

**EMBRIOGENESIS SOMATIK UBI KAYU (*Manihot esculenta* Crantz.)  
MENGUNAKAN EKSPAN DAUN PUCUK PADA BEBERAPA  
KONSENTRASI 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**Jessy Mayasari  
NPM 1914121045**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2024**

## ABSTRAK

### EMBRIOGENESIS SOMATIK UBI KAYU (*Manihot esculenta* Crantz.) MENGUNAKAN EKSPLAN DAUN PUCUK PADA BEBERAPA KONSENTRASI 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID

Oleh

JESSY MAYASARI

Embriogenesis somatik merupakan salah satu bagian penting dalam tahapan transformasi genetik untuk menghasilkan varietas unggul, terutama pada ubi kayu. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh jenis klon dan konsentrasi 2,4-D serta interaksi antara keduanya terhadap pembentukan embrio somatik ubi kayu. Penelitian ini disusun dengan rancangan acak lengkap faktorial 2 x 4 dengan 4 ulangan. Faktor pertama adalah jenis klon ubi kayu, yaitu TDSL (K1) dan Waxy (K2). Faktor kedua adalah konsentrasi 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, yaitu 4 mg/l (D1), 8 mg/l (D2), 12 mg/l (D3), dan 16 mg/l (D4). Eksplan yang digunakan merupakan eksplan daun muda steril hasil prekondisi berumur 15 hari. Eksplan diinduksi dengan media Murashige dan Skoog (MS) + 6 mg/l NAA + 2,4-D (4, 8, 12, dan 16 mg/l) + 4 µM CuSO<sub>4</sub> dengan 4% sukrosa dan diinkubasi selama 25 hsi pada media induksi kalus primer dan dilanjutkan dengan induksi embrio somatik pada media yang sama selama 22 hsi. Embrio yang muncul disubkultur pada media yang diturunkan konsentrasinya, yaitu MS + 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l NAA + 4 µM CuSO<sub>4</sub> dengan 4% sukrosa selama 7 hsi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2,4-D dapat menginduksi kalus primer 100% pada berbagai konsentrasi dengan waktu induksi kalus berkisar 12,10–14,03 hari. Proliferasi kalus paling baik ditunjukkan oleh eksplan klon TDSL (*score* 2,46) dibandingkan klon Waxy (*score* 2,08) berdasarkan *scoring* pembentukan kalus. Akan tetapi, klon TDSL tidak dapat menghasilkan embrio somatik, sedangkan 6,94% eksplan klon Waxy menghasilkan embrio yang berbeda nyata berdasarkan uji BNT 5%. Interaksi antara kedua faktor tidak berpengaruh nyata terhadap semua variabel yang diamati.

Kata kunci: auksin, regenerasi *in vitro*, singkong, TDSL, Waxy, 2,4-D

**EMBRIOGENESIS SOMATIK UBI KAYU (*Manihot esculenta* Crantz.)  
MENGUNAKAN EKSPAN DAUN PUCUK PADA BEBERAPA  
KONSENTRASI 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID**

**Oleh**

**Jessy Mayasari**

**Skripsi**

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

**Pada**

**Jurusan Agroteknologi  
Fakultas Pertanian, Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2024**

Judul Skripsi

**EMBRIOGENESIS SOMATIK UBI KAYU  
(*Manihot esculenta* Crantz.)  
MENGUNAKAN EKSPLAN DAUN  
PUCUK PADA BEBERAPA  
KONSENTRASI 2,4-  
DICHLOROPHENOXYACETIC ACID**

Nama Mahasiswa

**Jessy Mayasari**

Nomor Pokok Mahasiswa

**: 1914121045**

Program Studi

**: Agroteknologi**

Fakultas

**: Pertanian**

**MENYETUJUI**

1. Komisi Pembimbing,

  
**Fitri Yelli, S.P., M.Si., Ph.D.**

**NIP 197905152008122005**

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

**NIP 196110211985031002**

2. Ketua Jurusan Agroteknologi,

  
**Ir. Setyo Widagdo, M.Si.**

**NIP 196812121992031004**

**MENGESAHKAN**

1. **Tim Penguji,**

**Ketua**

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

**Sekretaris**

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

**Penguji**

**Bukan Pembimbing**

**: Dr. Sri Ramadiana, S.P., M.Si.**

2. **Dekan Fakultas Pertanian,**

**Dr. Ir. Kusyanta Futas Hidayat, M.P.**

**NIP. 196411181989021002**

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 04 Juli 2024**

## SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **“Embriogenesis Somatik Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) Menggunakan Eksplan Daun Pucuk pada Beberapa Konsentrasi 2,4-*Dichlorophenoxyacetic Acid*”** merupakan hasil karya saya sendiri. Penyusunan skripsi ini telah mengikuti kaidah penulisan karya ilmiah Universitas Lampung. Apabila di kemudian 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, 04 Juli 2024  
Penulis,



**Jessy Mayasari**  
NPM 1914121045

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis merupakan anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Muhammad Yahman dan Ibu Maysuri. Penulis lahir pada 3 Oktober 2001 di Bandar Lampung. Penulis menempuh pendidikan sekolah dasar di SDN 1 Keteguhan (2007–2013) lalu melanjutkan pendidikan menengah di SMPN 3 Bandar Lampung (2013–2016) dan pendidikan menengah atas di SMAN 2 Bandar Lampung (2016–2019). Penulis diterima di Universitas Lampung sebagai mahasiswa jurusan Agroteknologi melalui jalur SBMPTN. Penulis menjadi penerima beasiswa Karya Salemba Empat dan tergabung dalam Paguyuban Karya Salemba Empat Universitas Lampung (2020–2023). Penulis pernah menjadi pengurus Persatuan Mahasiswa Agroteknologi sebagai anggota (2021–2023) dan Dewan Perwakilan Mahasiswa sebagai staff ahli (2020–2021).

Penulis pernah melakukan Kuliah Kerja Nyata di Kelurahan Gulak-Galik, Bandar Lampung pada 2021. Penulis melakukan Praktik Umum di Departemen Guava and Other Fresh Food di PT Great Giant Pineapple, Terbanggi Besar, Lampung Tengah pada 2022. Penulis pernah mengikuti program pertukaran mahasiswa tanah air (Permata) di Universitas Riau pada 2021. Penulis sering mengikuti aksi sosial dengan bergabung sukarelawan dalam menggalang dan menyalurkan bantuan pendidikan kepada anak-anak yang kurang mampu dan menyuarakan penyetaraan hak wanita.

## **PERSEMBAHAN**

**Karya sederhana ini saya persembahkan kepada:  
Kedua orang tua tercinta: Bapak Muhammad Yahman dan Ibu Maysuri,  
adik-adik tersayang: Muhammad Hazmi dan Febby Maharani,  
sebagai tanda bakti dalam menuntut ilmu,  
atas segala dukungan dan doa yang tercurah,  
serta almamater tercinta Universitas Lampung**

**“Lakukan semuanya 100%, jangan pernah setengah-setengah dalam segala hal”**

**-Jessy Mayasari-**

**“Tanggapilah semua hal yang terjadi dengan positif agar mendapatkan hikmah baik sebagai hasilnya”**

**-Jessy Mayasari-**

**“Konsisten merupakan tahapan tersulit dalam proses mencapai sesuatu”**

**-Rafi K-**

**“Sebaik-baiknya insan adalah insan yang jujur”**

**-Fitri Yelli, S.P., M.Si., Ph.D.-**

**“Allah tidak akan membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”**

**-Q.S. Al-Baqarah: 286-**

**“Kita hanya punya dua tangan untuk menutup telinga bukan untuk menutup mulut orang lain”**

**-Jessy Mayasari-**

**“Angin tidak berhembus untuk menggoyangkan pepohonan melainkan menguji kekuatan akarnya”**

**-Ali bin Abi Thalib**

**“Setiap orang punya *line* dan *pace*-nya masing-masing. Fokuslah pada jalanmu tanpa membandingkan dengan orang lain hingga tujuanmu tercapai”**

**-Jessy Mayasari-**

## SANWACANA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan segala nikmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “**Embriogenesis Somatik Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) Menggunakan Eksplan Daun Pucuk pada Beberapa Konsentrasi 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid**”. Pelaksanaan dan penulisan skripsi ini tidak lepas dari adanya bantuan dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung;
2. Ir. Setyo Widagdo, M.Si. selaku Ketua Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung;
3. Fitri Yelli, S.P., M.Si., Ph.D. selaku Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu dalam membimbing, memberikan ide, saran, arahan, nasihat, dan motivasi penulis selama penelitian hingga penulisan skripsi selesai;
4. Prof. Dr. Ir. Setyo Dwi Utomo, M.Sc. selaku Pembimbing Kedua yang telah memberikan bimbingan, saran, nasihat, dan motivasi kepada penulis selama penelitian dan penulisan skripsi;
5. Dr. Sri Ramadiana, S.P., M.Si. selaku Penguji yang telah memberikan saran, nasihat, dan arahan kepada penulis selama penelitian dan penulisan skripsi selesai;
6. Ir. Niar Nurmauli, M.S. selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, saran, dan arahan selama masa akademik penulis;
7. Keluarga tercinta: ayahanda Muhammad Yahman dan Ibunda Maysuri, S.Ag. serta adik-adik penulis: Muhammad Hazmi dan Febby Maharani yang selalu

memberikan kasih sayang, dukungan, dan motivasi dalam bentuk verbal dan materiil kepada penulis;

8. Keluarga besar Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Pertanian Universitas Lampung: Ibu Hayane Adeline Warganegara, S.P., M.Si., Nabilla Syalsa Anisma, Riska Yulisawati, Lika Yuvita, Anggun Permata, Wahyu Erlangga, Alm. Yudhistira Haditya Permana, Bang Ifan Maulana, Bang Susanto, Bang Alipha Hapiyatna, Mbak Titin Agustin, Mbak Panca Rahayu Anggi, Mbak Ajeng Windyastuti, Bang Wahyudi, Mbak Ni Sayu Putu, Vernanda Saktilas, Tedy Prasetya, Miftahul Mukhoironi, Annilen, Indah Saskia, Sabrina Salsabila, yang telah memberikan dukungan, semangat, dan bantuan selama masa penelitian hingga selesai;
9. Sahabat penulis: Rafi Khansa Esahaja, Adinda Yuantira, Muhammad Faiz Rizqillah, Widi Riski Pebianti, Anggun Sari, dan Fanny Dwi Maulidya yang telah memberikan semangat, motivasi, dan dukungan dalam menyelesaikan skripsi;
10. Teman-teman terdekat AGT 2019: Widi, Dinda, Angguns, Nabilla, Angper, Andreas, Ichwan, Wahyu, Hudan, Aldhi, Wahyudi, Intan, Riki, Bayu, Yanto, Iis, Lucky, dan Fariq yang telah memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis;
11. Keluarga besar Agroteknologi 2019 dan Perma AGT periode 2021–2022 yang telah kebersamai penulis.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih atas saran, masukan, dan segala hal yang tercurah selama penulis menjalankan penelitian dan penulisan skripsi.

Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat kepada pembaca.

