

**TEKNOLOGI EMBRIOGENESIS SOMATIK PERBANYAKAN UBI KAYU
(*Manihot esculenta* Crantz.) VARIETAS VATI-1 MENGGUNAKAN DUA
JENIS EKSPLAN DAN MEDIA INDUKSI YANG BERBEDA**

Skripsi

Oleh

**Winda Apriyanti
2114121007**



**JURUSAN AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

TEKNOLOGI EMBRIOGENESIS SOMATIK PERBANYAKAN UBI KAYU (*Manihot esculenta* Crantz.) VARIETAS VATI-1 MENGGUNAKAN DUA JENIS EKSPLAN DAN MEDIA INDUKSI YANG BERBEDA

Oleh

WINDA APRIYANTI

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi kurangnya ketersediaan bibit unggul tanaman ubi kayu ialah dengan memperbanyak tanaman melalui kultur jaringan. Perbanyak tanaman dengan kultur jaringan dapat dilakukan salah satunya melalui embriogenesis somatik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis eksplan dan media induksi kalus terhadap pembentukan kalus primer dan embrio somatik Ubi Kayu Varietas Vati-1. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial 2 x 4 yang terdiri dari 7 ulangan dengan 8 kombinasi perlakuan. Faktor pertama yaitu jenis eksplan (E) meliputi eksplan daun pucuk (E1) dan eksplan *internode* (E2). Faktor kedua yaitu media induksi kalus (M) meliputi MS + picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l (M1), MS + picloram 8 mg/l + NAA 0 mg/l (M2), MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 6 mg/l (M3), dan MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 0 mg/l (M3). Data yang diperoleh diuji homogenitas ragamnya dengan Uji Bartlett, kemudian diolah menggunakan anova pada taraf 5%, dan dilanjutkan dengan pemisahan nilai tengah dengan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) pada taraf 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan *internode* menghasilkan waktu muncul kalus tercepat yaitu 10,65 hari setelah induksi (hsi). Semua jenis perlakuan menghasilkan persentase eksplan berkalus mencapai 100%. Perlakuan eksplan daun pucuk yang diinduksi pada media MS + picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l menghasilkan persentase kalus berembrio tertinggi sebesar 34,92%. Jumlah embrio somatik terbanyak dihasilkan oleh perlakuan daun pucuk yang diinduksi pada media MS + picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l dengan jumlah embrio somatik sebanyak 299 embrio dan rata-rata embrio per kalus sebesar $15,74 \pm 8,10$ embrio.

Kata Kunci: Eksplan, Embriogenesis Somatik, Media Induksi, Ubi Kayu, dan Vati-1

ABSTRACT

SOMATIC EMBRYOGENESIS TECHNOLOGY FOR PROPAGATION OF CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz.) VARIETY VATI-1 USING TWO DIFFERENT TYPES OF EXPLANT AND INDUCTION MEDIA

By

WINDA APRIYANTI

One of the efforts that can be done to overcome the shortage of superior cassava seeds is to propagate plants through tissue culture. One way to propagate plants through tissue culture is through somatic embryogenesis. This study aims to determine the effect of explant types and callus induction media on the formation of primary callus and somatic embryos of Cassava Variety Vati-1. This study used a 2 x 4 factorial Completely Randomized Design (CRD) consisting of 7 replications with 8 treatment combinations. The first factor is the type of explant (E) including shoot leaf explant (E1) and internode explant (E2). The second factor is the callus induction media (M) including MS + picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l (M1), MS + picloram 8 mg/l + NAA 0 mg/l (M2), MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 6 mg/l (M3), and MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 0 mg/l (M4). The data obtained were tested for homogeneity of variance using the Bartlett test, then processed using Analysis of Variance at the 5% level, and continued with the separation of the middle values using the Honestly Significant Difference (HSD) test at the 5% level. The results showed that internode explant produced the fastest callus emergence time at 10.65 days after induction (dai). All treatments produced percentage of callus forming at 100%. The treatment of shoot leaf explant induced in MS + 8 mg/l picloram + 6 mg/l NAA media produced the highest percentage callus with embryo at 34.92%. The largest number of somatic embryos was produced by the treatment of shoot leaf induced in MS + 8 mg/l picloram + 6 mg/l NAA media with a total of 299 somatic embryos and an average of 15,74 embryos per callus.

