksi tinggi dan memiliki kadar pati yang tinggi. Pada penelitian ini akan dilakukan induksi embriogenesis somatik tanaman ubi kayu klon UJ-5 untuk menghasilkan bahan tanaman dalam perbaikan genetik tanaman ubi kayu klon UJ-5 dengan beberapa konsentrasi picloram dan tambahan NAA pada media induksi kalus embriogenik. Selanjutnya apabila hasil embriogenesis somatik klon ini mampu berkembang dengan baik, maka akan dijadikan bahan tanaman untuk rekayasa genetik guna memperoleh sifat-sifat yang diinginkan. Penelitian ini dilakukan untuk menjawab masalah yang dirumuskan dalam pertanyaan sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi picloram untuk induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon UJ-5 secara *in vitro*?
2. Bagaimana pengaruh umur eksplan dalam induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon UJ-5 secara *in vitro*?
3. Apakah terdapat interaksi antara konsentrasi ZPT dan umur eksplan dalam induksi kalus dan embrio somatik ubi kayu klon UJ-5 secara *in vitro*.

1.2 Tujuan

Berdasarkan identifikasi dan perumusan masalah di atas, dapat dirumuskan tujuan penelitian sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh konsentrasi picloram dalam menginduksi kalus primer dan embrio somatik pada kultur *in vitro* tanaman ubi kayu klon UJ-5.
2. Mengetahui pengaruh umur eksplan dalam induksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon UJ-5 secara *in vitro*.
3. Mengetahui interaksi antara konsentrasi picloram dan umur eksplan dalam induksi kalus dan embrio somatik ubi kayu klon UJ-5 secara *in vitro*.

1.3 Kerangka Pemikiran

Rendahnya produksi ubi kayu baik secara kualitas maupun kuantitas disebabkan karena masih terdapat beberapa kelemahan dari klon ubi kayu yang digunakan, seperti mudah terserang penyakit, rendahnya kandungan amylose, heterozigositas yang tinggi, serta fertilitas yang rendah. Oleh karena itu, perlu adanya upaya perbaikan varietas tersebut. Upaya perbaikan sifat varietas bisa melalui persilangan secara konvensional atau melalui pendekatan bioteknologi. Namun, persilangan secara konvensional terdapat beberapa kendala, antara lain keterbatasan sumber genetik yang bermanfaat, heterozigositas dan allopoloidi pada genom cassava, sistem pembungaan yang tidak teratur, benih sedikit, viabilitas dan daya perkecambahan benih rendah (Gambar 1).

Untuk mengatasi permasalahan tersebut, pendekatan melalui bioteknologi dirasa lebih menjanjikan. Disamping itu beberapa penelitian perbaikan genetik ubi kayu, melalui pendekatan bioteknologi telah banyak dilakukan. Hankoua *et al.*, (2006) melaporkan bahwa 12 mg L⁻¹ picloram mampu menginduksi terbentuknya embrio somatik secara efisien pada sejumlah kultivar ubi kayu Afrika. Atehnkeng *et al.* (2006) meneliti beberapa varietas ubi kayu Afrika dan memperoleh hasil embriogenik serupa dengan menggunakan dua konsentrasi picloram (8 dan 12 mg

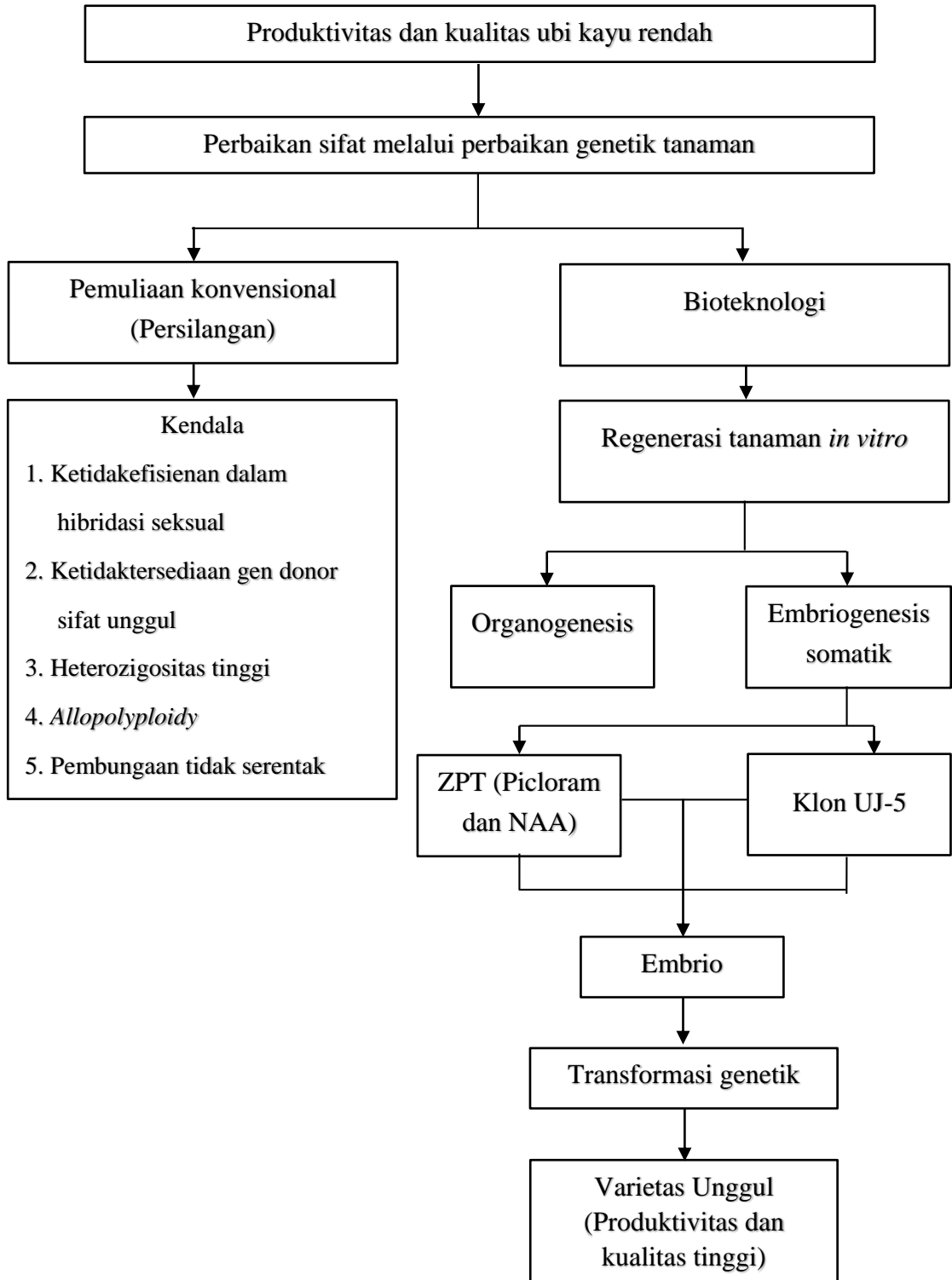
L-1). Tingkat keberhasilan transformasi genetik ubi kayu menggunakan sistem regenerasi tanaman via embriogenesis somatik (jaringan embriogenik) yaitu 89% dan sisanya menggunakan organogenesis dari tunas. Berdasarkan penelitian tersebut, embriogenesis somatik merupakan metode yang lebih efektif untuk perbaikan genetik melalui transformasi genetik.