Bandar Lampung, 04 Juli 2024

Penulis,

**Jessy Mayasari**

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.5 Kerangka Pemikiran .....	5
1.6 Hipotesis .....	7
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>9</b>
2.1 Botani Ubi Kayu.....	9
2.2 Kultur Jaringan .....	11
2.3 Embriogenesis Somatik .....	15
2.4 Zat Pengatur Tumbuh .....	18
<b>III. BAHAN DAN METODE.....</b>	<b>22</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	22
3.2 Bahan dan Alat .....	22
3.3 Metode Penelitian .....	23
3.4 Pelaksanaan Penelitian .....	23
3.5 Variabel Pengamatan.....	33
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>36</b>
4.1 Hasil.....	36
4.2 Pembahasan .....	45
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>50</b>

5.1	Simpulan.....	50
5.2	Saran.....	50
	<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>51</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>56</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.	Komposisi Media Murashige dan Skoog (1962).....	26
2.	Komponen Media ½ MS .....	27
3.	Komposisi Tambahan dalam Media IKP 2,4-D .....	28
4.	<i>Scoring</i> Pembentukan Kalus Primer .....	34
5.	Rekapitulasi Analisis Ragam Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Induksi Kalus Primer dan Induksi Embrio Somatik.....	40
6.	Pengaruh Konsentrasi 2,4-D terhadap Eksplan Berkalus (%) pada Dua Jenis Klon Ubi Kayu pada 25 hsi .....	41
7.	Rata-Rata Bobot Kalus Primer Umur 25 hsi pada Dua Jenis Klon Ubi Kayu .....	43
8.	Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi Media 2,4-D terhadap Jumlah Embrio Primer per Eksplan Umur 47 hsi .....	44
9.	Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Persentase Eksplan Berembrio .....	45
10.	Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Waktu Muncul Kalus Primer.....	56
11.	Hasil Uji Homogenitas Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Waktu Muncul Kalus Primer Menggunakan Minitab .....	56
12.	Analisis Ragam Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Waktu Muncul Kalus Primer.....	56
13.	Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Eksplan Berkalus 25 hsi (%) .....	56
14.	Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap <i>Scoring</i> Persentase Pembentukan Kalus per Eksplan .....	57
15.	Uji Homogenitas Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap <i>Scoring</i> Persentase Pembentukan Kalus per Eksplan.....	57

16.	Analisis Ragam Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap <i>Scoring</i> Persentase Pembentukan Kalus per Eksplan.....	57
17.	Uji Lanjut BNT 5% Pengaruh Klon Ubi Kayu terhadap <i>Scoring</i> Persentase Pembentukan Kalus per Eksplan .....	58
18.	Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Bobot Kalus Primer 25 hsi .....	58
19.	Transformasi Data Bobot Kalus Primer 25 hsi dengan Metode Box-Cox .....	59
20.	Uji Homogenitas Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Bobot Kalus Primer 25 hsi .....	59
21.	Analisis Ragam Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Bobot Kalus Primer 25 hsi .....	59
22.	Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Jumlah Embrio Primer per Eksplan .....	60
23.	Transformasi Data Jumlah Embrio Primer per Eksplan dengan Metode Box-Cox .....	60
24.	Uji Homogenitas Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Jumlah Embrio Primer per Eksplan .....	61
25.	Data Primer Eksplan Berembrio (%) .....	61
26.	Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Persentase Eksplan Berembrio .....	61
26.	Uji Homogenitas Pengaruh Klon Ubi Kayu dan Konsentrasi 2,4-D terhadap Eksplan Berembrio (%).....	62
27.	Uji Lanjut BNT 5% Pengaruh Klon Ubi Kayu terhadap Eksplan Berembrio (%).....	62

## DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1.	Alur kerangka pemikiran.....	8
2.	Ilustrasi fase perkembangan embrio somatik pada tanaman dikotil.....	18
3.	Rumus molekul <i>2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid</i> .....	21
4.	Alur induksi embriogenesis somatik ubi kayu eksplan daun menggunakan 2,4-D .....	31
5.	Visualisasi <i>scoring</i> pembentukan kalus per eksplan .....	35
6.	Bagian pertama kali muncul kalus pada eksplan daun ubi kayu pada media 2,4-D .....	37
7.	Visualisasi jenis kalus ubi kayu umur 3 msi pada media 2,4-D.....	37
8.	Fase-fase perkembangan embrio somatik klon Waxy umur 47 hsi.....	38
9.	Perkembangan umum eksplan daun ubi kayu hingga tanaman utuh .....	39
10.	Diagram rerata waktu muncul kalus primer pada dua jenis klon ubi kayu .....	41
11.	Pengaruh klon ubi kayu terhadap persentase pembentukan kalus per eksplan pada 3 msi .....	42
12.	Ragam bentuk kalus ubi kayu umur 3 msi pada beberapa media 2,4-D. ....	43

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ubi kayu menjadi salah satu alternatif makanan pokok di Indonesia. Berdasarkan Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian (2022) tentang statistik konsumsi pangan, ubi kayu merupakan komoditas pangan terbesar yang dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia setelah beras. Konsumsi ubi kayu terus meningkat terutama semenjak pemerintah menerapkan diversifikasi pangan untuk memperkuat ketahanan pangan dan mengantisipasi krisis pangan. Selain sebagai bahan pokok, pemanfaatan ubi kayu banyak dilakukan dalam berbagai bidang industri, seperti industri pakan ternak, industri makanan, industri tekstil, industri kimia, industri farmasi, industri obat nyamuk, dan industri lem. Kulit ubi kayu dan daun ubi kayu dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak, sedangkan dagingnya dapat diolah menjadi berbagai produk turunan. Gaplek yang merupakan olahan daging ubi kayu juga dapat diolah menjadi pelet sebagai pakan ternak. Daging ubi kayu dapat menghasilkan asam organik, gula glukosa, gula fruktosa, serta tepung cassava yang dapat digunakan dalam industri makanan (Robet dan Ratna, 2008). Daging ubi kayu juga dapat menghasilkan ethanol bahkan ubi kayu dilaporkan memiliki kandungan pati yang lebih murni dari jagung, padi, dan kentang sehingga berpotensi sebagai bahan baku bioethanol (Zamora dkk., 2010). Penggunaan ubi kayu dalam berbagai bidang industri ini tentu meningkatkan permintaan dalam negeri terhadap ubi kayu yang tentunya perlu diimbangi oleh produksi ubi kayu.

Indonesia merupakan negara kelima terbesar penghasil ubi kayu setelah Nigeria, Republik Kongo, Thailand, dan Ghana berdasarkan data FAO (2020) dengan jumlah produksi ubi kayu Indonesia sebesar 18.302.000 ton. Provinsi Lampung

merupakan daerah penghasil ubi kayu terbesar di Indonesia. Lampung menyumbang produksi ubi kayu nasional sebanyak 7.387.084 ton pada 2015, tetapi terus menurun setiap tahun hingga hanya mencapai 5.016.790 ton pada 2018 sehingga menyebabkan produksi ubi kayu menurun hingga -7,97% dari tahun sebelumnya (Kementerian Pertanian Republik Indonesia, 2019). Selain itu, luas panen ubi kayu Provinsi Lampung pada 2018 sebesar 211.753 ha juga menurun jika dibandingkan dengan luas panen pada 2014 sebesar 304.468 ha sehingga berdampak pada produksi ubi kayu.

Lahan yang terbatas dengan permintaan ubi kayu yang tinggi perlu diatasi dengan mengoptimalkan produktivitas ubi kayu. Produktivitas ubi kayu Provinsi Lampung masih belum maksimal karena baru mencapai 20 ton/ha, sedangkan produktivitas maksimal ubi kayu dapat mencapai lebih dari 35 ton/ha (Badan Penelitian dan Pengembangan Daerah Provinsi Lampung, 2017). Rendahnya produktivitas ubi kayu yang terjadi pada budidaya ubi kayu disebabkan oleh beberapa alasan, yaitu pemakaian lahan marginal sebagai tempat penanaman ubi kayu dan teknik budidaya ubi kayu yang belum intensif, seperti jarak tanam yang terlalu dekat, pemupukan yang belum intensif, pengendalian hama dan penyakit yang kurang maksimal, terutama penggunaan klon lokal yang bukan merupakan klon unggul. Penggunaan klon unggul yang sesuai dengan kondisi agroklimat daerah tanam sangat menentukan hasil produksi ubi kayu.

Penyediaan klon unggul dapat dilakukan dengan melakukan pemuliaan tanaman untuk memperbaiki genetik tanaman. Pemuliaan tanaman dapat dilakukan secara konvensional maupun modern dengan menggunakan bioteknologi. Pemuliaan tanaman secara konvensional dilakukan dengan menyeleksi fenotipe atau morfologi baik secara individu maupun populasi tanaman (Nuraida, 2012). Penyeleksian ini dilakukan berkali-kali hingga didapatkan varietas unggul sehingga membuat pemuliaan tanaman konvensional memiliki kelemahan, yaitu lamanya waktu untuk mendapatkan varietas unggul karena waktu pembungaan ubi kayu cukup lama. Selain itu, seleksi berdasarkan fenotipe suatu karakter memiliki kelemahan karena fenotipe tidak hanya dipengaruhi oleh genotipe, tetapi

juga lingkungan sehingga belum tentu tanaman yang telah terseleksi memiliki gen yang dikehendaki. Oleh karena itu, diperlukan teknik pemuliaan yang lebih efisien dalam segi waktu dan seleksi varietas.

Kultur jaringan dengan teknik embriogenesis somatik ubi kayu menjadi solusi dalam perbaikan genetik. Teknik embriogenesis somatik akan menghasilkan embrio somatik yang dapat digunakan sebagai subjek transformasi gen unggul. Menurut Fitriani (2016), dalam proses transformasi atau penyisipan gen ke tanaman diperlukan material tanaman yang sesuai agar gen terintroduksi ke sel yang dituju sehingga ekspresi gen dapat stabil dan tidak bersifat sementara. Target tranformasi genetik kedelai menggunakan eksplan kotiledon dan embrio muda dilaporkan kompeten untuk transformasi, tetapi eksplan embrio muda memiliki persentase *gus* positif yang lebih baik yang menandakan persentase gen tersisip lebih baik dibandingkan kotiledon (Pardal dkk., 2005). Penggunaan kultur embriogenik dengan kombinasi agrobacterium media menjadi metode dengan tingkat keberhasilan yang lebih sukses daripada dengan kotiledon atau daun lembaga yang merupakan bakal daun yang terbentuk pada embrio (Fitriani, 2016). Selain itu, teknik embriogenesis somatik dapat digunakan untuk tujuan perbanyakan. Kultur jaringan dengan teknik embriogenesis akan menghasilkan bibit atau benih dalam jumlah besar dalam waktu yang relatif singkat (Hapsoro dan Yusnita, 2022). Embriogenesis somatik menjadi teknik yang sangat efisien untuk mikropropagasi dan regenerasi ubi kayu karena memungkinkan untuk meningkatkan laju multiplikasi dan produksi embrio yang mampu berkembang menjadi individu tanaman utuh.

Penelitian embriogenesis somatik ubi kayu telah banyak dilakukan pada berbagai klon ubi kayu dan penggunaan zat pengatur tumbuh (ZPT). Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa ZPT yang paling sering digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik pada ubi kayu adalah Picloram dan 2,4-*Dichlorophenoxyacetic acid* (Mongomake dkk., 2015; Nugroho, 2017; Rossin dan Rey, 2011) dengan induksi embrio somatik primer dan embrio somatik sekunder paling banyak terbentuk dengan menggunakan eksplan *young leaf lobes* atau tunas

pucuk (Fitriani, 2016). Frekuensi embrio somatik dan jumlah rata-rata embrio somatik yang dihasilkan sangat bervariasi yang dipengaruhi oleh genotipe, jenis auksin, dan konsentrasi yang diuji (Mongomake dkk., 2015). Berdasarkan penelitian Mongomake dkk. (2015), klon Ngan Mbada menunjukkan hasil paling baik pada media MS dengan 50  $\mu$ M Picloram diikuti dengan klon Lokal Red yang menunjukkan hasil paling baik pada media MS dengan 33  $\mu$ M 2,4-D. Akan tetapi, pada penelitian Nugroho (2017) yang membandingkan penggunaan berbagai media kultur dan penggunaan ZPT yang berbeda pada berbagai klon hasil paling baik didapatkan pada eksplan yang diinduksi dengan media MS yang ditambahkan 8 mg/l 2,4-D pada semua klon yang diuji dengan variabel persentase pembentukan kalus, waktu muncul kalus, *scoring* pertumbuhan kalus, diameter kalus, dan persentase embrio somatik. Hal ini menunjukkan terdapat keterkaitan antara jenis klon, jenis ZPT, dan konsentrasi yang digunakan akan menghasilkan respon yang berbeda dalam menginduksi embrio somatik.

Klon Waxy dan klon TDSL merupakan salah satu klon unggul ubi kayu. Klon Waxy merupakan klon elit ubi kayu yang diintroduksi dari Thailand. Klon ini digunakan dalam industri tapioka karena mengandung pati yang tinggi, yaitu 12,72% (Rizki dkk., 2021). Klon ini juga digunakan dalam produksi beras siger, yaitu beras yang terbuat dari tepung ubi kayu karena klon ini rendah amilosa (Rasyid dkk., 2019). Klon TDSL merupakan salah satu aksesori ubi kayu yang diunggulkan di Lampung. Klon ini banyak ditanam oleh petani ubi kayu di Lampung karena berumur genjah. Penelitian terkait induksi embriogenesis kedua klon ini masih belum banyak dilakukan, terlebih menggunakan 2,4-D sehingga pada penelitian ini akan dilakukan induksi kalus primer dan embriogenesis somatik tanaman ubi kayu klon Waxy dan TDSL menggunakan media MS dengan berbagai konsentrasi 2,4-D.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian di atas maka perumusan masalah pada penelitian ini sebagai berikut:

- (1) Bagaimanakah pengaruh jenis klon terhadap pembentukan embrio somatik ubi kayu;
- (2) Bagaimanakah pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap pembentukan embrio somatik ubi kayu;
- (3) Bagaimana interaksi antara jenis klon ubi kayu dan 2,4-D terhadap pembentukan embrio somatik ubi kayu.

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disusun, tujuan dari penelitian ini sebagai berikut:

- (1) Mengetahui pengaruh jenis klon terhadap pembentukan embrio somatik ubi kayu;
- (2) Mengetahui pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap pembentukan embrio somatik ubi kayu;
- (3) Mengetahui interaksi antara jenis klon ubi kayu dan konsentrasi 2,4-D terhadap pembentukan embrio somatik ubi kayu.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini bermanfaat untuk menghasilkan protokol embriogenesis somatik dengan menggunakan 2,4-D sebagai zat penginduksi pada klon TDSL dan Waxy. Embrio somatik bermanfaat dalam transformasi genetik untuk perbaikan sifat guna menghasilkan klon unggul baru ubi kayu.