Keywords: *Cassava, Explants, Induction Media, Somatic Embryogenesis, and Vati-1*

**TEKNOLOGI EMBRIOGENESIS SOMATIK PERBANYAKAN UBI KAYU
(*Manihot esculenta* Crantz.) VARIETAS VATI-1 MENGGUNAKAN DUA
JENIS EKSPAN DAN MEDIA INDUKSI YANG BERBEDA**

Oleh

Winda Apriyanti

Skripsi

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

Pada

**Jurusan Agroteknologi
Fakultas Pertanian, Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

Judul Skripsi : **Teknologi Embriogenesis Somatik
Perbanyak Ubi Kayu (*Manihot esculenta
Crantz.*) Varietas Vati-1 Menggunakan Dua
Jenis Eksplan dan Media Induksi yang Berbeda**

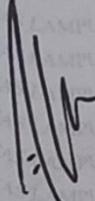
Nama Mahasiswa : **Winda Apriyanti**

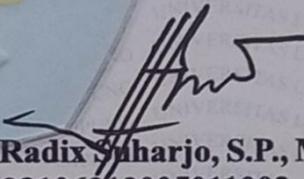
Nomor Pokok Mahasiswa : **2114121007**

Jurusan : **Agroteknologi**

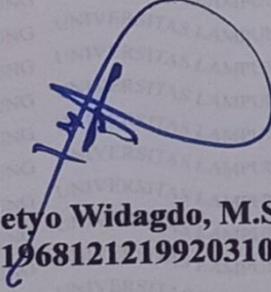
Fakultas : **Pertanian**




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


Prof. Radix Saharjo, S.P., M.Agr., Ph.D.
NIP 198106212005011003

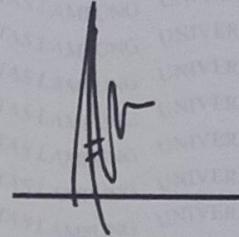
2. **Ketua Jurusan Agroteknologi,**


Ir. Setyo Widagdo, M.Si.
NIP 196812121992031004

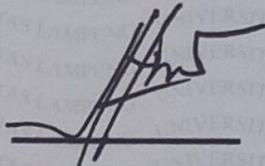
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

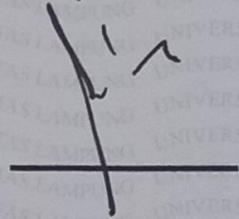
Ketua : Fitri Yelli, S.P., M.Si., Ph.D.



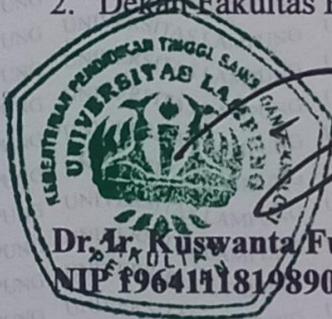
Sekretaris : Prof. Radix Suharjo, S.P., M.Agr., Ph.D.



Penguji
Bukan Pembimbing : Ir. Ardian, M.Agr.



2. Dekan Fakultas Pertanian



Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P.
NIP 196411181989021002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 24 Juni 2025

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa skripsi saya berjudul “Teknologi Embriogenesis Somatik Perbanyak Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) Varietas Vati-1 Menggunakan Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi yang Berbeda” merupakan hasil karya sendiri dan bukan hasil karya orang lain. Semua hasil yang tertuang dalam 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 dengan ketentuan akademik yang berlaku.