Proses embriogenesis terbagi menjadi dua, yaitu embriogenesis secara langsung dan secara tidak langsung. Pada embriogenesis secara langsung, eksplan langsung membentuk embrio yang selanjutnya dikedambahkan, sedangkan secara tidak langsung terjadi pembentukan kalus terlebih dahulu yang kemudian kalus embriogenik diperbanyak agar dapat menghasilkan embrio dengan jumlah yang lebih banyak. Umumnya embriogenesis secara tidak langsung lebih banyak diterapkan karena dapat menghasilkan embrio yang lebih banyak.

Perbanyak tanaman melalui embriogenesis somatik *in vitro* membutuhkan zat pengatur tumbuh (ZPT). Namun, respons morfogenetik tanaman terhadap ZPT yang diberikan berbeda-beda terhadap spesies. Artinya tidak semua kultivar atau genotipe ubi kayu responsif terhadap pembentukan embriogenesis somatik. Oleh sebab itu, varietas, sumber dan jenis eksplan awal serta komposisi media dan konsentrasi zat pengatur tumbuh merupakan faktor penting dalam pembentukan embriogenesis somatik ubi kayu. Penelitian menggunakan berbagai konsentrasi picloram dan NAA terus dilakukan untuk mendapatkan prosedur yang tepat yang dapat menginduksi kalus, membentuk embrio, dan menghasilkan bibit dalam bentuk planlet normal yang paling baik pada eksplan daun dari kultur steril ubi kayu klon UJ-5.

Picloram merupakan zat pengatur tumbuh golongan auksin kuat yang banyak digunakan dalam menginduksi kalus. Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa picloram dan 2,4-D merupakan zat pengatur tumbuh yang paling sering digunakan untuk induksi embriogenesis pada tanaman ubi kayu (Hankoua *et al.*, 2006). Hankoua *et al.*, (2006) melaporkan bahwa 12 mg/l picloram mampu menginduksi terbentuknya embrio somatik secara efisien pada sejumlah kultivar ubi kayu Afrika.

Berdasarkan kerangka pemikiran di atas, maka disusun dalam bentuk bagan sebagai berikut (Gambar 1).



Gambar 1. Bagan kerangka pemikiran

1.4 Hipotesis

Berdasarkan kerangka pemikiran yang telah dikemukakan, dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut :

1. Terdapat pengaruh konsentrasi picloram untuk induksi kalus dan embrio somatik ubi kayu klon UJ-5 secara *in vitro*.
2. Terdapat pengaruh umur eksplan yang efektif dalam induksi kalus dan embrio somatik ubi kayu klon UJ-5 secara *in vitro*.
3. Terdapat interaksi antara konsentrasi picloram dan umur eksplan dalam induksi kalus dan embrio somatik ubi kayu klon UJ-5 secara *in vitro*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Botani Tanaman Ubi Kayu

Ubi kayu (*Manihot esculenta*) yang juga dikenal sebagai ketela pohon atau singkong adalah tanaman tahunan tropika dan subtropika dari keluarga Euphorbiaceae. Umbinya dikenal luas sebagai makanan pokok penghasil karbohidrat dan daunnya sebagai sayuran. Menurut Ceballos et al., (2012) klasifikasi tanaman ubi kayu adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: <i>Manihot</i> Mill.
Spesies	: <i>Manihot esculenta</i> Crantz

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

Tanaman ubi kayu mempunyai heterozigositas yang tinggi disebabkan oleh sistem penyerbukan silang. Sehingga pada kondisi tertentu, bunga betina dan jantan pada tanaman berbeda namun dari varietas yang sama masak secara bersamaan dan terjadi penyerbukan sendiri. Biji hasil penyerbukan sendiri merupakan inbred dan menghasilkan tanaman dengan tingkat heterosigositas yang lebih rendah (Nassar, 2006).

Perbanyak tanaman ubi kayu yaitu menggunakan stek batang atau dengan biji yang merupakan hasil perkawinan silang. Sedangkan teknik yang paling umum digunakan petani untuk perbanyak dan penanaman tanaman ubi kayu adalah stek, dan akar tidak termasuk organ reproduktif. Cara panen yang dilakukan petani yaitu dengan memotong dan membuang cabang-cabang yang muda kemudian akar dipotong dan batang utama diikat masing-masing sebanyak 50 batang/ikat. Penyimpanan batang singkong yang telah dipanen yaitu dengan cara bagian bawah batang 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 (stek) tapi hal itu dipengaruhi oleh umur dan karakteristik varietas (Ceballos, 2012).

2.2 Kultur Jaringan dan Embriogenesis Somatik Ubi Kayu

Tanaman merupakan suatu organisme multiseluler yang kompleks dengan organ-organ yang mempunyai fungsi masing-masing. Setiap bagian tanaman dapat beregenerasi menjadi tanaman baru merupakan perkembangan dalam bidang fisiologi yang disebut dengan teori totipotensi sel. Totipotensi sel yaitu setiap sel dari seluruh bagian tanaman dapat tumbuh menjadi tanaman sempurna apabila ditumbuhkan pada lingkungan yang sesuai (George and Sherrington, 1984). Teori inilah yang kemudian dijadikan dasar untuk melakukan manipulasi pada tingkat sel maupun jaringan tanaman menjadi individu baru yang utuh. 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.