### **1.5 Kerangka Pemikiran**

Ubi kayu merupakan tanaman pangan yang sering digunakan sebagai makanan pokok bagi masyarakat Indonesia. Konsumsi ubi kayu yang tinggi, yaitu kedua setelah beras dan banyak digunakan dalam bidang industri, seperti tepung tapioka dan glukosa yang merupakan produk turunan ubi kayu menjadikan ubi kayu memiliki permintaan yang tinggi. Hal ini tentunya perlu diimbangi dengan

produksi ubi kayu yang semakin meningkat. Akan tetapi, produksi ubi kayu terus-menerus menurun. Provinsi Lampung yang merupakan daerah penghasil ubi kayu terbesar di Indonesia mengalami penurunan produksi dan juga luas panen. Lahan pertanian yang terbatas dapat diatasi dengan meningkatkan produktivitas ubi kayu, salah satunya dengan penggunaan klon unggul.

Penyediaan klon unggul yang sesuai dengan agroklimat daerah tanam dapat meningkatkan hasil ubi kayu. Penyediaan klon unggul dapat dilakukan dengan melakukan perbaikan genetik melalui pemuliaan tanaman, baik konvensional maupun modern dengan teknologi. Akan tetapi, pemuliaan ubi kayu secara konvensional mengalami permasalahan, utamanya adalah waktu pembungaan ubi kayu yang cukup lama. Selain itu, bunga ubi kayu juga memerlukan daerah dengan suhu dingin untuk dapat berbunga. Pemuliaan tanaman secara konvensional dilakukan dengan menyeleksi fenotipe ubi kayu yang sesuai dengan ciri atau karakter yang diinginkan. Akan tetapi, fenotipe suatu karakter tidak hanya dipengaruhi oleh genotipe, tetapi juga oleh faktor lingkungan. Hal ini membuat perlunya teknik pemuliaan yang lebih efisien dan efektif.

Transformasi genetik merupakan salah satu teknik pemuliaan tanaman secara modern dengan menggunakan bioteknologi. Transformasi genetik dilakukan dengan menyisipkan gen unggul yang diinginkan, seperti gen tahan kekeringan, gen tahan hama, gen tahan patogen ke dalam tanaman. Akan tetapi, diperlukan target yang sesuai dalam pengerjaannya agar gen terintroduksi ke sel yang dituju. Embrio somatik yang merupakan embrio yang dihasilkan dari sel-sel somatik (tubuh) tanaman yang bukan kelamin memiliki sifat seperti zigot. Embrio dapat beregenerasi menjadi satu individu utuh sehingga gen yang telah disisipkan ke dalam tanaman dapat terbawa dalam tanaman sebagai individu utuh.

Induksi embriogenesis somatik pada ubi kayu memiliki respon yang berbeda-beda tergantung jenis klon, jenis ZPT, dan taraf konsentrasi yang digunakan. Salah satu ZPT yang paling sering digunakan dalam menginduksi embrio somatik ubi kayu adalah golongan auksin, yaitu 2,4-D. Kemampuan 2,4-D dalam

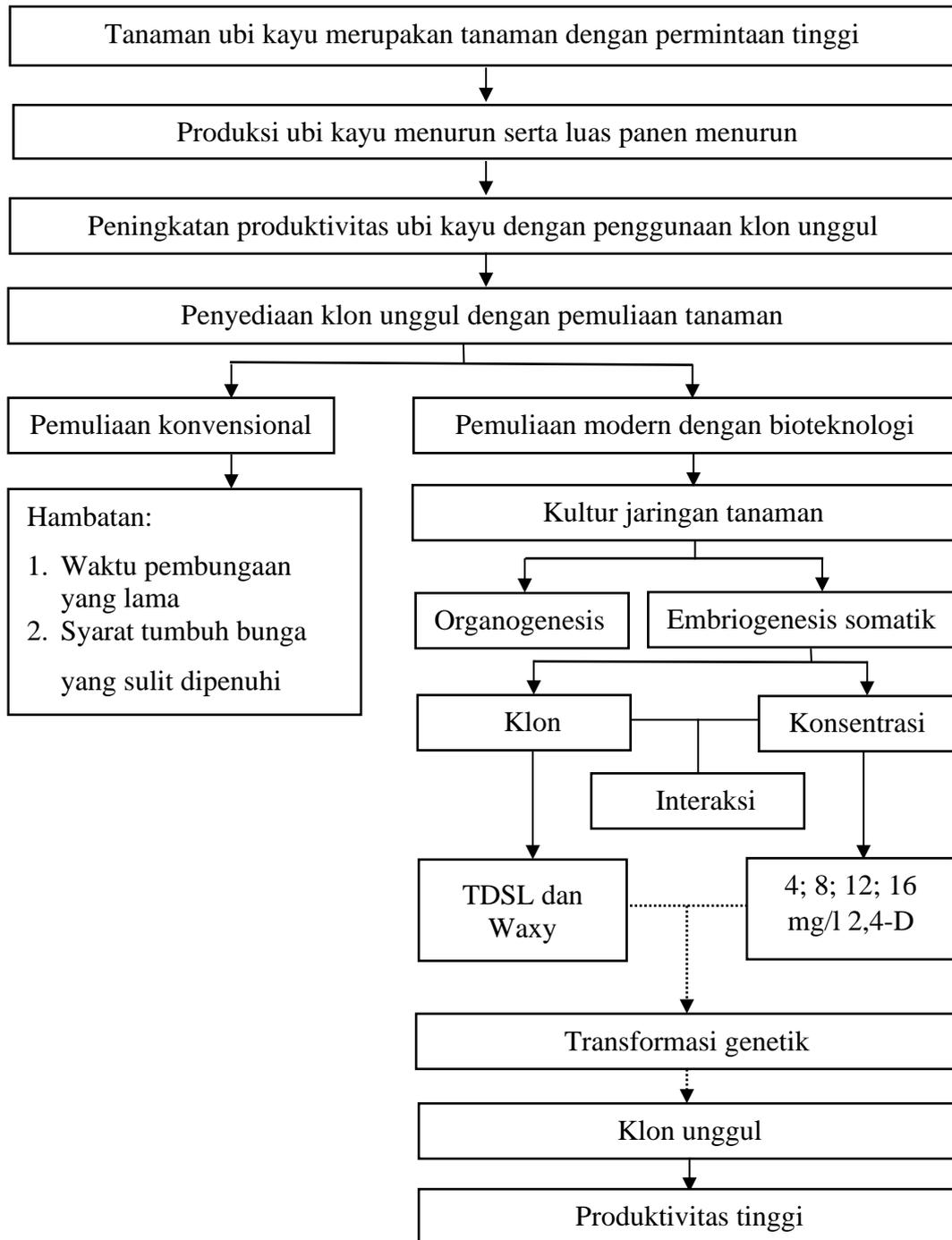
menginduksi embrio somatik dipengaruhi oleh jenis klon dan taraf konsentrasi yang digunakan. Konsentrasi auksin yang tinggi dapat memicu embriogenesis pada ubi kayu sehingga kisaran konsentrasi yang mendukung berkisar 1–20 mg/l pada media.

Klon Waxy dan klon TDSL merupakan klon unggul ubi kayu. Kedua klon ini memiliki daya tumbuh yang berbeda karena setiap genotipe memiliki daya tumbuh yang tidak sama sehingga respon yang dihasilkan dapat berbeda pada media yang sama dan kondisi yang sama. Pada penelitian ini dilakukan induksi embriogenesis somatik ubi kayu pada klon TDSL dan Waxy dengan menggunakan media MS yang ditambahkan 2,4-D dengan konsentrasi yang berbeda untuk mengetahui keterkaitan antara jenis klon dan taraf konsentrasi yang paling efektif. Hasil induksi embrio somatik paling baik dapat digunakan sebagai protokol dalam menghasilkan embrio somatik yang dapat digunakan sebagai sel target untuk transformasi genetik dalam menciptakan klon unggul baru sehingga nantinya diharapkan dapat membantu terciptanya klon unggul yang sesuai dengan agroklimat daerah tanam untuk meningkatkan produktivitas ubi kayu. Uraian kerangka pemikiran disajikan dalam Gambar 1.

## **1.6 Hipotesis**

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disusun, tujuan dari penelitian ini sebagai berikut:

- (1) Terdapat pengaruh jenis klon terhadap pembentukan embrio ubi kayu;
- (2) Terdapat taraf konsentrasi optimum dalam penggunaan 2,4-D terhadap pembentukan embrio ubi kayu;
- (3) Terdapat interaksi antara jenis klon ubi kayu dan taraf konsentrasi terhadap pembentukan embrio ubi kayu.



Gambar 1. Alur kerangka pemikiran.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Botani Ubi Kayu

Ubi kayu atau ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) merupakan tanaman pangan yang termasuk dalam famili Euphorbiaceae atau suku jarak-jarakan. Secara umum klasifikasi ubi kayu adalah sebagai berikut: Kingdom Plantae, Divisi Spermatophyta, Subdivisi Angiospermae, Kelas Dicotyledonae, Ordo Euphorbiales, Famili Euphorbiaceae, Genus Manihot, Spesies *Manihot esculenta* Crantz. Ubi kayu merupakan tanaman pangan yang sering dimanfaatkan umbinya dengan berbagai hasil modifikasi ubi kayu yang berkembang pesat, salah satunya adalah tepung mocav yang digunakan sebagai bahan campuran tepung terigu dalam industri makanan (Mustikarini dkk., 2019).

Ubi kayu memiliki beragam klon di dunia. Bank plasma nutfah terbesar di dunia untuk ubi kayu adalah *Central International Agricultural Tropical* di Cali Colombia dengan perkiraan 4700 klon tersedia. Penyimpanan plasma nutfah ubi kayu di Indonesia terletak di Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian (Richana, 2018). Plasma nutfah yang beragam dapat dimanfaatkan sebagai keragaman genetik untuk menciptakan klon unggul baru.

Ubi kayu merupakan tanaman dikotil dengan akar tunggang. Akar ubi kayu dapat membesar menjadi umbi yang dapat dimakan. Batang ubi kayu memiliki bentuk fisik berkayu, bulat, panjang, serta berbuku. Batang ubi kayu dapat tumbuh hingga 3 meter. Daun ubi kayu termasuk berdaun tunggal yang disebut dengan *folium simplex*. Daun ubi kayu memiliki tulang daun (*venation / nervatio*) dan bertulang menyirip (*palminervis*). Bunga ubi kayu terdapat dua jenis, yaitu bunga jantan dan bunga betina. Bunga jantan memiliki semacam tenda bunga yang

mirip loncengan dan tertancap di area penebalan dasar bunga dan berlekuk. Bunga betina memiliki tonjolan pada dasar bunga yang berwarna kuning dan mengelilingi calon buah (Asmaningrum dkk., 2022).

Tanaman ubi kayu banyak dibudidayakan dan sudah tersebar luas di Indonesia. Ubi kayu banyak dimanfaatkan sebagai makanan utama pengganti padi yang memiliki karbohidrat tinggi, yaitu 121 kalori per 100 gramnya (Asmaningrum dkk., 2022). Klon unggul ubi kayu yang banyak dibudidayakan petani Indonesia di antaranya adalah Adira 1, Adira 2, Adira 4, Malang 1, Malang 2, Malang 4, Malang 6, UJ-3, dan UJ-5. Klon-klon ubi kayu tersebut memiliki umur panen mulai dari 9–10 bulan dengan potensi hasil 20–40 ton/ha. Klon-klon tersebut memiliki keunggulannya masing-masing, seperti memiliki kandungan pati yang tinggi, tahan layu, tahan tungau merah, tahan bercak cokelat daun, dan keunggulan lainnya (Purwono dan Purnamawati, 2007).

Ubi kayu yang digunakan pada penelitian ini adalah klon TDSL dan klon Waxy. Klon TDSL merupakan salah satu aksesori ubi kayu yang diunggulkan di Lampung. Klon ini banyak ditanam oleh petani di Provinsi Lampung karena berumur genjah. Klon Waxy merupakan klon elit ubi kayu yang diintroduksi dari Thailand dengan kandungan pati dan HCN yang tinggi. Berdasarkan penelitian Nintania dkk. (2021) dalam evaluasi pertumbuhan dan kadar pati beberapa klon ubi kayu, klon Waxy juga memiliki kadar pati paling tinggi, yaitu 12,72% dan memiliki HCN paling tinggi, yaitu 0,07 mg/kg. Klon Waxy telah dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan beras siger yang merupakan beras dari tepung ubi kayu karena mengandung amilosa yang rendah (Rasyid dkk., 2019). Klon Waxy memiliki kandungan pati dengan kandungan amilopektin yang lebih tinggi daripada amilosa, berbeda dengan varietas lain yang sudah ditanam sebagai bahan baku tapioka selama ini yang memiliki kandungan amilosa lebih tinggi daripada amilopektin. Berdasarkan (Setiawan dkk., 2021), klon Waxy mengandung kadar amilopektin lebih tinggi, bahkan hingga 100% dibanding dengan varietas yang biasanya ditanam hanya mengandung amilopektin 57–80%.