Bandar Lampung, 24 Juni 2025

Penulis,



Winda Apriyanti

NPM 2114121007

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di Tanjung Ratu Ilir, Kecamatan Way Pengubuan, Kabupaten Lampung Tengah pada 14 April 2003. Penulis merupakan anak ketiga dari pasangan Bapak Suwandi dan Ibu Suparmi. Penulis memiliki dua kakak laki-laki bernama Erik Wahyudi dan Rudi Hermawan. Penulis memulai Pendidikan di SDN 3 Tanjung Ratu Ilir pada 2009, kemudian melanjutkan pendidikan di SMPN 2 Terbanggi Besar pada 2015, dan kemudian melanjutkan pendidikan di SMAN 1 Terbanggi Besar pada 2018. Pada 2021, penulis kemudian melanjutkan pendidikan ke jenjang Strata 1 di Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung melalui jalur SNMPTN.

Penulis aktif mengikuti organisasi selama perkuliahan. Penulis mengikuti kegiatan Persatuan Mahasiswa Agroteknologi (Perma AGT) sebagai Anggota Bidang Pengabdian Kepada Masyarakat pada 2023. Kemudian penulis diamanahkan menjadi Bendahara Umum Perma AGT pada masa periode 2024. Penulis melaksanakan kegiatan Praktik Pengenalan Pertanian (P3) di Dusun 6 Tanjung Mulya, Desa Tanjung Ratu Ilir, Kecamatan Way Pengubuan, Kabupaten Lampung Tengah dan di Dusun 4 Marga Mulya, Desa Terbanggi Besar, Kecamatan Terbanggi Besar, Kabupaten Lampung Tengah pada 2022. Penulis melaksanakan kegiatan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Bujung Tenuk, Kecamatan Menggala, Kabupaten Tulang Bawang pada Januari-Februari 2024. Pada Juli-Agustus 2024, penulis juga melaksanakan Praktik Umum (PU) di Badan Perakitan dan Modernisasi Pertanian Tanaman Rempah, Obat, dan Aromatik (BRMP TROA) di Jalan Tentara Pelajar No. 3, Kecamatan Bogor Barat, Kota Bogor, Jawa Barat.

**Karya sederhana ini aku persembahkan untuk kedua orang tua ku tercinta
Bapak Suwandi dan Ibu Suparmi serta kakak-kakak ku tersayang Erik
Wahyudi dan Rudi Hermawan sebagai tanda hormat dan bakti ku kepada
keluarga yang senantiasa memberikan kasih sayang, doa, dukungan, dan
motivasi**

Almamater Tercinta Universitas Lampung

**“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan
kemampuannya”**

(QS. Al-Baqarah: 286)

***“It’s very easy to give up, but in the end you’ll gain nothing. It’s hard to hold
on, but in the end you’ll gain a lot”***

(Huang Renjun)

“If you never try, you’ll never know”

(Winda Apriyanti)

SANWACANA

Bissmillahirrohmannirohim atas izin Allah dan ilmu-Nya yaitu Al-Quran yang memberikan rahmat serta hidayah untuk penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “Teknologi Embriogenesis Somatik Perbanyak Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) Varietas Vati-1 Menggunakan Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi yang Berbeda”. Pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi ini dapat diselesaikan tidak terlepas dari bantuan dan dukungan berbagai pihak. Pada kesempatan ini dengan kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Bapak Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P., selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung;
- (2) Bapak Ir. Setyo Widagdo, M.Si., selaku Ketua Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung;
- (3) Ibu Fitri Yelli, S.P., M.P., Ph.D., selaku Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu untuk membimbing penulis, memberikan kasih sayang, ilmu berharga, masukan, saran, nasihat, dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi;
- (4) Bapak Prof. Radix Suharjo, S.P., M.Agr., Ph.D., selaku Pembimbing Kedua yang telah meluangkan waktu untuk membimbing penulis, memberikan masukan, saran, nasihat, dan motivasi kepada penulis selama pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi;
- (5) Bapak Ir. Ardian, M.Agr., selaku Penguji yang telah memberikan masukan, saran, arahan, dan nasihat kepada penulis selama pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi;
- (6) Ibu Dr. Ir. Nyimas Sa'diyah, M.P., selaku Dosen Pembimbing Akademik penulis sebelum purnabakti dan Bapak Dr. Ir. Agus Karyanto, M.Sc. sebagai