Perbanyakan tanaman dengan kultur jaringan memiliki banyak kelebihan diantaranya adalah perbanyakan dapat dilakukan setiap saat tanpa tergantung musim serta dapat menghasilkan bibit tanaman dalam jumlah banyak dalam waktu singkat. Menurut Gunawan (1988) hampir semua tanaman dapat diperbanyak dengan kultur jaringan, dan dapat menghasilkan tanaman dalam jumlah banyak dalam waktu singkat. Bahan tanaman yang digunakan untuk kultur jaringan berukuran lebih kecil dan tidak banyak bila dibandingkan dengan perbanyakan secara konvensional. Menurut Armini *et al.*, (1992) teknik kultur jaringan mempunyai beberapa kelebihan yaitu dapat diperbanyak setiap saat tanpa mengenal musim karena dilakukan di ruang tertutup, daya multiplikasinya tinggi dari bahan tanaman yang kecil, tanaman yang dihasilkan seragam, dan bebas penyakit.

Salah satu jalur regenerasi tanaman secara kultur jaringan adalah dengan cara embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik adalah suatu proses sel-sel somatik berkembang membentuk individu baru melalui tahap perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet (Purnamaningsih, 2002). Sedangkan menurut Von Arnorld *et al.*, (2002) embriogenesis somatik adalah suatu proses struktur bipolar yang menyerupai embrio zigotik berkembang dari satu sel non-zigotik tanpa adanya keterkaitan pembuluh dengan jaringan asalnya. Embriogenesis somatik merupakan proses yang sangat efisien untuk mikropropagasi dan regenerasi beberapa genotipe ubi kayu karena memungkinkan meningkatkan laju multiplikasi dan produksi embrio yang mampu berkembang menjadi tanaman utuh (Ibaraki dan Murata, 2001).

Proses terbentuknya embrio somatik terbagi menjadi dua jalur, yaitu pembentukan embrio secara langsung dari sel atau jaringan tanpa melalui pembentukan kalus dan pembentukan secara tidak langsung yaitu melalui tahapan pembentukan kalus (Yuwono, 2008). Seringkali pembentukan embrio secara langsung terhambat karena terjadi browning akibat adanya oksidasi senyawa fenol dari jaringan eksplan (Santos-Briones, 2006). Selain itu embrio yang terbentuk jumlahnya sedikit dibandingkan dengan pembentukan embrio secara tidak langsung. Salah satu keuntungan embriogenesis somatik yang banyak disukai yaitu dapat menekan masalah sulitnya pembentukan benih somatik pada tahap perkecambahan (Rai dan McComb, 2002).

2.3 Penggunaan Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan senyawa organik bukan nutrisi yang dalam konsentrasi rendah ($< 1 \mu\text{M}$) dapat mendorong, menghambat atau secara kualitatif mengubah pertumbuhan dan perkembangan (Wattimena, 1988). Konsep zat pengatur tumbuh diawali dengan konsep hormon tanaman (Widyastuti, 2001). Hormon tanaman adalah senyawa-senyawa organik tanaman yang dalam konsentrasi yang rendah mempengaruhi proses-proses fisiologis, seperti pertumbuhan, diferensiasi dan perkembangan tanaman. Proses-proses lain seperti pengenalan tanaman, pembukaan stomata, translokasi dan serapan hara dipengaruhi oleh hormon tanaman. Hormon tanaman kadang-kadang juga disebut fitohormon. Dengan ditemukannya zat pengatur tumbuh yang dapat merangsang pertumbuhan vegetatif, maka penggunaan ZPT sangat penting pada media tanam kultur jaringan.

Zat pengatur tumbuh terdiri dari golongan sitokinin dan auksin. Auksin mempunyai peran ganda tergantung pada struktur kimia, konsentrasi, dan jaringan tanaman yang diberi perlakuan. Pada umumnya auksin digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus, kultur suspensi, dan akar, yaitu dengan memacu pemanjangan dan pembelahan sel di dalam jaringan kambium (Pierik, 1987).

Pada pembentukan kalus embriogenik, auksin yang sering digunakan adalah picloram. Hal tersebut karena picloram dapat menstimulasi replikasi DNA dan sintesis RNA dalam mengendalikan pembelahan sel dengan konsentrasi rendah. Picloram ini pun lebih aktif dalam meningkatkan induksi kalus pada eksplan dibandingkan dengan auksin 2,4-D.

Picloram dengan konsentrasi tinggi dapat menghambat terjadinya pembelahan sel dan pertumbuhannya (Tu *et al.*, 2001). Penelitian Taylor *et al.*, (1996) menunjukkan bahwa media GD yang ditambah picloram telah berhasil dalam menginduksi kalus embriogenik ubi kayu secara efisien, sedangkan media MS komposisi penuh maupun setengah komposisi direkomendasikan untuk diferensiasi dan perkembangan embrio somatik ubi kayu yang mampu berkecambah (Groll *et al.*, 2002). Rossin dan Rey (2011) melaporkan bahwa embrio somatik kultivar MT116 dihasilkan ketika tunas pucuk dan daun muda dikulturkan di media yang mengandung picloram dan daun muda yang dikulturkan di media yang mengandung 2,4-D.

2.4 Kalus Embriogenik

Kalus embriogenik dapat dibedakan dari kalus non-embriogenik berdasarkan karakteristik morfologinya (Yang and Zhang, 2010; Padua *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014). Secara umum, kalus embriogenik terlihat berwarna kuning dan sel-sel yang kecil, isodiametrik, tersusun dalam kluster, dengan sitoplasma yang padat, atau berwarna putih dengan struktur yang kompak dan permukaannya yang halus. Sedangkan kalus non-embriogenik terlihat kenyal dan selnya tembus cahaya dan terlihat memanjang, memiliki vakuola dengan volume yang besar dalam sel, dan tidak adanya organel dalam sitoplasma (Padua *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2021 hingga Februari 2022. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Lapang Terpadu dan Laboratorium Ilmu Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain timbangan analitik $> 0,01$ gram dan $< 0,0001$ gram, mikro pipet, pH meter, *magnetic stirrer*, autoklaf budenberg, autoklaf tomy, kompor gas, panci, erlenmeyer, gelas ukur, gelas beaker, destilator, gelas ukur, botol kultur steril, ubin, hand sprayer, pembakar bunsen, alat-alat diseksi (pinset, scapel, dan blade), dan *laminar air flow cabinet* (LAFC), bak/ember, *hot plate*, kamera, cawan petri, sendok pengaduk, mikroskop binokuler, *showcase*, rak kultur, pipet tes, box, kereta dorong, botol schott, kertas wrapping, lampu, dan AC.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara tanaman ubi kayu klon UJ-5, formulasi media MS, Picloram, *Napthalene acetic acid* (NAA), agar-agar, CuSO_4 , Benziladenine (BA), tisu, kapas, akuades, air, agar-agar, spirtus, detergent, larutan pemutih komersial (NaOCl), alkohol 70%, larutan tweens 20, sukrosa, sabun cuci piring (*sunlight*), air steril, KOH 1 N, dan HCl 1 N. Bahan tanam yang digunakan untuk induksi kalus primer yaitu berupa daun pada kultur steril berumur 7 HST dan 8 MST yang dihasilkan dari stek ubi kayu yang ada di Rumah Kaca. Diambil tunas dari stek ubi kayu diambil ± 3 buku dari bagian pucuk