## 2.2 Kultur Jaringan

Kultur jaringan tanaman terdiri atas kata kultur dan jaringan tanaman. Kultur berasal dari kata “*to culture*” atau “*to cultivate*” yang berarti kegiatan budidaya atau mengondisikan agar dapat tumbuh dan berkembang. Jaringan tanaman seperti yang diketahui, yaitu sekumpulan sel tanaman yang setiap jaringannya memiliki fungsi tertentu. Jadi, secara harfiah, kultur jaringan tanaman adalah kegiatan membudidayakan atau mengondisikan sekumpulan sel tanaman agar dapat tumbuh dan berkembang. Akan tetapi, kultur jaringan tanaman tidak hanya diartikan sebagai pengulturan yang sebatas jaringan tanaman saja. Kultur jaringan tanaman dapat berupa sel, jaringan, organ, embrio, biji, atau tanaman utuh di dalam tabung (*in vitro*) (Hapsoro dan Yusnita, 2018). Kultur jaringan tanaman diartikan sebagai suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman, dapat berupa protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan, dan organ serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh kembali (Habibah dkk., 2021).

Pengulturan bagian tanaman dapat berhasil dilakukan dengan beberapa prinsip, yaitu kondisi yang aseptik dan lingkungan yang mendukung. Kondisi aseptik artinya bebas dari mikroorganisme dan steril. Gula dan nutrisi esensial sebagai salah satu bahan pembuatan media kultur untuk menunjang tumbuh kembang bagian tanaman yang dikulturkan dapat juga menjadi media tumbuh kembang mikroorganisme yang tidak diinginkan seperti jamur dan bakteri yang dapat berkompetisi dengan eksplan yang dikulturkan. Penerapan prinsip aseptik dalam setiap tahap pengerjaannya perlu dilakukan agar terhindar dari kontaminasi mikroorganisme. Selain itu, lingkungan terkontrol dalam pengulturan jaringan perlu diciptakan agar mendukung terjadinya tumbuh dan kembang bagian tanaman yang dikulturkan. Suhu dan pencahayaan terkontrol perlu diperhatikan agar bagian tanaman dapat tumbuh dan berkembang ke arah tertentu, misalnya menjadi tanaman utuh, organ, atau lainnya yang dalam hal ini adalah kalus dan embrio somatik (Hapsoro dan Yusnita, 2018).

Kultur jaringan berkembang karena adanya teori sel (1635–1703) oleh Robert Hooke dan teori totipotensi sel (1838–1839) oleh Matthias Schleiden dan Theodor Schwann. Sel merupakan satuan dasar minimum suatu jasad hidup yang mampu melakukan perbanyakan sendiri dengan setiap organisme yang hidup terdiri atas minimal satu sel (Kustiani, 2020). Sel inilah yang menentukan struktur maupun fungsi jasad hidup. Sel mengalami pembelahan, pembesaran, serta diferensiasi selanjutnya yang membentuk organ dan tanaman utuh. Berdasarkan teori ini, teori totipotensi sel ditemukan dalam sel tanaman. Teori totipotensi menyatakan bahwa sel tanaman bersifat totipotensi, yaitu dapat tumbuh sekaligus berkembang menjadi tanaman utuh apabila berada pada kondisi sesuai (Hapsoro dan Yusnita, 2018). Bapak kultur jaringan, Godlieb Haberlandt merupakan orang pertama yang mencoba membuktikan teori totipotensi sel dengan mengisolasi dan mengkulturkan sel irisan tuber kentang yang mengandung pembuluh vaskuler dan mengamati adanya pembelahan karena adanya reaksi dari hormon luka (*wound hormone*).

Pembelahan dalam kultur jaringan termasuk ke dalam pembelahan mitosis karena sel yang terlibat adalah sel somatik (tubuh), bukan sel gamet. Pembelahan mitosis akan menghasilkan karakter yang sama dengan indukan sehingga pada kultur jaringan tanaman, pengkulturkan bagian tanaman akan menghasilkan tanaman yang mempunyai karakteristik yang sama dengan karakter tanaman induk eksplan. Walaupun demikian, penyimpangan genetik dapat terjadi pada tanaman regenerasi hasil kultur jaringan karena beberapa alasan yang disebut dengan keragaman atau variasi somaklonal (Hapsoro dan Yusnita, 2018). Variasi somaklonal dapat terjadi akibat penggunaan ZPT (jenis dan konsentrasinya), lama fase pertumbuhan kalus, tipe kultur yang digunakan, serta penggunaan media seleksi (Nanlohy dkk., 2023).

Kultur jaringan memiliki beberapa tipe kultur ditinjau dari eksplan yang digunakan. Tipe kultur jaringan dibedakan menjadi kultur meristem, kultur ujung tunas, kultur embrio, kultur protoplas, kultur anther, kultur kalus, kultur sel, dan kultur biji (Nanlohy dkk., 2023). Dalam penelitian ini, terdapat dua tipe kultur

yang digunakan, yaitu kultur ujung tunas (*shoot-tip cultures*) dan kultur kalus (*callus cultures*). Penggunaan kultur ujung tunas dilakukan dalam tahap prekondisi dan regenerasi tanaman untuk menghasilkan tunas dalam jumlah banyak dengan tujuan memperbanyak eksplan. Penggunaan kultur kalus dilakukan pada saat sebelum terbentuknya embrio somatik karena kalus merupakan bentuk ‘antara’ sebelum terbentuknya embrio dalam proses embriogenesis somatik. Kalus merupakan sekumpulan sel yang belum terdiferensiasi. Kalus muncul sebagai respon dari bekas luka atau irisan pada organ tanaman. Kalus dapat terbentuk dengan keseimbangan yang tepa antara auksin dan sitokinin yang berada dalam media (Arumingtyas dkk., 2021).

Kultur jaringan banyak dimanfaatkan hingga kini dalam berbagai keilmuan, seperti biologi molekuler, pemuliaan tanaman, bioteknologi pertanian, biokimia, dan dalam aplikasi komersial pada industri bibit tanaman (Hapsoro dan Yusnita, 2018). Manfaat kultur jaringan sangat banyak, di antaranya adalah menghasilkan tanaman unggul melalui transformasi atau rekayasa genetika, memperbanyak GM (*Genetically Modified*) plants atau tanaman transgenik, memperbanyak tanaman hybrid yang memiliki sifat unggul, memperbanyak tanaman yang tidak memiliki biji, mempermudah pengiriman tanaman jarak jauh, memperbanyak tanaman yang bijinya sulit berkecambah, menghasilkan tanaman bebas virus, dan melakukan *embryo rescue* (Zulkarnain, 2022).

Terdapat lima tahapan proses dalam pengerjaan perbanyakan tanaman *in vitro* (Hapsoro dan Yusnita, 2018). Tahap 0 merupakan tahap paling awal, yaitu pemilihan dan penanganan tanaman induk. Tanaman induk perlu dipastikan *true-to-type* agar menghasilkan tanaman yang *true-to-type* pula. Tanaman induk yang dipilih harus sehat, bebas penyakit, dan memiliki pertumbuhan yang baik karena tanaman induk merupakan sumber eksplan yang akan dipakai dalam pengulturan (Dwiyani, 2015). Tanaman induk ditumbuhkan di rumah kaca agar menekan kontaminasi yang dapat terjadi karena umumnya tanaman yang hidup di alam bebas mengandung mikroorganisme endofitik.

Tahap selanjutnya adalah tahap 1, yaitu tahap *culture establishment* untuk mendapatkan kultur aseptik. Tahap ini memerlukan teknik sterilisasi eksplan yang efektif karena teknik sterilisasi setiap tanaman berbeda. Bahan kimia yang sering dijadikan disinfektan untuk sterilisasi eksplan adalah sodium hipoklorit (NaOCl), etanol (etil alkohol), propanol (propionil-alkohol), dan merkuri klorida (HgCl<sub>2</sub>). Apabila telah didapatkan kultur yang aseptik, tahapan selanjutnya adalah tahap 2, yaitu perbanyak propagul. Propagul dapat berupa tunas, buku-buku, atau embrio somatik. Tahap ini dapat diulang beberapa kali hingga menghasilkan tunas-tunas mikro dalam jumlah cukup. Setelah itu, tahapan selanjutnya adalah tahap 3, yaitu tahap pemanjangan dan pengakaran tunas. Tunas mikro yang telah diperbanyak di tahap sebelumnya perlu dilakukan pemanjangan tunas dan pengakaran agar dapat diaklimatisasi. Tunas dapat dikulturkan ke media pengakaran yang mengandung auksin, seperti IBA, NAA, atau IAA, ataupun tanpa auksin dengan arang aktif.

Tunas yang telah memiliki akar atau disebut planlet dapat diaklimatisasi. Tahap terakhir proses dalam kultur jaringan adalah tahap 4 atau aklimatisasi planlet. Aklimatisasi dilakukan untuk mengadaptasikan tanaman yang berasal dari kultur *in vitro* ke lingkungan *ex vitro*. Planlet perlu dilakukan adaptasi karena sebelumnya telah terbiasa hidup di lingkungan yang terkontrol dan aseptik serta mendapat suplai energi berkecukupan dipaksa menghadapi lingkungan *ex vitro* yang memiliki RH rendah, suhu dan intensitas cahaya yang lebih tinggi, septik, dan harus berfotosintesis mandiri. Hal ini biasanya menyebabkan planlet mengalami stres lalu mati sehingga diperlukan adanya tahapan aklimatisasi.

Aklimatisasi umumnya dilakukan dengan memindahkan kultur secara bertahap. Tahap pertama adalah menurunkan suhu dan menaikkan intensitas cahaya matahari yang tidak langsung dengan menempatkan di dalam ruangan selama beberapa hari. Planlet yang telah siap dikeluarkan dari botol lalu ditanam ke media aklimatisasi. Selanjutnya, planlet dapat diadaptasikan dengan menaikkan RH secara bertahap yang dapat dilakukan dengan menyungkup planlet dan menaikkan intensitas matahari secara bertahap dengan memberikan naungan di

lapangan. Planlet yang telah siap dapat dipindahkan ke lingkungan RH normal dan cahaya matahari penuh seperti tanaman pada umumnya.

Eksplan yang dikulturkan pada media yang tepat akan mengalami morfogenesis dan tumbuh menjadi planlet. Terdapat dua pola regenerasi yang dapat terjadi pada eksplan, yaitu organogenesis dan embriogenesis. Organogenesis diartikan sebagai proses terbentuknya organ-organ seperti pucuk dan akar, sedangkan embriogenesis diartikan sebagai proses terbentuknya embrio somatik (Nurilmala, 2018). Embrio somatik adalah embrio yang bukan berasal dari zigot, tetapi dari sel biasa dari tubuh tanaman. Organogenesis dan embriogenesis dapat terjadi melalui dua cara, yaitu secara langsung dan tidak langsung. Organogenesis langsung akan membentuk organ tanpa terjadinya kalus, sedangkan organogenesis tidak langsung akan melewati fase kalus sebelum terbentuknya organ, begitu pula dengan embriogenesis langsung dan tidak langsung. Embriogenesis langsung artinya pembentukan embrio terjadi secara langsung dari permukaan jaringan eksplan, sedangkan embriogenesis tidak langsung akan melewati fase kalus yang nantinya akan akan terbentuk embrio (Mastuti, 2017).

### **2.3 Embriogenesis Somatik**

Terdapat dua macam embrio tanaman, yaitu embrio zigotik dan embrio somatik. Embrio yang biasa dikenal adalah embrio zigotik, yaitu embrio yang berasal dari peleburan antara sel gamet jantan dan sel gamet betina yang kemudian berkembang menjadi zigot. Pada embrio somatik, embrio tidak berasal dari peleburan antara sel gamet jantan dan betina, melainkan sel-sel tubuh (*somatik*) tanaman. Proses pembentukan embrio somatik ini disebut dengan embriogenesis somatik.

Embrio somatik atau embrio non-zigotik adalah embrio yang merupakan hasil pertumbuhan dan perkembangan suatu struktur bukan zigot, misalnya sel somatik yang dapat berupa sel daun, akar, hipokotil, dan lainnya. Proses pembentukan embrio somatik ini dapat terjadi secara langsung dan tidak langsung. Proses

pembentukan embrio somatik secara langsung, tidak melewati fase kalus sehingga tahap yang dilewati adalah eksplan – embrio – planlet, sedangkan proses pembentukan embrio somatik secara tidak langsung memiliki tahapan yang melewati fase kalus, yaitu eksplan – kalus – embrio – planlet (Dwiyani, 2015).