- Dosen Pembimbing Akademik pengganti yang telah memberikan arahan, saran, nasihat, dan motivasi kepada penulis selama kuliah;
- (7) Keluarga tercinta: Bapak Suwandi, Ibu Suparmi, Mas Erik Wahyudi, dan Mas Rudi Hermawan, terima kasih atas doa, kasih sayang, dukungan, motivasi, dan materiil yang telah diberikan kepada penulis;
 - (8) Sahabat penelitian: Erina Nurhidayah dan Dini Nur Safitri yang telah memberikan bantuan, dukungan, semangat, dan motivasi kepada penulis selama pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi;
 - (9) Sahabat tersayang: Anisa Bela Amanda, Clara Firda Amanda, Jamara Dinda Okshelga, dan Intan Apriyani yang telah kebersamai penulis dalam suka maupun duka, serta memberikan dukungan dan motivasi selama proses menuntut ilmu;
 - (10) *Cassava 2020*: Bang Sakti, Mba Annilen, Mba Indah, dan Mba Sabrina yang telah meluangkan waktu untuk membimbing penulis, memberikan saran, dukungan, dan motivasi kepada penulis selama pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi;
 - (11) Keluarga Besar Laboratorium Kultur Jaringan: Ibu Hayane Adeline Warganegara, S.P., M.Si., Galuh, April, Sela, Lia, Ziya, Annisa, Lutfi, Seri, Bang Tedy, Bang Mifta, Mba Fiska, Mba Lilis, Mba Kalvina, dan Mba Retna yang telah memberikan semangat, dukungan, dan bantuan selama proses magang dan penelitian;
 - (12) Teman-teman Agroteknologi 2021 yang telah memberikan dukungan dan motivasi selama proses perkuliahan.

Semoga Allah SWT memberikan balasan terbaik atas segala bantuan yang telah diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi berbagai pihak.

Bandar Lampung, 24 Juni 2025

Winda Apriyanti

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.5 Kerangka Penelitian.....	6
1.6 Hipotesis	8
II. TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Tanaman Ubi Kayu (<i>Manihot esculenta</i> Crantz.).....	10
2.2 Varietas Vati-1.....	11
2.3 Teknik Perbanyakkan Tanaman Ubi Kayu	11
2.4 Embriogenesis Somatik	14
2.5 Zat Pengatur Tumbuh	17
III. BAHAN DAN METODE	20
3.1 Waktu dan Tempat	20
3.2 Alat dan Bahan	20
3.3 Metode Penelitian.....	21
3.4 Sterilisasi Alat.....	21
3.5 Persiapan Eksplan.....	23
3.6 Pembuatan Media	23
3.6.1 Media Pre-Kondisi.....	23
3.6.2 Media Induksi Kalus Primer (MIKP)	25

3.6.3	Media Pematangan Embrio (MPE).....	25
3.6.4	Media Regenerasi Tunas (MR).....	25
3.7	Pelaksanaan Penelitian	26
3.7.1	Penanaman Eksplan pada Media Pre-Kondisi.....	26
3.7.2	Induksi Kalus Primer dan Embrio Somatik.....	27
3.7.3	Pematangan Embrio.....	28
3.7.4	Regenerasi Tunas	28
3.8	Variabel Pengamatan	28
3.8.1	Pengamatan Kualitatif.....	29
3.8.2	Pengamatan Kuantitatif.....	30
3.9	Analisis Data.....	31
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1	Hasil.....	33
4.1.1	Pengamatan Visual Kalus	33
4.1.2	Rekapitulasi Analisis Ragam	36
4.2	Pembahasan	41
V.	SIMPULAN DAN SARAN	48
5.1	Simpulan.....	48
5.2	Saran	48
	DAFTAR PUSTAKA.....	49
	LAMPIRAN.....	55