kemudian dilakukan sterilisasi di Laboratorium. Kemudian ditanam pada media $\frac{1}{2}$ MS (pre-kondisi) dan diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap, dan perlakuan disusun secara faktorial 2×4 . Faktor pertama adalah pemberian picloram dengan 4 taraf konsentrasi, sedangkan faktor kedua adalah umur eksplan yaitu E1 = eksplan daun umur 1 MST dan E2 = eksplan daun umur 8 MST.

Rincian faktor perlakuan tersebut adalah sebagai berikut :

Faktor 1: Pengaruh beberapa konsentrasi picloram (M)

M1: Picloram 7,5 mg/l + NAA 6 mg/l

M2: Picloram 10 mg/l + NAA 6 mg/l

M3 : Picloram 12,5 mg/l + NAA 6 mg/l

M4 : Picloram 15 mg/l + NAA 6 mg/l

Faktor 2 : Pengaruh umur eksplan terhadap picloram (K)

E1 = Eksplan daun berumur 1 MST pada media pre-kondisi

E2 = Eksplan daun berumur 8 MST pada media pre-kondisi

Dengan demikian diperoleh 8 kombinasi perlakuan (M1E1, M2E1, M3E1, M4E1, M1E2, M2E2, M3E2, M4E2) dan setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak 3 kali, dimana setiap ulangan terdiri atas 3 botol, kemudian setiap botol diisi 3 eksplan. Sehingga keseluruhan didapatkan 24 satuan percobaan, dan total eksplan sebanyak 120 eksplan. Homogenitas diuji menggunakan uji Bartlett, jika terpenuhi dilanjutkan analisis ragam dengan pemisahan nilai tengah menggunakan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 5%

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 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 botol kultur dilakukan melalui dua tahap. Tahap pertama botol kultur disterilisasi menggunakan autoklaf *Budenberg* selama 30 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,2 kg/cm². Untuk botol yang masih terdapat media tanam sebelumnya atau sisa tanaman kontaminasi, setelah disterilisasi sisa media dan tanaman dikeluarkan dari botol kemudian botol dicuci menggunakan larutan detergen 2 gr/l untuk kemudian dilakukan perendaman dalam larutan 2 gr/l detergen ditambah dengan 250 ml desinfektan berupa larutan pemutih komersial selama semalam. Kemudian untuk botol bersih (tidak terdapat sisa media atau tanaman kontaminasi), setelah disterilisasi langsung direndam dalam larutan detergen 10 gr/l ditambah desinfektan 250 ml. Setelah proses perendaman, botol kultur dicuci menggunakan serabut jaring dan serabut kawat pada seluruh bagian hingga bersih. Setelah dicuci, botol kemudian dibilas di bawah air mengalir. Kemudian dilakukan perendaman dengan air panas selama ± 15 menit. Setelah itu botol ditiriskan pada kereta dengan alas kertas, dan mulut botol ditutup menggunakan plastik ukuran 12x25 cm yang dipotong menjadi dua sehingga ukurannya 12x12,5 cm dan diikat menggunakan karet pada leher botol. Setelah botol kultur telah ditutup dengan plastik, selanjutnya dilakukan sterilisasi tahap kedua. Sterilisasi ini menggunakan autoklaf Tommy selama 30 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 1,2 kg/cm².

Alat - alat lainnya yang digunakan antara lain alat diseksi (pinset dan scalpel), cawan petri, keramik, botol schott, kapas, dan gelas ukur. Sterilisasi alat diseksi, cawan petri dan keramik dibungkus menggunakan kertas lalu dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diikat karet. Kapas dimasukkan ke dalam botol kultur

3.4.2 Pembuatan Media

Media dasar yang digunakan adalah media Murashige dan Skoog (1962) yang mengandung garam-garam mineral yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi media Murashige dan Skoog (1962)

Komponen media	Konsentrasi media MS (mg/l)	Konsentrasi larutan stok (mg/l)	Vol larutan stok per liter media (ml)
Stok Makro (10x)			
NH ₄ NO ₃	1650	16500	
KNO ₃	1900	19000	100
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	3700	
KH ₂ PO ₄	170	1700	
Stok CaCl₂ (100x)			
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	44000	10
Stok Mikro a (100x)			
H ₃ BO ₃	6,2	620	
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	1690	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	860	
Stok Mikro b (1000x)			
KI	0,83	830	
Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O	0,25	250	1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	25	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	25	
Stok Fe (100x)			
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	2780	
Na ₂ EDTA	37,3	3730	10
Stok Vitamin (100x)			
Tiamin-HCl	0,1	10	
Piridixin-HCl	0,5	50	
Asam nikotinat	0,5	50	10
Glisin	2	200	
Stok Mio-inositol (100x)			
Mio-inositol	100	1000	100

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) perlu ditambahkan ke dalam media untuk menentukan arah pertumbuhan tanaman. Dalam penelitian ini pertumbuhan

eksplan diarahkan untuk membentuk kalus terlebih dahulu. ZPT yang ditambahkan sesuai dengan perlakuan pada Tabel 2. Setelah kalus primer terbentuk, selanjutnya kalus primer diinduksi pada media induksi embriogenik pada Tabel 3.