Embrio somatik dapat dimanfaatkan dalam mempelajari fisiologi pada embriogenesis zigotik karena melalui pola morfologis dan fisiologis yang kurang lebih sama dengan embrio zigotik. Embrio somatik juga memiliki banyak kegunaan, di antaranya adalah untuk memperbanyak tanaman secara klonal, untuk menyimpan benih secara *in vitro* dengan teknik enkapsulasi, dan untuk pemuliaan tanaman dengan memanfaatkan embrio somatik sebagai target transformasi genetik. Penyisipan gen ke dalam tanaman memerlukan pemilihan eksplan yang tepat sebagai jaringan target karena akan berpengaruh terhadap keberhasilan proses transformasi. Pardal dkk. (2005) melaporkan bahwa target transformasi genetik menggunakan eksplan embrio muda memberikan hasil yang lebih baik daripada kotiledon muda berdasarkan dari persentase gus positif yang lebih tinggi pada embrio muda. Fitriani (2016) melaporkan bahwa penggunaan kultur embriogenik dengan metode agrobacterium memiliki keberhasilan yang lebih sukses dibandingkan menggunakan kotiledon. Pardal dkk. (2005) menyebutkan bahwa eksplan yang dibutuhkan sebagai target transformasi genetik melalui penembakan partikel sebaiknya bersifat embriogenik karena sel mengalami aktivitas pembelahan yang sangat tinggi sehingga diharapkan dapat bertahan hidup setelah mengalami penembakan partikel.

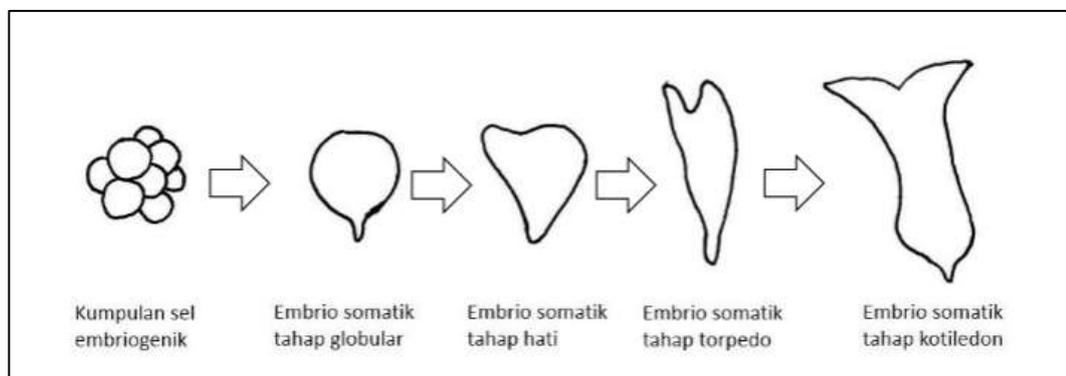
Embrio somatik dapat terjadi jika kalus embriogenik mengalami perubahan morfologi dan biokimia menjadi suatu struktur bipolar yang tidak terhubung dengan pembuluh vaskuler dengan jaringan asalnya. Embrio somatik dapat muncul akibat respon dari sinyal pembentukan embrio somatik (PES). Akan tetapi, tidak semua sel dapat merespon sinyal tersebut, melainkan hanya sel yang kompeten. Sel yang kompeten akan merespon sinyal dan mengalami diferensiasi menjadi sel embriogenik yang jika ditempatkan pada kondisi yang sesuai akan berkembang menjadi embrio somatik (Hapsoro dan Yusnita, 2022).

Fase induksi embriogenesis somatik terjadi pada saat eksplan yang memiliki sel yang kompeten membentuk kalus sebagai respon sinyal yang berupa ZPT berupa auksin. Bentuk kalus ini merupakan proses dediferensiasi eksplan dimana secara fisiologis sel-sel pada kalus berada pada *ground state*, yaitu belum jelas mengarah kemana pada proses pertumbuhan dan perkembangannya. Kalus dapat diinduksi dengan menggunakan auksin konsentrasi tinggi sehingga menjadi sel-sel yang embriogenik. Pada tahap ini, sel-sel yang sudah menjadi sel embriogenik sudah jelas akan menjadi embrio somatik pada kondisi yang sesuai sehingga munculnya kalus embriogenik menandakan telah memasuki fase ekspresi (Hapsoro dan Yusnita, 2022).

Fase ekspresi terjadi pada saat kalus embriogenik menjadi embrio somatik Ketika berada pada kondisi yang sesuai. Kalus embriogenik dapat mengalami diferensiasi dengan adanya ketersediaan ZPT berkonsentrasi rendah dalam media atau tanpa ZPT (Hapsoro dan Yusnita, 2022). Hardjo (2018) melaporkan bahwa penurunan konsentrasi auksin yang digunakan, yaitu 0,01 mg/l NAA membentuk embrio somatik lebih banyak, yaitu 90% kalus dalam 35 hari dibandingkan dengan penggunaan NAA yang tidak diturunkan konsentrasinya, yaitu 0,05 mg/l NAA dan dikombinasi dengan sitokinin BAP sebanyak 0,01 mg/l pada embriogenesis somatik angrek *Vanda tricolor* (Lindl.) var. *pallida*.

Kalus dapat dibedakan menjadi kalus kompak dan remah berdasarkan tekstur dan komposisi selnya (Sugiyarto dan Kuswandi, 2014). Kalus kompak mempunyai tekstur yang padat dan keras yang tersusun dari sel-sel kecil yang sangat rapat, sedangkan kalus remah mempunyai tekstur lunak dan tersusun dari sel-sel dengan ruang antarsel yang banyak. Karakteristik kalus dapat tergantung pada komposisi media pengulturan, khususnya ZPT dan jenis eksplan yang digunakan. Kalus embriogenik yang dihasilkan pada penelitian Wulansari dkk. (2015) dicirikan dengan strukturnya yang remah dan berwarna putih kekuningan.

Embrio somatik ubi kayu memiliki empat fase perkembangan. Tahapan morfologi embrio pada tanaman dikotil adalah fase globular (*globular stage*), fase hati (*heart stage*), fase torpedo (*torpedo stage*), dan fase kotiledon (*cotyledon stage*) yang merupakan fase akhir perkembangan embrio. Fase perkembangan embrio diilustrasikan pada Gambar 2 (Hapsoro dan Yusnita, 2022). Pada fase torpedo, meristem ujung batang dan meristem ujung akar sudah dapat terdeteksi. Meristem ujung batang nantinya akan berkembang menjadi tunas dan meristem ujung akar akan menjadi akar (Dwiyani, 2015).



Gambar 2. Ilustrasi fase perkembangan embrio somatik pada tanaman dikotil (Hapsoro dan Yusnita, 2018).

## 2.4 Zat Pengatur Tumbuh

Tumbuhan memiliki hormon yang berperan dalam mengatur pertumbuhan dan perkembangan. Hormon merupakan senyawa organik yang diproduksi oleh suatu bagian tubuh dalam konsentrasi kecil dan diangkut ke bagian lain yang dapat memengaruhi sel atau organ target sebagai bentuk dari respon fisiologis. Hormon tumbuhan biasanya disebut fitohormon merupakan senyawa yang disintesis oleh bagian tubuh tertentu lalu ditranslokasikan ke bagian tubuh lain pada tumbuhan (Asra dkk., 2020). Sedangkan, zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan senyawa organik yang berfungsi sebagai hormon, tetapi tidak dihasilkan secara alami sehingga sering disebut juga dengan hormon eksogen. ZPT adalah senyawa bukan hara yang dapat mendukung, menghambat, dan mengubah proses fisiologi dan biasanya dibutuhkan dalam jumlah sedikit (Jayati dan Nopiyanti, 2021).

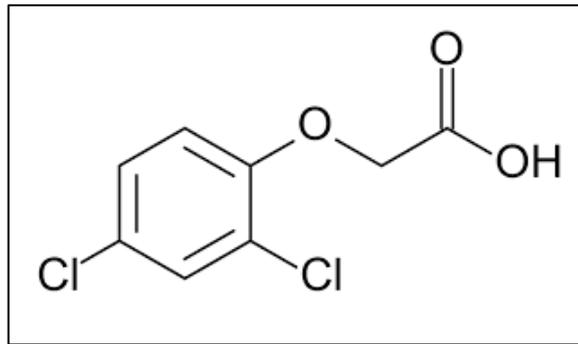
Penggunaan ZPT sangat penting dalam mengatur pertumbuhan tanaman ke arah yang diinginkan. Terdapat macam-macam ZPT yang dikenal, yaitu auksin, giberelin, sitokinin, asam absisat, dan etilen. Masing-masing ZPT memiliki peran dan kegunaan yang berbeda. ZPT dari golongan auksin, giberelin, dan sitokinin cenderung bersifat positif bagi pertumbuhan, sedangkan etilen dapat mendukung maupun menghambat pertumbuhan dan asam absisat merupakan penghambat pertumbuhan. ZPT dari golongan auksin berfungsi untuk mempercepat pembentukan akar pada stek batang. ZPT dari golongan sitokinin berfungsi meningkatkan pembentukan dan perkembangan daun. Giberelin berfungsi meningkatkan pembesaran dan perpanjangan sel (Jayati dan Nopiyanti, 2021).

Penggunaan ZPT auksin atau auksin eksogen dapat berfungsi untuk pemanjangan sel dan pembelahan sel dalam kultur jaringan dan organ (Singh dkk., 2021). 2,4-D dan Picloram merupakan ZPT golongan auksin yang sering digunakan dalam pengerjaan kultur *in vitro*. Auksin dibutuhkan untuk memberikan sinyal kepada eksplan dalam fase induksi embriogenesis somatik tidak langsung, sedangkan pada fase ekspresi, kalus akan menjadi embrio somatik dengan konsentrasi rendah atau tidak ada ZPT auksin dalam media (Hapsoro dan Yusnita, 2022). Akan tetapi, penambahan auksin dalam jumlah yang tidak sesuai dapat menghambat pertumbuhan tanaman karena hormon endogen atau fitohormon bekerja aktif dalam konsentrasi rendah. Hormon endogen bekerja aktif pada konsentrasi  $10^{-6}$ – $10^{-5}$   $\mu\text{M}$  (Asra dkk., 2020). Selain itu, ketepatan konsentrasi hormon eksogen dapat berbeda pada setiap jenis tanaman, walaupun tanaman yang hanya berbeda varietas. Hal ini dikarenakan efek yang ditimbulkan dari pemberian hormon eksogen dipengaruhi oleh hormon endogen yang telah terdapat di dalam tubuh tanaman tersebut.

Penggunaan media Murashige dan Skoog (MS) dengan penambahan 2,4-D merupakan media yang sering digunakan dalam menginduksi kalus embriogenik pada berbagai tanaman (Adri, 2017; Nugroho, 2017; Santos dan Paz, 2016; Sugiyarto dan Kuswandi, 2014). Pada tanaman ubi kayu, 2,4-D merupakan auksin yang sering digunakan dalam menginduksi embrio somatik setelah

Picloram (Berhanu dan Feyissa, 2020; Isah dkk., 2019; Magambo dkk., 2024; Puad dkk., 2022; Sessou dkk., 2019). Auksin 2,4-D dilaporkan memiliki kemampuan untuk menginduksi kalus 100% (Berhanu dan Feyissa, 2020; Sessou dkk., 2019), sedangkan, konsentrasi terbaik yang didapatkan pada berbagai penelitian embriogenesis somatik ubi kayu berbeda-beda tergantung klon yang digunakan. Magambo dkk., (2024) melaporkan bahwa hasil maksimum dalam menginduksi OES (*Organised Embryogenic Structure*) berbeda pada ketiga genotipe yang digunakan, misalnya pada genotipe NASE19 yang mendapatkan hasil terbaik pada media 5 mg/l 2,4-D, sedangkan NASE13 pada media 8 mg/l 2,4-D. Isah dkk., (2019) juga melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi 2,4-D dari 2 mg/l ke 4 mg/l memberikan hasil pada peningkatan jumlah embrio somatik primer. Akan tetapi, Puad dkk., (2022) melaporkan bahwa konsentrasi 2,4-D tertinggi yang digunakan, yaitu pada 20 mg/l menghasilkan frekuensi pembentukan kalus paling sedikit. Selain itu, penggunaan 2  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> ditambah dengan 2,4-D berbagai konsentrasi memiliki persentase induksi embrio terbaik (Berhanu dan Feyissa, 2020).

Senyawa 2,4-*Dichlorophenoxyacetic Acid* banyak digunakan sebagai herbisida. Senyawa ini dapat digolongkan sebagai herbisida karena sifat *inhibitor* yang dapat menghambat pertumbuhan gulma. Dilaporkan pada penelitian Apriadi dkk. (2013), penggunaan 2,4-D dengan taraf dosis 0,649–1,297 kg/ha dapat menekan pertumbuhan gulma daun lebar dan teki, tetapi kurang efektif untuk mengendalikan gulma rumput. Penggunaan 2,4-D pada kultur *in vitro* dilaporkan menghasilkan embrio somatik yang berbeda-beda pada taraf konsentrasi yang diujikan (Berhanu dan Feyissa, 2020; Isah dkk., 2019; Magambo dkk., 2024; Puad dkk., 2022; Sessou dkk., 2019). Oleh karena itu, penggunaan taraf konsentrasi 2,4-D yang tepat dalam media perlu diketahui sehingga tidak menimbulkan sifat *inhibit* pada tanaman yang dikulturkan. Rumus molekul 2,4-D adalah C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>3</sub> seperti pada Gambar 3.