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Formulasi Media Murashige dan Skoog (1962).....	24
2. Formulasi Media Pematangan Embrio	26
3. Rekapitulasi Analisis Ragam Pengaruh Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi pada Pembentukan Kalus Primer dan Embrio Somatik	37
4. Pengaruh Media Induksi terhadap Bobot Kalus Primer pada 3 msi.....	39
5. Pengaruh Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Persentase Kalus Berembrio	40
6. Pengaruh Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Jumlah Embrio.....	40
7. Pengaruh Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Persentase Eksplan Berkalus.....	41
8. Data Pengamatan Pengaruh Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Waktu Muncul Kalus	56
9. Uji Homogenitas Pengaruh Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Waktu Muncul Kalus	57
10. Analisis Ragam Pengaruh Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Waktu Muncul Kalus.....	57
11. Data Transformasi ($\sqrt{}$) Pengaruh Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Bobot Kalus Primer.....	58
12. Uji Homogenitas Pengaruh Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Bobot Kalus Primer.....	59
13. Analisis Ragam Pengaruh Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Bobot Kalus Primer.....	59
14. Data Pengamatan Pengaruh Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Persentase Kalus Berembrio.....	60
15. Uji Homogenitas Pengaruh Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Persentase Eksplan Berkalus.....	61

16. Analisis Ragam Pengaruh Dua Jenis Eksplan dan Media Induksi terhadap Persentase Eksplan Berkalus.....	61
---	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bagan kerangka pemikiran.....	8
2. Tahap perkembangan embrio somatik (Purnamaningsih, 2002).....	15
3. Fase perkembangan embrio somatik (Greer, 2008)	29
4. Visualisasi kalus primer 1 msi pada tanaman Ubi Kayu Varietas Vati-1	34
5. Visualisasi kalus primer 3 msi pada tanaman Ubi Kayu Varietas Vati-1	35
6. Visualisasi kalus embriogenik dan non-embriogenik Varietas Vati- 1 pada 3 msi: (a) kalus embriogenik pada eksplan daun pucuk dan (b) kalus non-embriogenik pada eksplan <i>internode</i>	35
7. Fase perkembangan embrio somatik: (a) fase globular, (b) fase hati, (c) fase torpedo, dan (d) fase kotiledon.....	36
8. Visualisasi <i>green cotyledon</i> pada media regenerasi tunas.....	36
9. Grafik pengaruh jenis eksplan terhadap waktu muncul kalus primer	38
10. Pengaruh jenis eksplan terhadap bobot kalus primer 3 msi	38

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) merupakan salah satu jenis tanaman pangan yang dibudidayakan di Indonesia setelah padi dan jagung untuk memenuhi kebutuhan karbohidrat. Selain untuk memenuhi kebutuhan karbohidrat, tanaman ubi kayu juga dimanfaatkan untuk pakan ternak dan bahan baku industri. Ubi kayu juga didiversifikasi menjadi bahan pangan alternatif guna menopang ketahanan pangan di Indonesia. Pengembangan ubi kayu di Indonesia dilakukan dalam upaya untuk menyediakan bahan pangan yang mengandung karbohidrat selain beras, penganekaragaman konsumsi pangan lokal, pengembangan industri pengolahan hasil, agroindustri, dan peningkatan sumber devisa negara melalui ekspor (Aristin *et al.*, 2022). Oleh sebab itu, sangat penting dilakukan upaya peningkatan ubi kayu untuk mendukung langkah-langkah tersebut.

Provinsi Lampung merupakan salah satu penghasil ubi kayu terbesar di Indonesia. Menurut Kementerian Pertanian (2024), produksi ubi kayu di Lampung pada 2019, 2020, 2021, 2022, dan 2023 berturut-turut adalah 5.438.850 ton, 5.820.831 ton, 5.643.185 ton, 5.952.537 ton, dan 7.227.672 ton. Produksi ubi kayu tersebut terus mengalami peningkatan dari tahun ke tahun. Hal tersebut juga sejalan dengan luas panen tanaman ubi kayu yang mengalami fluktuasi dan cenderung meningkat pada 2023. Luas panen ubi kayu dari tahun 2019-2023 berturut-turut adalah 200.025 ha, 230.451 ha, 222.746 ha, 208.192 ha, dan 262.270 ha.