Tabel 2. Jenis ZPT dan konsentrasi induksi kalus primer yang ditambahkan ke dalam media dasar Murashige dan Skoog (1962)

Perlakuan	Picloram (mg/l)	NAA (mg/l)
1	7,5	6
2	10	6
3	12,5	6
4	15	6

Tabel 3. Media induksi embrio somatik

Media Induksi	Picloram (mg/l)	NAA (mg/l)
SK1	6	0,5
MS0	0	0
Media IKP	7,5	6
	10	6
	12,5	6
	15	6

Untuk memudahkan proses pembuatan media perlu dilakukan pembuatan larutan stok, karena masing-masing bahan terutama ZPT yang diperlukan per liter media cukup rendah. Stok picloram dibuat dengan menimbang sebanyak 0,1 gram kemudian dilarutkan menggunakan KOH 1 N sebanyak 2-3 ml dalam gelas beaker. Kemudian ditambahkan akuades sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga berubah warna menjadi jernih atau tidak ada endapan yang terlihat. Setelah itu ditera mencapai volume akhir 100 ml. Pembuatan larutan stok untuk NAA yaitu dengan menimbang 0,1 gram kemudian dilarutkan dengan KOH 1 N 0,3 ml untuk tiap 10 ml ZPT. Kemudian ditera mencapai volume akhir 100 ml. Penggunaan KOH untuk melarutkan picloram dan NAA karena ZPT tersebut bersifat asam, sehingga memerlukan pelarut yang bersifat basa.

Disiapkan gelas beaker volume 1 liter yang telah berisi akuades sebanyak 200-300 ml sambil diaduk di atas *magnetic stirrer*, kemudian dicampurkan bahan-bahan

pembuatan media ke dalam gelas beaker. Lalu ditambahkan sukrosa sebanyak 30 g/l. ZPT dalam bentuk larutan stok juga ditambahkan sesuai dengan perlakuan. Setelah larutan homogen, media dituang hingga mencapai volume 1 liter menggunakan labu ukur atau gelas ukur. Tahap selanjutnya yaitu pH diatur hingga 5,8 dengan penambahan KOH 1N jika pH kurang dari 5,8 dan HCl 1N jika pH lebih dari 5,8. Kemudian media dituang ke dalam panci dan ditambahkan bubuk agar sebagai pematat media sebanyak 7 gr/l dan dimasak hingga mendidih. Setelah mendidih media dituangkan ke dalam botol kultur sebanyak 20 - 25 ml dan diberi label komposisi media. Media disterilisasi menggunakan autoklaf Tommy selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1,2 kg/cm². Dalam 1 liter media biasanya membutuhkan ± 30 botol kultur. Media yang telah disterilisasi selanjutnya didinginkan dan disimpan di dalam ruang penyimpanan media.

3.4.3 Persiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan untuk induksi kalus primer adalah eksplan daun dari kultur steril ubi kayu. Eksplan daun diperoleh dengan cara menyiapkan tanaman sumber eksplan ubi kayu klon UJ-5 yang ditanam dalam polybag yang dipelihara di Rumah Kaca, Laboratorium Lapang Terpadu, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Pada saat tanaman sumber eksplan berumur 2 minggu, diambil tunas 3 buku teratas berwarna hijau untuk disterilisasi dan ditanam pada media pre kondisi. Perawatan tanaman sumber eksplan yaitu dengan dilakukan pemupukan satu minggu sekali dan penyemprotan insektisida dua minggu sekali. Pemeliharaan tanaman sumber eksplan dalam rumah kaca dilakukan untuk mendapatkan tanaman sumber eksplan yang sehat.

3.4.4 Sterilisasi Tunas Ubi Kayu Sumber Eksplan

Sebelum tunas ditanam pada media pre-kondisi, perlu dilakukan sterilisasi tunas terlebih dahulu untuk menghilangkan mikroorganisme penyebab kontaminasi dan kegagalan kultur. Tahap pertama yaitu tunas pucuk dari tanaman induk di Rumah Kaca dicuci di bawah air mengalir dua kali selama ± 60 menit. Kemudian rendam

tunas menggunakan detergen dengan konsentrasi 5 gr/l selama 5 menit dan dibilas dengan air mengalir.

Sterilisasi tahap dua yaitu dilakukan di *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC). Tunas yang telah disterilisasi tahap pertama kemudian dikocok pada larutan klorox 20% (20 ml bayclin + 80 ml air steril) dan ditambah larutan tween 20 sebanyak 2 tetes untuk 100 ml selama 15 menit, kemudian dibilas sebanyak tiga kali menggunakan air steril. Selanjutnya tunas disterilisasi menggunakan larutan ethanol 70% selama 60 detik, kemudian dibilas menggunakan air steril sebanyak tiga kali.

3.4.5 Penanaman Eksplan

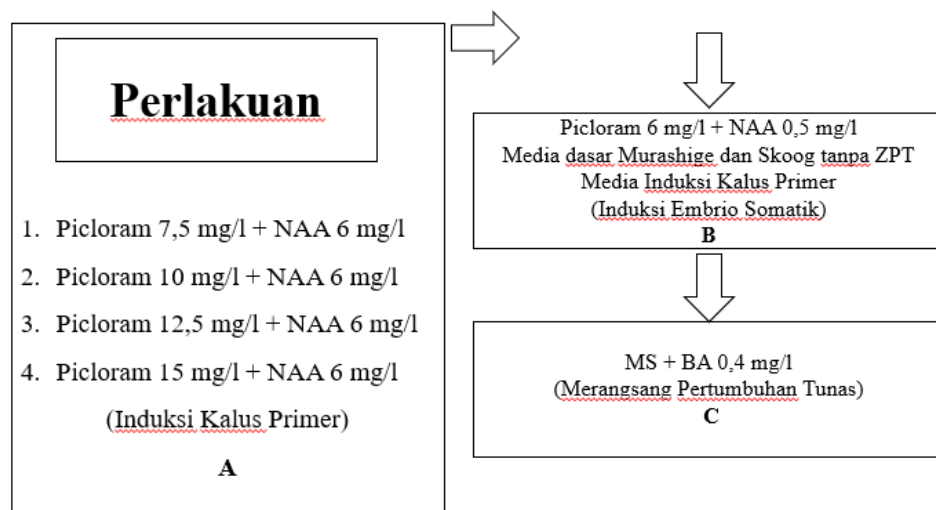
Sebelum dilakukan penanaman, tunas yang telah disterilisasi dipotong dengan ukuran 1-2 cm yang terdiri atas minimal 1 buku tiap tunas. Penanaman dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* (L AFC) dalam kondisi aseptik pada media $\frac{1}{2}$ MS (pre-kondisi). Tunas ditanam tegak lurus terhadap media dan dibenamkan bagian batang bawahnya ke dalam media pre-kondisi. Media pre-kondisi yang digunakan adalah formulasi media Murashige dan Skoog (1962) dengan konsentrasi makro $\frac{1}{2}$ dari media MS, lalu ditambahkan sukrosa 30 gr/l dengan pH akhir 5,8. Setelah ditanam pada media pre-kondisi, selanjutnya disimpan pada ruang inkubasi selama 7 hari dengan kondisi cahaya terang dan suhu ruangan $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Setiap botol kultur berisi 3 eksplan tunas pucuk.