Gambar 3. Rumus molekul 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid  
(Kartikasari dkk., 2013).

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada September 2022 sampai dengan Mei 2023.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah stek ubi kayu klon TDSL dan Waxy, eksplan steril klon TDSL dan Waxy, aquades, media kultur dasar *Murashige dan Skoog* (MS), media kultur dasar  $\frac{1}{2}$  MS,  $\text{CuSO}_4$ , *Naphthaleine Acetic Acid* (NAA), air, detergen, spritus, air steril, *Bayclin* (NaOCl 5,25%), *Sunlight*, tisu, kapas, label, plastik, karet, plastik *wrapping*, 2,4-*Diclorophenoxyacetic acid* (2,4-D), *Benzyl Adenine* (BA), agar-agar (*Swallow Globe Plain*, *Oxoid*, dan *Gelrite*), sukrosa, KOH 1N, dan HCl 1N.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat standar yang digunakan dalam bidang kultur jaringan. Alat-alat tersebut antara lain, *laminar air flow cabinet*, autoklaf *Tomy*, autoklaf *Buddenberg*, destilator, botol kultur, rak kultur, mikroskop stereo *Olympus*, komputer, timbangan digital, timbangan analitik, karet, plastik, *scalpel*, *blade*, gelas ukur, gelas *Beaker*, labu *Erlenmeyer*, kereta dorong, keranjang, bak air, ember, gayung, sabut pembersih, sikat pembersih, panci, spatula, *magnetic stirrer*, derigen, *box container*, pH meter, ubin, botol *Schott*, *show case*, lap kain, mangkok mini, *sprayer*, kompor, tabung gas, korek api, kamera, cawan petri, alat tulis (buku, pena, pensil, penggaris), pinset, pipet tetes, mikropipet, dan bunsen.

### 3.3 Metode Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap faktorial dengan dua faktor ( $2 \times 4$ ). Faktor pertama, yaitu klon ubi kayu (K) terdiri atas dua taraf, yaitu K1 = klon TDSL dan K2 = klon Waxy. Faktor kedua, yaitu konsentrasi 2,4-D (D) terdiri atas empat taraf, yaitu D1 = 4 mg/l, D2 = 8 mg/l, D3 = 12 mg/l, dan D4 = 16 mg/l. Berdasarkan rancangan tersebut, maka diperoleh 8 kombinasi perlakuan yang dijelaskan secara rinci sebagai berikut:

- (1) K1D1 = Klon TDSL + 4 mg/l 2,4-D
- (2) K1D2 = Klon TDSL + 8 mg/l 2,4-D
- (3) K1D3 = Klon TDSL + 12 mg/l 2,4-D
- (4) K1D4 = Klon TDSL + 16 mg/l 2,4-D
- (5) K2D1 = Klon Waxy + 4 mg/l 2,4-D
- (6) K2D2 = Klon Waxy + 8 mg/l 2,4-D
- (7) K2D3 = Klon Waxy + 12 mg/l 2,4-D
- (8) K2D4 = Klon Waxy + 16 mg/l 2,4-D

Percobaan dilakukan sebanyak 4 ulangan dengan setiap ulangan terdiri atas 3 botol. Setiap botol terdiri atas tiga eksplan daun sehingga terdapat 288 eksplan yang terdiri atas 144 eksplan TDSL dan 144 eksplan Waxy. Total satuan percobaan yang digunakan adalah 32 satuan percobaan. Homogenitas diuji dengan uji Levene 5%. Jika homogenitas terpenuhi, data hasil penelitian dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* pada taraf 5%. Apabila perlakuan menunjukkan perbedaan signifikan maka dilakukan uji lanjut dengan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 5% dengan model linier rancangan acak lengkap faktorial.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilaksanakan dalam beberapa tahap mulai dari penyiapan bahan tanam di lapang hingga induksi embrio somatik di laboratorium. Tahapan penelitian diuraikan sebagai berikut:

### 3.4.1 Penyiapan Bahan Tanam di Lapang

Bahan tanam berupa setek ubi kayu klon TDSL umur 5 bulan dan Waxy umur 4 bulan digunakan sebagai sumber eksplan yang digunakan dalam menginisiasi embriogenesis somatik. Penyiapan bahan tanam terdiri atas tahap 0, tahap 1, tahap 2, tahap 3, dan tahap 4. Tahap 0 merupakan tahap pemilihan dan perlakuan tanaman induk sumber eksplan. Pada tahap ini, dilakukan penanaman stek ubi kayu di Laboratorium Lapang Terpadu. Penanaman stek dilakukan di rumah kaca dengan tujuan mengurangi tingkat kontaminasi eksplan asal lapang yang akan disterilisasi. Stek ubi kayu ditanam dengan media tanam tanah dan pupuk kandang kotoran sapi dengan perbandingan 1:1. Media tersebut diaduk menggunakan cangkul lalu dimasukkan ke dalam *polybag* berukuran 40 x 40 cm. Media tanam disusun di atas bench dalam rumah kaca dan ditunggu hingga 7 hari. Stek batang ubi kayu dengan panjang  $\pm 30$  cm ditanam di media yang telah siap tanam dengan setiap *polybag* berisi 3 stek batang. Stek batang ubi kayu disiram setiap hari pada pagi atau sore hari hingga menghasilkan tunas yang tumbuh pada mata tunas ubi kayu yang selanjutnya akan diisolasi sebagai eksplan asal lapang.

### 3.4.2 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan perlu disterilisasi sebelum digunakan untuk mencapai kondisi steril. Tahapan sterilisasi alat dijelaskan sebagai berikut:

#### 3.4.2.1 Sterilisasi Alat Diseksi

Alat diseksi yang digunakan dalam kegiatan kultur jaringan perlu disterilisasi sebagai penerapan prinsip steril agar tidak terdapat kontaminasi. Alat diseksi berupa pinset, spatula, scalpel, cawan petri, ubin, dan kapas disterilisasi menggunakan autoklaf. Alat dibungkus dengan menggunakan kertas lalu dilapisi dengan plastik tahan panas. Khusus untuk kapas, dimasukkan ke dalam botol steril lalu ditutup dengan plastik. Selain itu, alat-alat yang digunakan untuk menyimpan media maupun larutan stok perlu disterilisasi, seperti botol schott, gelas ukur, dan

labu Erlenmeyer. Alat-alat tersebut diautoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1,2 kg/cm<sup>2</sup> selama 30 menit dengan menggunakan autoklaf *Tomy*.

#### 3.4.2.2 Sterilisasi Botol

Botol kultur yang akan digunakan dalam pengerjaan kultur jaringan harus dalam keadaan steril sehingga tidak terdapat mikroorganisme yang menjadi kontaminan dalam pengerjaan kultur jaringan. Terdapat dua tahap sterilisasi botol. Tahap pertama, yaitu botol kotor yang masih berisi media yang terdapat kontaminasi maupun yang tidak berisi media disterilisasi menggunakan autoklaf *Buddenberg* selama 30 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1,2 kg/cm<sup>2</sup>. Setelah selesai, media di dalam botol dibuang ke dalam plastik buangan lalu botol direndam dalam bak rendam yang telah diisi air dengan 40 g detergen (Rinso). Setelah itu, botol dicuci menggunakan sabun cuci piring (Sunlight) dengan bantuan sabut cuci. Botol yang telah bersih, direndam kembali selama 1 malam di bak rendaman baru yang berisi air dengan 40 g detergen dan 150 ml disinfektan per bak. Botol dicuci kembali dengan menggunakan sabun cuci piring dengan bantuan sabut cuci. Setelah itu, botol dibilas di bawah air mengalir dan direndam dalam air panas selama 15 menit lalu ditiriskan. Botol ditutup plastik di bagian atas dan kemudian diikat dengan karet.

Tahap kedua sterilisasi botol, yaitu sterilisasi botol bersih. Tahap ini dilakukan dengan mengautoklaf botol bersih hasil sterilisasi tahap pertama. Botol disusun ke dalam autoklaf *Tomy* yang digunakan sebagai autoklaf bersih untuk media dan alat. Autoklaf diatur untuk mensterilisasi selama 30 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1,2 kg/cm<sup>2</sup>. Setelah itu, botol steril disusun ke box penyimpanan dan telah siap digunakan.

#### 3.4.3 Pembuatan Media

Media dasar yang digunakan pada penelitian ini adalah media Murashige dan Skoog (1962) yang mengandung garam-garam mineral. Terdapat beberapa

macam media yang digunakan pada penelitian ini, yaitu media prekondisi, induksi kalus primer, induksi embriogenesis somatik, maturasi embrio, regenerasi tunas, dan pengakaran.

### 3.4.3.1 Media Prekondisi

Media prekondisi merupakan media yang digunakan untuk persiapan sebelum masuk ke perlakuan sehingga didapatkan eksplan steril yang akan digunakan sebagai bahan tanam untuk diteliti. Media prekondisi yang digunakan pada penelitian ini adalah media dasar ½ MS, yaitu media dasar Murashige dan Skoog (1962) dengan komposisi makro yang digunakan adalah setengah dari kebutuhan (Tabel 1).

Tabel 1. Komposisi Media Murashige dan Skoog (1962)

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

Media ½ MS memiliki komposisi yang sama dengan komposisi media MS0, akan tetapi yang membedakan adalah kebutuhan stok makro yang ditambahkan ke media ½ MS hanya separuhnya (Tabel 2). Komponen-komponen media tersebut, selain agar-agar dimasukkan ke dalam *beaker glass* berisi aquadest ±300 ml lalu dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah itu, larutan media ditera menggunakan gelas ukur 1 liter dengan menambahkan aquadest hingga batas 1000 ml. Kemudian, larutan media dihomogenkan kembali lalu dilakukan pengaturan pH menjadi 5,8. Setelah itu, larutan media dimasak dengan menambahkan agar-agar. Larutan media dimasak hingga mendidih dan diaduk-aduk selama pemasakan agar tidak terdapat agar-agar yang menggumpal. Larutan media yang telah mendidih dimasukkan ke dalam botol kultur sebanyak ±25 ml/botol dan ditutup kembali menggunakan plastik.

Tabel 2. Komponen Media ½ MS

No.	Komposisi Media	Komponen MS0 dalam 1 l Media (ml)	Komponen ½ MS dalam 1 l Media (ml)
1	Stok Makro (10x)	100	50
2	Stok Mikro A (100x)	10	10
3	Stok Mikro B (1000x)	1	1
4	Stok CaCl <sub>2</sub> (100x)	10	10
5	Stok Fe (100x)	10	10
6	Stok Vitamin MS (100x)	10	10
7	Stok Mioinositol (10x)	100	100

#### 3.4.3.2 Media Induksi Kalus Primer

Media induksi kalus primer (IKP) yang digunakan adalah media MS0 yang ditambahkan 2,4-D dengan berbagai taraf konsentrasi, yaitu 4, 8, 12, dan 16 mg/l (Tabel 3).

#### 3.4.3.3 Media Induksi Embriogenesis Somatik

Kalus umur 25 hsi yang telah berkembang pada media IKP disubkultur kembali ke media yang sama dengan sebelumnya (Tabel 3), yaitu MS0 yang ditambahkan berbagai taraf konsentrasi 2,4-D (4, 8, 12, dan 16 mg/l). Media induksi embrio

somatik (IES) berfungsi untuk menginduksi embrio somatik pada kalus karena kalus sangat cepat dalam menyerap nutrisi yang terdapat dalam media sehingga perlu dilakukan subkultur kembali agar embrio dapat terinduksi.

Tabel 3. Komposisi Tambahan dalam Media IKP 2,4-D

No.	Komponen Media	Volume dan Konsentrasi Larutan dalam 1 liter Media
1.	2,4-D	4 mg/l (D1) 8 mg/l (D2) 12 mg/l (D3) 16 mg/l (D4)
2.	NAA	6 mg
3.	CuSO <sub>4</sub>	4 µl
4.	Sukrosa	40 g
5.	Agar-agar	8 g

#### 3.4.3.4 Media Maturasi Embrio

Media maturasi embrio merupakan media pematangan embrio sehingga embrio yang ada dapat berkembang hingga mencapai fase kotiledon yang merupakan fase akhir dalam embrio. Maturasi embrio diinduksi dengan cara menurunkan konsentrasi ZPT yang terkandung dalam media. Penurunan konsentrasi hormon yang terkandung dalam media akan memicu terhentinya kalus untuk membelah dan fokus kepada perkembangan embrio sehingga embrio akan dalam tahap sempurna. Pada penelitian ini, media maturasi embrio yang digunakan adalah MS0 + 2 mg/l 2,4-D.

#### 3.4.3.5 Media Regenerasi Tunas

Embrio sejatinya sama seperti benih yang akan memiliki akar dan tunas. Embrio yang telah berkembang dalam fase kotiledon telah siap untuk dikecambahkan. Embrio disubkultur kembali ke dalam media regenerasi tunas, yaitu media MS0 yang ditambahkan *Benzyl Adenine* (BA) sebanyak 0,2 mg/l.