Terdapat banyak jenis klon ubi kayu yang dibudidayakan di Provinsi Lampung. Salah satu klon ubi kayu yang dibudidayakan di Lampung adalah Varietas Vati-1. Berdasarkan data yang dikeluarkan oleh Balitkabi (2023), Varietas Vati-1 memiliki keunggulan yaitu produktivitas sebesar 37,46 ton/ha dengan potensi hasil mencapai 46,9 ton/ha. Selain itu, Varietas Vati-1 memiliki kadar pati yang cukup tinggi yaitu 21,9%, rendemen pati 26,7%, kadar gula total yaitu 43%, dan kadar bahan kering umbi 48,5%. Keunggulan lain dari Varietas Vati-1 yaitu berpotensi menjadi varietas genjah karena bobot umbi mencapai 4-5 kg/tanaman ketika dipanen pada umur 7 bulan. Karakteristik Varietas Vati-1 ini adalah agak tahan hama tungau merah, memiliki daun berwarna hijau gelap, dan umbi berwarna putih (Yanto, 2024). Keunggulan-keunggulan tersebut membuat Varietas Vati-1 menjadi salah satu varietas ubi kayu unggul di Lampung.

Produksi ubi kayu di Provinsi Lampung dapat terus ditingkatkan dengan cara perluasan areal tanam sehingga luas panen akan meningkat. Namun, terdapat kendala dari upaya tersebut yaitu kurangnya ketersediaan bibit unggul dalam jumlah yang besar dan dalam waktu yang singkat. Apabila menggunakan bibit unggul maka tanaman dapat tumbuh seragam karena memiliki kejelasan klon, sehingga produksi ubi kayu akan terus mengalami peningkatan. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan cara perbanyak bibit ubi kayu menggunakan teknologi kultur jaringan. Menurut Yuliarti (2024), kultur jaringan memiliki beberapa keunggulan diantaranya bibit dapat diproduksi dalam jumlah yang banyak dengan waktu yang cepat, bibit yang diproduksi seragam, dan bebas dari penyakit karena berasal dari kultur steril.

Selama ini petani masih membudidayakan tanaman ubi kayu secara konvensional yaitu dengan setek batang. Namun, apabila digunakan dalam skala yang luas maka ketersediaan bibit unggul kurang mencukupi dikarenakan bahan tanam yang terbatas. Selain itu, bibit yang diperbanyak secara konvensional mudah tertular penyakit yang berasal dari tanaman induk, membutuhkan waktu yang lama untuk memperoleh bibit, dan tidak dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Masalah tersebut dapat diatasi dengan menggunakan teknologi kultur jaringan.

Teknologi kultur jaringan merupakan salah satu perbanyakan tanaman secara *in vitro* yang dapat menghasilkan bibit berkualitas tinggi. Pemanfaatan teknologi kultur jaringan dalam perbanyakan ubi kayu juga dapat menggantikan setek batang ubi kayu yang biasanya digunakan oleh petani dalam proses budidaya ubi kayu. Menurut Ogero *et al.* (2012), teknologi kultur jaringan memiliki tingkat kesuburan yang tinggi dan dapat menghasilkan propagul dalam jumlah banyak mencapai ribuan yang tidak dapat diperoleh dari teknik budidaya secara konvensional. Oleh karena itu, teknologi kultur jaringan dapat digunakan secara luas untuk memperbanyak ubi kayu dengan lebih cepat dan kebutuhan bibit unggul akan tercukupi.