Setelah tunas ditumbuhkan pada media pre-kondisi, kemudian eksplan yang terdiri dari E1 (eksplan daun muda) dan E2 (eksplan daun tua) ditanam pada media A (induksi kalus primer) seperti pada Gambar 2. Eksplan yang digunakan pada induksi kalus primer adalah daun pucuk ukuran 2x2 mm dan daun tua ukuran 5x5 mm yang berasal dari kultur steril ubi kayu. Setiap botol kultur berisi tiga eksplan yang ditanam dengan posisi permukaan bawah daun kontak dengan media. Kalus diinduksi di ruang kultur dalam kondisi gelap dengan suhu $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 4 minggu. Kemudian disubkultur ke dalam media induksi kalus embriogenik.

3.4.6 Induksi Embrio Somatik

Setelah berada di media induksi kalus selama 4 minggu, eksplan yang menunjukkan pertumbuhan kalus kemudian disubkultur ke media B (induksi kalus embriogenik). Tahapan subkultur nya yaitu, kalus yang berasal dari media A ditimbang terlebih dahulu, kemudian kalus dipotong hingga berat $\pm 0,3$ gram. Selanjutnya kalus dengan berat $\pm 0,3$ gram tersebut disubkultur ke media B (induksi kalus embriogenik), dan setiap botol berisi tiga kalus. Kalus diinduksi di ruang kultur dalam kondisi gelap dengan suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Setelah kalus embriogenik terbentuk, kalus embriogenik dipindahkan ke C (regenerasi tunas) untuk merangsang perkembangan tunas.

Kalus yang telah ditumbuhkan atau disubkultur pada media induksi kalus primer dapat disubkultur pada media yang sama setiap 3 minggu untuk memperbanyak jumlah embrio yang terbentuk. Kalus embriogenik yang terbentuk dari media B, kemudian disubkultur ke dalam media C untuk merangsang pertumbuhan tunas (Gambar 2).



Gambar 2. Bagan arah subkultur dari media induksi kalus primer

3.4.7 Variabel Pengamatan

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini antara lain :

3.4.7.1 Pengamatan secara visual

Pengamatan visual dilakukan dua hari sekali setelah tanam. Pengamatan visual dilakukan untuk melihat perkembangan eksplan. Pengamatan visual meliputi warna kalus, struktur kalus, dan tahapan perkembangan eksplan.

3.4.7.2 Visualisasi embrio somatik

Pengamatan visual dilakukan untuk mengetahui perkembangan dan fase-fase embrio somatik pada tanaman ubi kayu.

3.4.7.3 Waktu muncul kalus primer

Variabel waktu terbentuknya kalus primer diamati 2 hari sekali mulai dari setelah tanam di media induksi kalus hingga semua eksplan membentuk kalus.

3.4.7.4 Bobot segar kalus primer 4 MSI

Bobot kalus primer ditimbang pada umur 4 MSI di media induksi kalus primer yaitu bertepatan dengan subkultur ke media induksi kalus embriogenik.

3.4.7.5 Persentase eksplan berkalus 4 MSI

Persentase eksplan yang membentuk kalus dilakukan dengan melihat jumlah eksplan yang dapat membentuk kalus dalam waktu 4 MSI. Jumlah eksplan berkalus dibagi total eksplan dan dikali 100%. Variabel ini diamati pada saat kalus berumur 4 minggu. Berikut ini rumus penghitungan persentase eksplan berkalus

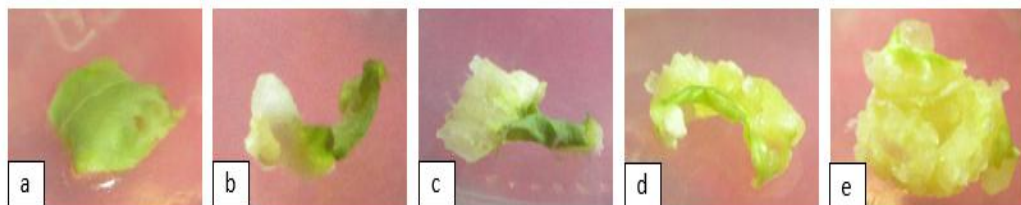
$$\text{Persentase eksplan berkalus} = \frac{\text{Jumlah eksplan berkalus}}{\text{Jumlah seluruh eksplan}} \times 100\%$$

3.4.7.6 Rata-rata skoring pembentukan kalus per eksplan 1 MSI

Pembentukan kalus per eksplan diamati dengan cara *skoring* setelah 1 MSI. Persentase pembentukan kalus pada eksplan dikelompokkan berdasarkan skor dapat dilihat pada Tabel 4 dan keragaan pembentukan kalus primer per eksplan untuk tiap nilai skor ditunjukkan Gambar 3.

Tabel 4. Skoring pembentukan kalus primer per eksplan

Skor	Interval pembentukan kalus primer pada eksplan (%)
0	Kalus belum terbentuk
1	Kalus terbentuk hingga 25% pada luas permukaan eksplan
2	Kalus terbentuk > 25% hingga 50% luas permukaan eksplan
3	Kalus terbentuk > 50% hingga 75% luas permukaan eksplan
4	Kalus terbentuk > 75% pada luas permukaan eksplan



Gambar 3. Keragaan pembentukan kalus per eksplan berdasarkan nilai skor. (a). skor 0, (b). skor 1, (c). skor 2, (d). skor 3, (e). skor 4

3.4.7.7 Persentase eksplan berembrio

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

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

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Konsentrasi picloram berpengaruh dalam menginduksi kalus primer dan embrio somatik ubi kayu klon UJ-5 secara *in vitro*, semua konsentrasi pada media Induksi Kalus Primer memberikan respon yang baik dan menghasilkan persentase eksplan berkalus (100%). Konsentrasi picloram 15 mg/l menghasilkan persentase berembrio tertinggi (25%).
2. Umur eksplan berpengaruh dalam induksi kalus primer dan embrio somatik. Waktu muncul kalus pada eksplan daun muda (E1) lebih cepat (8,98 HST) dibandingkan dengan eksplan daun tua (E2) (15,27 HST). Rata-rata skoring pembentukan kalus per eksplan 1 MSI pada eksplan daun muda (E1) lebih tinggi 1,24 (25%) dibandingkan eksplan daun tua (E2) yaitu 0,21 (0%).
3. Terdapat interaksi antara konsentrasi picloram dan umur eksplan terhadap bobot segar kalus primer 4 MSI. Eksplan daun muda (E1) menghasilkan bobot kalus tertinggi pada konsentrasi picloram 7,5 mg/l yaitu 1,88 gram. Sedangkan pada eksplan daun tua (E2) memperoleh bobot kalus tertinggi pada konsentrasi picloram 15 mg/l sebesar 1,73 gram.