#### 3.4.3.6 Media Pengakaran

Media pengakaran merupakan media terakhir dalam inkubasi embrio pada tahap *in vitro* sebelum siap untuk diaklimatisasi. Media pengakaran yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS0 dengan dan tanpa arang aktif. Arang aktif ditambahkan sebanyak 1 g/l. Media pengakaran digunakan untuk menginduksi akar pada embrio yang telah memiliki tunas yang telah berkembang sempurna.

#### 3.4.4 Sterilisasi Media

Sterilisasi media dilakukan pada media yang telah dituang ke dalam botol kultur steril sebanyak  $\pm 25$  ml per botol lalu ditutup dengan plastik. Botol diautoklaf dengan autoklaf *Tomy* selama 15 menit dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan  $1,2 \text{ kg/cm}^2$ . Botol kemudian dari autoklaf dan disimpan dalam ruang penyimpanan media dengan suhu  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.5 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilaksanakan dalam beberapa tahap dengan langkah-langkah yang berbeda dalam setiap tahapan. Tahapan penanaman eksplan diuraikan sebagai berikut:

##### 3.4.5.1 Eksplan Asal Lapang

Eksplan asal lapang berupa mata tunas digunakan sebagai bahan tanam *in vitro* dalam kultur jaringan ubi kayu. Tunas dipotong menjadi eksplan batang berukuran  $\pm 2$  cm dengan setiap eksplan terdiri atas satu mata tunas. Eksplan yang telah disterilisasi ditanam dalam media prekondisi, yaitu media  $\frac{1}{2}$  MS ataupun media MS. Eksplan ditanam secara vertikal dengan mata tunas menghadap ke atas. Terdapat beberapa tahapan pengerjaan yang perlu dilakukan sebelum eksplan ditanam dalam media *in vitro*, yaitu sterilisasi eksplan di luar *laminar air flow cabinet* (LAFC) dan sterilisasi eksplan di dalam LAFC. Sterilisasi eksplan di

luar LAFC dimulai dengan tunas berumur  $\pm 2$  minggu yang tumbuh pada ubi kayu di rumah kaca dipotong pada tiga buku teratas dengan gunting yang telah disterilisasi dengan NaOCl lalu dibawa ke laboratorium untuk dilakukan sterilisasi. Tunas dicuci di air mengalir selama 30 menit dan diulang 2 kali. Kemudian, tunas dipotong menjadi berukuran  $\pm 5$  cm lalu dicuci kembali menggunakan detergen (Rinso) sebanyak 1 sendok takar atau  $\pm 30$  g selama 5 menit lalu dibilas dengan air hingga busa hilang. Tunas kemudian dipindahkan ke botol steril dengan menggunakan pinset.

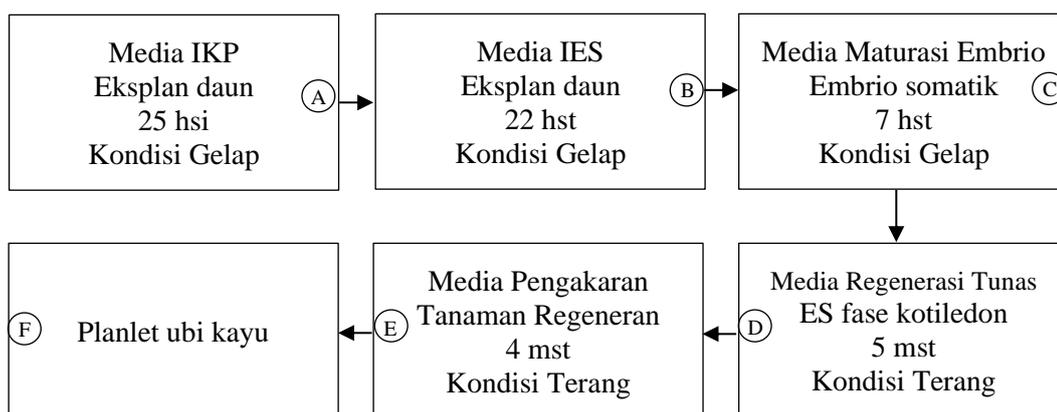
Sterilisasi eksplan di dalam LAFC merupakan tahap selanjutnya dalam sterilisasi eksplan. Sterilisasi dilakukan dengan merendam eksplan dalam larutan Klorox 20% yang dibuat dengan 20 ml *Bayclin* (NaOCl) + 80 ml air steril. Larutan Klorox 20% dimasukkan ke dalam botol berisi eksplan tunas hingga eksplan terendam semua bagiannya lalu ditambahkan 2 tetes larutan Tween-20 per 100 ml larutan Klorox. Botol digerakkan melingkar selama 15 menit lalu larutan ditiriskan. Tunas dibilas dengan air steril selama 2 menit dan diulang sebanyak 3 kali. Kemudian, eksplan disterilisasi menggunakan larutan alkohol 70% lalu dikocok kembali dengan gerakan melingkar selama 1 menit lalu ditiriskan. Eksplan tunas dibilas dengan air steril selama 2 menit dan diulang sebanyak 3 kali.

#### 3.4.5.2 Penanaman Eksplan Prekondisi

Tunas yang tumbuh pada eksplan hasil sterilisasi yang telah ditanam sebelumnya ditanam kembali (disubkultur) ke media dasar  $\frac{1}{2}$  MS agar didapatkan eksplan steril. Hal ini dilakukan karena eksplan hasil sterilisasi biasanya terkena kontaminasi bakteri karena mikroorganisme yang terdapat pada permukaan eksplan sangat banyak sehingga perlu dilakukan subkultur kembali. Subkultur dilakukan dengan memotong secara hati-hati mata tunas yang tumbuh sehingga eksplan maupun alat tidak terkena bakteri yang terdapat pada bagian dasar eksplan induk maupun di media. Mata tunas ditanam kembali secara vertikal dengan setiap eksplan terdapat satu mata tunas.

### 3.4.5.3 Penanaman Eksplan ke Media Induksi Kalus Primer

Induksi embriogenesis somatik ubi kayu diawali dengan melakukan penanaman eksplan berupa daun pucuk muda pada media IKP selama 25 hsi dalam kondisi gelap lalu eksplan disubkultur ke media yang sama selama 22 hst. Kalus yang tumbuh embrio kemudian disubkultur kembali ke media pematangan embrio selama 7 hari sehingga didapatkan embrio yang sudah berkembang ke tahap kotiledon. Embrio ini kemudian disubkultur kembali ke media regenerasi tunas dan diinkubasi dalam kondisi terang untuk dapat berkecambah menjadi tunas mikro. Tunas mikro yang didapatkan dapat disubkultur ke media pengakaran setiap bukunya hingga didapatkan tunas yang memiliki akar dan daun yang disebut planlet (Gambar 4).



Gambar 4. Alur induksi embriogenesis somatik ubi kayu eksplan daun menggunakan 2,4-D

Eksplan daun berumur 15 hari dari tunas steril hasil prekondisi ditanam pada media perlakuan D1, D2, D3, dan D4. Daun paling muda digunakan sebagai eksplan dalam menginduksi kalus primer pada ubi kayu. Daun dipotong menjadi bentuk persegi panjang dengan memotong kedua ujung sisi daun ubi kayu dengan bentuk dan ukuran yang diseragamkan pada semua perlakuan, yaitu  $\pm 7 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ . Bagian permukaan bawah daun diletakkan menempel di permukaan media IKP. Setiap botol terdiri atas 3 eksplan potongan daun. Botol tersebut dilabel lalu di-*wrapping* dan kemudian diinkubasi dalam kondisi gelap selama 25 hst dengan suhu  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 3.4.5.4 Penanaman Kalus ke Media Induksi Embriogenesis Somatik

Kalus yang muncul dari media induksi kalus merupakan kalus primer. Kalus primer diinduksi ke media yang sama, yaitu media D1, D2, D3, dan D4. Hal ini dilakukan untuk memberikan kembali unsur hara yang dibutuhkan oleh kalus sehingga dapat menginduksi embrio somatik pada kalus. Kalus ditimbang dan kemudian ditanam pada media dengan satu botol kultur terdapat tiga kalus di dalamnya. Botol dilabeli lalu di-*wrapping* dan kemudian diinkubasi dalam kondisi gelap selama 22 hst dengan suhu  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.5.5 Penanaman Embrio Somatik ke Media Maturasi Embrio

Embrio somatik yang muncul pada kalus yang ditanam di media IES diamati dengan mikroskop. Pengamatan dilakukan untuk mengamati keberadaan embrio somatik yang terdapat pada kalus dan mengetahui jumlah embrio serta fase yang terjadi pada embrio. Kalus disubkultur ke media maturasi embrio yang mengandung 2,4-D dalam kondisi rendah untuk menginduksi pematangan embrio sehingga embrio dapat berkembang dan akhirnya mencapai fase kotiledon yang merupakan fase terakhir pada embrio. Kalus ditanam pada media maturasi dengan setiap botol kultur terdapat tiga kalus di dalamnya. Botol diberikan label lalu di-*wrapping* dan kemudian diinkubasi dalam kondisi gelap selama 7 hst dengan suhu  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.5.6 Penanaman Embrio Somatik ke Media Regenerasi Tunas

Embrio yang telah mencapai fase kotiledon disubkultur kembali dalam media regenerasi tunas yang mengandung *Benzyl Adenine* (BA) untuk memacu perkembangan tunas pada embrio sehingga akan tumbuh tunas (*shoot*) yang merupakan bagian tanaman yang berada di atas permukaan media. Embrio somatik ditanam ke dalam media regenerasi tunas dengan cara memotong kalus yang memiliki embrio sehingga bagian kalus yang tidak berembrio dibuang.

Embrio somatik diinkubasi dalam kondisi terang selama 5 mst dengan suhu  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.5.7 Penanaman Tunas Hasil Embrio Somatik ke Media Pengakaran

Tunas yang telah berkembang dalam media regenerasi tunas selanjutnya ditanam dalam media pengakaran yang mengandung arang aktif dan tidak mengandung arang aktif. Arang aktif berfungsi untuk menyerap ZPT yang sebelumnya telah ditambahkan dalam media sehingga akan tumbuh akar dan didapatkan planlet dengan bentuk tanaman ubi kayu yang normal. Penanaman tunas dilakukan dengan memisahkan tunas yang tumbuh berdekatan. Tunas ditanam dalam media dengan setiap botol media terdapat 3–5 tunas. Tunas diinkubasi dalam kondisi terang dengan suhu  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 4$  mst hingga didapatkan planlet yang siap untuk diaklimatisasi.

### 3.5 Variabel Pengamatan

Terdapat beberapa variabel yang diamati dalam penelitian ini, di antaranya adalah pengamatan visual, waktu muncul kalus primer, persentase eksplan berkalus, luasan pembentukan kalus per eksplan, bobot kalus primer, jumlah embrio primer per eksplan, dan persentase eksplan berembrio.

#### 3.5.1 Pengamatan Visual

Kalus yang muncul pada eksplan daun yang diinduksi dalam media IKP diamati secara visual, mencakup warna kalus, struktur kalus, bagian eksplan yang muncul kalus pertama, bentuk kalus, dan embrio yang terbentuk, serta fase kalus embrio somatik.

### 3.5.2 Waktu Muncul Kalus Primer

Pengamatan munculnya kalus primer pada eksplan daun yang diinduksi dalam media IKP dilakukan setiap dua hari setelah penanaman. Inisiasi pembentukan kalus dapat ditandai dengan tampaknya bagian eksplan daun yang mengerut, membesar, dan berwarna putih kekuningan.

### 3.5.3 Persentase Eksplan Berkalus

Eksplan yang membentuk kalus dihitung dengan rumus perhitungan sebagai berikut:

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

### 3.5.4 Scoring Pembentukan Kalus per Eksplan

*Scoring* pembentukan kalus dilakukan untuk menilai persentase bagian daun yang berkalus. *Scoring* dilakukan dengan memberikan skor pada keragaan pembentukan kalus per eksplan. Penentuan skor pembentukan kalus mengacu pada Tabel 4 dan divisualisasikan pada Gambar 5.

Tabel 4. *Scoring* Pembentukan Kalus Primer

Skor	Interval Persentase Pembentukan Kalus (%)	Keterangan
0	0	Tidak terdapat pembentukan kalus pada eksplan
1	$0 < x \leq 25$	Kalus terbentuk hingga 25% dari bagian eksplan
2	$25 < x \leq 50$	Kalus terbentuk hingga > 25% dari bagian eksplan, tetapi $\leq 50\%$
3	$50 < x \leq 75$	Kalus terbentuk hingga > 50% dari bagian eksplan, tetapi $\leq 75\%$
4	$75 < x \leq 100$	Kalus terbentuk > 75% dari bagian eksplan



Gambar 5. Visualisasi *scoring* pembentukan kalus per eksplan (Yelli dkk., 2023).