5.2 Saran

Pada penelitian ini telah diperoleh prosedur embriogenesis somatik ubi kayu klon UJ-5, akan tetapi prosedur tersebut belum sampai pada tahap membentuk planlet,

sehingga disarankan untuk penelitian periode selanjutnya untuk mendapatkan prosedur agar embrio somatik dapat menjadi planlet

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Shara, B., Taha, R.M., dan Rahid, K. 2018. Biotechnological methods and limitations of micropropagation in papaya (*Carica papaya* L.) production [Review]. *The J. Anim. Plant Sci.* 28 : 1208-1226.
- Anuradha, T., Kumar, K.K., dan Balasubramanian, P. 2015. Cyclic somatic embryogenesis of elite Indian cassava variety H-226. *Indian Journal of Biotechnology.* 14:559 – 565.
- Atehnkeng, J., Adetimirin, V.O., dan Ng, S.Y.C. 2006. Exploring the African cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) germplasm for somatic embryogenic competence. *Afr J Biotechnol.* 5(14):1324-1329.
- Armini, N. M., Wattimena, G. A., dan Gunawan, L. W. 1992. *Perbanyakkan Tanaman, Dalam G.A. Wattimena, N.A. Mattjik, E. Samsudin, N, M.A. Wiendi, dan A. Ernawati (Penyusun) Bioteknologi Tanaman.* Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Badan Pusat Statistik. 2014. Luas Panen, Produksi, dan Produktivitas Tanaman Pangan. <http://www.bps.go.id/index.php/publikasi/326#accordion-daftar-subjek3>. Diakses pada tanggal 15 April 2015.
- Ceballos, H., Kulakow, P., dan Hershey, C. 2012. Cassava Breeding: Current Status, Bottlenecks and the Potential of Biotechnology Tools. *Journal Tropical Plant Biol.* 5:73-87.
- Dhanya, J., Leen, N.A., Deepthi, D.C., Moushmi, M., Beena, M.R., Sheela, M.N., dan Makesh Kumar, T. 2017. Comparative potential of somatic embryogenesis and friable embryogenic callus production in farmer preferred Indian Cassava Cultivars. *Journal of Root Crops.* 43(1):23 – 33.
- Elegba, W., McCallum, E., Gruijssem, W., dan Vanderschuren, H. 2021. Efficient genetic transformation and regeneration of a farmer-preferred cassava cultivar from Ghana. *Journal of Frontiers in Plant Science.* 12(668042):1–12.

- Fitriani, H. 2016. *Friable Embryogenic Callus* (FEC) sebagai material perbaikan sifat unggul ubi kayu. *BioTrends*. 7(1):9–13.
- Food and Agriculture Organization. 2016. Genetic Resources of Cassava. Potential of Breeding for Improving Storage Potential <http://www.sciencedaily.com/releases>. [20 September 2015].
- George, E. F., and Sherrington, P.D. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Exegenetic Limited. England.
- Groll, J., Mycock, D.J., and Gray, V.M. 2002. Effect of medium salt concentration on differentiation and maturation of somatic embryos of cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Annals of Botany*. 89:645-648.
- Gunawan, L.W. 1988. *Tehnik Kultur Jaringan. Laboratorium Kultur Jaringan*. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor.
- Hankoua, B.B., Taylor, N.J., Ng, S.Y.C., Fawole, I., Puonti-Kaerlas, J., Padmanabhan, C., Yadav, J.S., Fauquet, C.M., Dixon, A.G.O., and Fondong, V.N. 2006. Production of the first transgenic cassava in Africa via direct shoot organogenesis from friable embryogenic calli and germination of maturing somatic embryos. *African Journal Biotech*. 5(19):1700-1712.
- Hapsoro, D., Yusnita. 2018. *Kultur Jaringan: Teori dan Praktik*. Andi Publisher. Yogyakarta.
- Hong, N.T.M., Thuong, N.T.H., Ngoc, P.B., and Ha, C.H. 2018. Nghiên cứu tái sinh một số giống sắn (*manihot esculenta crantz*) thông qua mô sẹo phôi hóa. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 16 (1):119–126.
- Ibaraki, Y., and Murata, K. 2001. Automation of Somatic Embryo Production. *Plant Cell Tiss Org Culture*. 65(3):179-199.
- 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.
- Joseph, T., Yeoh, H.H., and Loh, C.S. 2000. Somatic Embryogenesis, Plant Regeneration and Cyanogenesis in *Manihot glaziovii* Muell. Arg (ceara rubber). *Plant Cell Rep*. 19:535-538.
- Lelu, M.A., Klimaszewska, K.K., Jones, C., Ward, C., Van Aderkas, P., and Charest, P.J. 1993. *A Laboratory Guide to Somatic Embryogenesis in Spruce and Larch. Information Report*. Petawawa National Forestry Institute. Canada.