### 3.5.5 Bobot Kalus Primer 25 hsi

Bobot kalus primer ditimbang pada umur 25 hsi dalam media IKP, yaitu bertepatan dengan subkultur kalus ke media IES. Bobot kalus didapatkan dengan menimbang sampel kalus sebanyak 10% dari jumlah populasi dalam setiap perlakuan sehingga didapatkan 3 kalus per perlakuan sebagai sampel. Kalus dipilih dari berbagai ukuran, yaitu kecil, sedang, dan besar untuk mewakili populasi. Proses penimbangan dilakukan secara steril di dalam LAFC.

### 3.5.6 Jumlah Embrio Primer per Eksplan

Jumlah embrio somatik yang terdapat per eksplan dapat diamati setelah 22 hsi dalam media induksi embriogenesis somatik. Jumlah embrio per eksplan diamati dengan bantuan mikroskop stereo *Olympus* pada berbagai perbesaran hingga 40x.

### 3.5.7 Persentase Eksplan Berembrio

Persentase eksplan berembrio dihitung setelah eksplan diinduksi pada media IES. Persentase eksplan berembrio dapat dihitung menggunakan rumus perhitungan sebagai berikut:

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

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Simpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- (1) Jenis klon berpengaruh nyata dalam menginduksi kalus primer dan embrio somatik primer ubi kayu. Persentase pembentukan kalus per eksplan (*scoring*) 3 msi klon TDSL memberikan respon lebih baik dibandingkan klon Waxy dengan selisih skor 0,38. Persentase eksplan berembrio lebih tinggi dihasilkan oleh klon Waxy dibandingkan klon TDSL dengan selisih 6,94%;
- (2) Semua konsentrasi 2,4-D yang diujikan memberikan hasil yang tidak berbeda nyata pada semua perlakuan dalam menginduksi pembentukan kalus primer dan embrio somatik primer ubi kayu;
- (3) Tidak terdapat interaksi yang nyata antara jenis klon ubi kayu dan penambahan beberapa konsentrasi 2,4-D pada media terhadap pembentukan embrio somatik ubi kayu.

### 5.2 Saran

Penelitian yang telah dilakukan masih belum dapat menginduksi embrio somatik primer secara optimal pada eksplan daun ubi kayu. Penulis menyarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai embriogenesis somatik ubi kayu dengan menggunakan jenis dan konsentrasi ZPT yang berbeda atau eksplan yang berbeda, seperti daun muda, daun tua, serta lobus daun untuk melihat kompetensi sel ubi kayu.

## **DAFTAR PUSTAKA**

## DAFTAR PUSTAKA

- Adri, R. F. 2017. Pengaruh 2,4-D terhadap induksi embrio somatik tanaman gambir (*Uncaria Gambir* Roxb.). *Menara Ilmu*. 11 (75): 135–141.
- Apriadi, W., Sembodo, D. R. J., dan Susanto, H. 2013. Efikasi herbisida 2,4-D terhadap gulma pada budidaya tanaman padi sawah (*Oryza sativa* L.). *Jurnal Agrotek Tropika*. 1 (3): 269–276.
- Arumingtyas, E.L., Mastuti, R., dan Hakim, L. 2021. *Biologi Tanaman Hortikultura*. UB Press. Malang. 282 hlm.
- Asmaningrum, H. P., Betaubun, M., Nasrawati, dan Irianto, O. 2022. *Booklet Bahan Pangan Lokal Kabupaten Merauke*. Deepublish. Sleman. 37 hlm.
- Asra, R., Samarlina, R. A., dan Silalahi, M. 2020. *Hormon Tumbuhan*. UKI Press. Jakarta Timur. 176 hlm.
- Avivi, S. 2011. Regeneration of cocoa zygotic embryo using kinetin in B5 media. *Ilmu Dasar*. 12 (2): 132–139.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Daerah Provinsi Lampung. 2017. *Makalah Kebijakan Kajian Hilirisasi Ubikayu*. Balitba. Bandar Lampung. 5 hlm.
- Berhanu, R., dan Feyissa, T. 2020. Factors influencing micropropagation and somatic embryogenesis of two cassava varieties, Kello and Qulle. *Cell Biology and Development*. 4 (2): 71–81.
- Dwiyani, R. 2015. *Kultur Jaringan Tanaman*. Pelawa Sari. Denpasar. 88 hlm.
- FAO. 2020. *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/qcl>. Diakses pada 11 Mei 2023 pukul 15.04 WIB.
- Fitriani, H. 2016. *Friable Embryogenic Callus* (FEC) sebagai material perbaikan sifat unggul ubi kayu. *Biotrends*. 7 (1): 9–13.

- Habibah, N. A., Enni, S. R., dan Yustinus, U. A. 2021. *Buku Ajar Kultur Jaringan Tumbuhan*. Deepublish. Sleman. 99 hlm.
- Hankoua, B. B., Ng, S. Y. C., Fawole, I., Puonti-Kaerlas, J., Pillay, M., dan Dixon, A. G. O. 2005. Regeneration of a wide range of african cassava genotypes via shoot organogenesis from cotyledons of maturing somatic embryos and conformity of the field-established regenerants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 82 (2): 221–231.
- Hapsoro, D., dan Yusnita. 2018. *Kultur Jaringan: Teori dan Praktik*. Andi. Yogyakarta. 88 hlm.
- Hapsoro, D., dan Yusnita. 2022. *Embriogenesis Somatik in vitro untuk Perbanyakkan Klonal dan Pemuliaan Tanaman*. Aura. Bandar Lampung. 80 hlm.
- Hardjo, P. H. 2018. *Monograf Kultur Jaringan Anggrek Embriogenesis Somatik Vanda Tricolor (Lindl.) Var. Pallida*. Graha Ilmu. Yogyakarta. 73 hlm.
- Isah, B. I., Mustapha, Y., dan Sani, L. A. 2019. Effect of types and concentrations of auxins on callus induction and primary somatic embryogenesis in low cyanide cassava cultivars (*Manihot Esculentum* Cranz). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. 11 (1): 497.
- Jayati, R. D., dan Nopiyanti, N. 2021. *Efektivitas Zat Pengatur Tumbuh (Zpt) Alami dan Kimiawi Terhadap Pertumbuhan*. Ahlimedia Press. Malang. 52 hlm.
- Kartikasari, P., Hidayat, M. T., dan Ratnasari, E. 2013. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) dan Kinetin (6-Furfurylaminopurine) untuk Pertumbuhan Tunas Eksplan Pucuk Tanaman Jabon (*Anthocephalus cadamba* Miq. ex Roxb.) secara *in vitro*. *LenteraBio*. 2 (1): 75–80.
- Kementerian Pertanian Republik Indonesia. 2019. *Statistik Pertanian*. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 428 hlm.
- Kustiani, E. 2020. *Kultur Jaringan: Teori dan Praktek*. Unik Press. Kediri. 237 hlm.
- Magambo, S., Nabatanzi, A., Alicai, T., Wembabazi, E., Oketcho, K., Nakalembe, I., dan Wagaba, H. 2024. Somatic embryo production and GFP genetic transformation in elite ugandan cassava genotypes. *Scientific African*. 23 (1): 1–10.

- Mastuti, R. 2017. *Dasar-Dasar Kultur Jaringan Tumbuhan*. UB Press. Malang. 126 hlm.
- Mongomake, K., Doungous, O., Khatabi, B., dan Fondong, V. N. 2015. Somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava (*Manihot Esculenta* Crantz) landraces from cameroon. *Springerplus*. 4 (1): 1–12.
- Murashige, T., dan Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15 (1): 473–497.
- Mustikarini, E.D., Lestari, T., dan Prayoga, G.I. Plasma Nutfah. Uwais Inspirasi Indonesia. Ponorogo. 370 hlm.
- Nanlohy, F. N., Yalindua, A., dan Kamagi, D. D. W. 2023. *Kultur Jaringan Tanaman*. Bintang Semesta Media. 122 hlm.
- Nintania, R., Setiawan, K., Yuliadi, E., dan Hadi, M.S. 2021. Evaluasi pertumbuhan dan kadar pati beberapa klon ubikayu (*Manihot Esculenta* Crantz). *Journal of Tropical Upland Resources*. 3 (1): 36–44.
- Nugroho, C. C. 2017. Induksi kalus embriogenik beberapa genotipe ubi kayu (*Manihot Esculenta* Crantz.). *Magrobis*. 17 (1): 1–15.
- Nuraida, D. 2012. Pemuliaan tanaman cepat dan tepat melalui pendekatan marka molekuler. *El-Hayah*. 2 (2): 97–103.
- Nurilmala, F. 2018. *Buku Ajar Kultur Jaringan Tanaman*. Universitas Nusa Bangsa. Bogor. 106 hlm.
- Pardal, S. J., Wattimena, G. A., Aswidinnoor, H., dan Herman, M. 2005. Transformasi genetik kedelai dengan gen proteinase inhibitor II menggunakan teknik penembakan partikel. *Agrobiogen*. 1 (2): 53–61.
- Puad, N. I. M., Sofri, N. S. N. M., Amid, A., dan Azmi, A. S. 2022. Optimization of surface sterilization method and initiation of bitter cassava callus culture. *Biological And Natural Resources Engineering Journal*. 6 (1): 47–59.
- Purwono, dan Purnamawati, H. 2007. *Budidaya 8 Jenis Tanaman Pangan Unggul*. Penebar Swadaya. Jakarta Timur. 22 hlm.
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2022. *Statistik Konsumsi Pangan Tahun 2022*. Kementerian Pertanian. 132 hlm.

- Rasyid, H. Al, Winanti, D. D. T., dan Subeki. 2019. *Scale up produksi beras siger dari klon ubi kayu waxy kapasitas 100 kg per jam. Semnas Tektan Polinela*. 18 hlm.
- Richana, N. 2018. *Menggali Potensi Ubi Kayu dan Ubi Jalar: Botani, Budidaya, Teknologi Proses dan Teknologi Pascapanen*. Nuansa Cendekia. Bandung. 124 hlm.
- Rizki A.N., Yuliadi, E., Setiawan, K., dan Hadi, M. S. 2021. Karakterisasi pertumbuhan, kandungan pati, dan kadar HCN berbagai klon ubikayu (*Manihot Esculenta* Crantz). *Journal Of Tropical Upland Resources*. 03 (01): 45–53.
- Robet A., dan Ratna W.A. 2008. *Teknologi Budidaya Ubi Kayu*. Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian. Bogor. 19 hlm.
- Rossin, C. B., dan 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.
- Santos, M. R. A. Dos, dan Paz, E. S. 2016. Effect of 2,4-D on callus induction in leaf explants of peach palm. *International Journal of Current Research*. 8 (09): 38688–38691.
- Sessou, A., Kahia, J. W., Ateka, E., Houngue, J. A., Dadjo, C., Njenga, P., dan Ahanhanzo, C. 2019. Callus induction in three mosaic disease resistant cassava cultivars in benin and genetic stability of the induced calli using Simple Sequence Repeat (SSR) and Sequence-Characterized Amplified Region (SCAR) markers. *African Journal of Biotechnology*. 18 (31): 1044–1053.
- Setiawan, K., Hadi, M. S., Kamal, M., dan Ardian. 2021. Variasi genotipe dan fenotipe klon elit waxy dan non waxy. *Report*. Laporan Penelitian Mandiri. Fakultas Pertanian Universitas Lampung. 37 hlm.
- Singh, V., Patel, R., Kumar, S., Sahu, M. P., dan Ahirwal, A. 2021. Plant growth regulators and their use in plant growth and development. *Agriculture dan Environment*. 2 (4): 26–28.
- Sugiyarto, L., dan Kuswandi, P. C. 2014. Pengaruh 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Aminopurin (BAP) terhadap pertumbuhan kalus daun binahong (*Anredera cordifolia* L.) serta analisis kandungan flavonoid total. *Penelitian Saintek*. 19 (1): 23–30.

- Wulansari, A., Purwito, A., Husni, A., dan Sudarmonowati, E. 2015. Kemampuan regenerasi kalus embriogenik asal nuselus Jeruk Siam serta variasi fenotipe tunas regeneran. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon.* 1 (1): 97–104.
- Yelli, F., Ardian, dan Utomo, S. D. 2022. Pengaruh BA dan NAA terhadap multiplikasi tunas ubi kayu secara *in vitro*. *Jurnal Agro.* 9 (2): 193–207.
- Yelli, F., Titin, A., Utomo, S. D., dan Pathak, A. 2023. Somatic embryogenesis in two cassava (*Manihot Esculenta* Crantz.) genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca.* 51 (1): 13039–13052.
- Zamora, L. L., Calderón, J. A. G., Trujillo, E., dan Reynoso, E. B. 2010. Optimization of ethanol production process from cassava starch by surface response. *Journal of The Mexican Chemical Society.* 54 (4): 198–203.
- Zulkarnain. 2022. *Kultur Jaringan Tanaman.* Bumiaksara. Jakarta Timur. 268 hlm.