- Marigi, E.N., Masanga, J.O., Munga, T.L., Karanja, L.S., M.P, Ngungi., Thagana, W.M., Kirubi, D., Mwangi, M., Githunguri, C.M., Muiro, W.M., Miano, D.W., Alakonya, A.E., and Oduor, R.O. 2016. Optimisation of a somatic embryogenesis and transformation protocol for farmer-preferred cassava cultivars in Kenya. *African Crop Science Journal*. 24:35–44.
- Marius, K.K., Modeste, K.K., Edmond, K.K., Gwladys, G.Y., Laurent, K.K., and Mongomake, K. 2018. Whole plants regeneration of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz.) originated from Côte d'Ivoire via somatic embryogenesis. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*. 19(2):1–11.
- Marlin, M., Yulian, Y., dan Hermansyah, H. 2012. Inisiasi Kalus Embriogenik pada Kultur Jantung Pisang Curup dengan Penambahan Sukrosa, BAP dan 2,4-D. *Jurnal Agrivor*. 11(2):275–283.
- Murashige, T., Skoog, F.K. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nugroho, C.C. 2017. Induksi Kalus Embriogenik Beberapa Genotipe Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.). *Jurnal Magrobis*. 17(1):1-15.
- Padua, M.S., Paiva, L.V., Da Silva, L.C., Do Livramento, K.G., Alves, E., and Castro, A.H.F. 2014. Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. *Ciencia Rural*. 44 (4): 660-665.
- Pierik, R. L. M. 1987. *In vitro Culture of Higher Plant*. Kluwer Academic Publisher. London.
- Priadi, D., dan Sudarmonowati, E. 2006. Pengaruh Komposisi Media dan Ukuran Eksplan terhadap Pembentukan Kalus Embriogenik Beberapa Genotipe Lokal Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.). *Biodiversitas*. 7(3):269-272.
- Purmaningsih, R. 2002. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen Yang Mengendalikannya. *Buletin Agrobio* 5(2):51-58.
- Rai, V.R., and McComb, J. 2002. Direct somatic embryogenesis from mature embryos of sandalwood. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 69:65-70.
- Rasud, Y., dan Bustaman, B. 2020. Induksi Kalus secara In Vitro dari Daun Cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.) dalam Media dengan Berbagai Konsentrasi Auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 25(1):67–72.
- Rossin, C.B. and Rey, M.E.C. 2011. Effect of explants source and auxins on somatic embryogenesis of selected cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) cultivar. *Afr Journal Bot*. 77:59-65.

- Santos-Briones, C.D.L. and Hernandez Sotomayor, S.M.T. 2006. Coffee Biotechnology. *Braz. Journal Plant Physiology*. 18(1):217-227.
- Silva, A.T., Barduche, D., do Livramento, K.G., Ligterink, W., and Paiva, L.V. 2014. Characterization of a putative serk-like ortholog in embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. *Plant Molecular Biology Rep.*
- Sitinjak, M.A., Isda, M.N., dan Fatonah, S. 2015. Induksi kalus dari eksplan daun in vitro keladi tikus (*Typhonium* sp.) dengan perlakuan 2,4-D dan kinetin. *Jurnal Biologi*. 8(1):32–39.
- Sitorus, E.N., Hastuti, E.D., dan Setiasari, N. 2011. Induksi kalus binahong (*Basella rubra* L.) secara in vitro pada Media Murashige & Skoog dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda. *BIOMA*. 13(1):1–7.
- Supatmi., Fitriani, H., Rahman, N., Hartati, N.S., dan Sudarmonowati, E. 2017. Robust in vitro propagation and regeneration of ubi kuning high beta carotene cassava genotype through somatic embryogenesis. *Journal of Nusantara Bioscience*. 9(4):352–360.
- Suryana, A. 2006. *Kebijakan Penelitian dan Pengembangan Ubi Kayu untuk Agroindustri dan Ketahanan Pangan, Prospek, Strategi dan Teknologi Pengembangan Ubi Kayu Untuk Agroindustri dan Ketahanan Pangan*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Malang.
- Sudarmonowati, E., Hartati, R., dan Taryana, T. 2002. Produksi tunas, regenerasi dan evaluasi hasil Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) Indonesia asal kultur jaringan di lapang. *Natur Indonesia*. 4 (2): 96-108.
- Syombua, E.D., Wanyonyi, C.N., Adero, M.O., W.M. Mbinda, M.P. Ngungi, A.E. Alakonya, dan R.O. Odour. 2019. Explant type and hormone regime influences somatic embryogenes and regeneration in cassava. *African Journal of Biotechnology*. 18(25):532–539.
- Syombua, E.D., C.N. Wanyonyi, M.O. Adero, Mbinda, W.N., Ngungi, M.P., Alakonya, A.E., and Odour, R.O. 2019. Explant type and hormone regime influences somatic embryogenes and regeneration in cassava. *African Journal of Biotechnology*. 18(25):532–539.
- Szabados, L., Hoyos, R., and Roca, W. 1987. In Vitro Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Cassava. *Plant Cell Reports*. 6(3):248-251.
- Taylor, N.J., Edwards, M., Kiernan, R.J., Davey, C.D.M., Blakesley, D., and Henshaw, G.G. 1996. Development of Friable Embryogenic Callus and Embryogenic Suspension Culture Systems in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Nature Biotechnology* 14: 726-730.

- Taylor, N.J., Masona, M.V., Carcamo, R., Ho, T., Schöpke, C., and Fauquet, C.M. 2001. Production of Embryogenic Tissues and Regeneration of Transgenic Plants in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Euphytica*. 120:25-34
- Tu, *et al.* 2001. *Picloram*. Weed Control Methods Handbook. The Nature Conservancy
- Tuskan, G.A., Mewalal, R., Gunter, L.E., Palla, K.J., Carter, K., Jacobbson, D.A., Jones, P.C., Garcia, B.J., Weighill, D.A., Hyatt, P.D., Yang, Y., Zhang, J., Reis, N., Chen, J., and Muchero, W. 2018. Defining the genetic components of callus formation: A GWAS approach. *Journal Plos One*. 1–18
- Ubalua, A.O., Nsofor, G.C., Onyegbula, D.O., Uba, E., Okoroafor, U.E., and Ezeji, L.A. 2018. Somatic embryogenesis and plant regeneration from juvenile leaf explants of two cassava cultivars (TME 419 dan TMS 98/0505). *Australian Journal of Agricultural Engineering*. 1(1):1–5.
- Arnold, S.V., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., and Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69:233-249.
- Wattimena, G.A. 1988. Zat pengatur tumbuh pada tanaman. Laboratorium Kultur Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor.
- Widiastuti, D. 2001. Perbaikan Genetik dan Perbanyak Bibit Secara In Vitro dalam Mendukung Pengembangan Anggrek di Indonesia. *Jurnal Penelitian Dan Pengembangan Pertanian*. 20(4):138-143.
- William, E. G. and Maheswaran, G. 1986. Somatic Embryogenesis Factor Influencing Coordinated Behavior of Cell as on Embriogenic Group. *Ann Bot*. 68:443-462.
- Yang, X. and Zhang, X. 2010. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Critical Reviews in Plant Science* 29:36-57.
- Yuwono, T. 2008. *Bioteknologi Pertanian*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.