Perbanyakan tanaman secara *in vitro* dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu melalui *axillary branching*, organogenesis, dan embriogenesis somatik. Menurut Lestari (2012), perbanyakan kultur jaringan melalui embriogenesis somatik mampu menghasilkan lebih banyak bibit dibandingkan dengan organogenesis. Hal tersebut dikarenakan, bibit yang dihasilkan berasal dari satu sel somatik serta dapat menghasilkan bibit dengan sifat perakaran sama dengan perbanyakan secara generatif. Bibit embrio somatik yang dihasilkan diperoleh dari induksi eksplan dengan hormon untuk menghasilkan kalus embriogenik. Menurut Indrianto dan Rusdianto (2012), kalus embriogenik tersebut memiliki ciri-ciri bertekstur remah dan berwarna putih bening atau putih kekuningan.

Induksi eksplan akan menghasilkan kalus embrio somatik. Terbentuknya kalus embrio somatik tersebut dipengaruhi oleh jenis eksplan, komposisi media dan genotipe tanaman. Media perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik harus mengandung zat pengatur tumbuh yang dapat menginduksi terbentuknya embrio somatik. Zat pengatur tumbuh yang berperan dalam pembentukan kalus adalah zat pengatur tumbuh dari golongan auksin salah satunya adalah picloram, 2,4-D, dan NAA. Picloram dan 2,4-D dalam konsentrasi yang tepat dapat menginduksi terbentuknya kalus. Berdasarkan penelitian Wardani (2020) yang menyatakan bahwa pemberian auksin dengan konsentrasi 1,0 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BAP dan 2,0 mg/l picloram + 1,0 mg/l merupakan konsentrasi terbaik dalam

pembentukan kalus tanaman nilam. Selain picloram dan 2,4-D, NAA juga berperan dalam pembentukan kalus pada eksplan yang diinduksi. *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) berperan dalam merangsang pembelahan sel dan sintesis protein, sehingga akan memacu pertumbuhan kalus (Hrazdina, 1992). Penggunaan 7,5 mg/l dan 10,0 mg/l picloram serta 6 mg/l NAA dilaporkan mampu menginduksi kalus eksplan Ubi Kayu Klon BW-1 yaitu $88,89 \pm 6,4\%$ dan Klon UJ-3 yaitu $96,30 \pm 3,70\%$ (Yelli *et al.*, 2023). Hal serupa dilaporkan oleh Priadi dan Sudarmonowati (2007) dalam penelitiannya yang menyatakan bahwa penggunaan Media Gresshoff dan Doy (GD) atau Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah dengan picloram 10 mg/l, NAA 6 mg/l, sukrosa 4%, dan CuSO_4 menghasilkan eksplan berkalus pada setiap genotipe yang sudah diinkubasi selama 4 minggu.

Faktor lain yang mempengaruhi terbentuknya kalus adalah jenis eksplan. Sumber eksplan yang digunakan umumnya bagian tanaman yang masih muda. Hal tersebut dikarenakan bagian tanaman yang masih muda merupakan jaringan meristematik yang masih aktif membelah, sehingga akan mempengaruhi proses terbentuknya kalus. Basri (2016) menyatakan bahwa jaringan tanaman yang masih muda akan lebih mudah tumbuh menjadi kalus dibandingkan dengan jaringan tanaman yang sudah tua. Hal tersebut juga disebabkan oleh sel-sel yang masih aktif membelah pada jaringan muda dengan dinding sel yang masih sederhana sehingga lebih mudah untuk dimodifikasi. Pada penelitian ini digunakan dua jenis eksplan yaitu daun pucuk dan *internode* yang akan diinduksi menjadi kalus. Kedua jenis eksplan tersebut tentunya akan memberikan hasil yang berbeda. Menurut Schadel *et al.* (2010), perbedaan struktur morfologi dan tahapan kematangan eksplan akan memberikan respon yang berbeda terhadap embriogenesis somatik.

Induksi kalus primer yang dilakukan pada penelitian ini berasal dari eksplan daun pucuk dan *internode* tanaman Ubi Kayu Varietas Vati-1 dengan penambahan beberapa konsentrasi zat pengatur tumbuh yaitu picloram, 2,4-D, dan dengan atau tanpa NAA. Kalus yang terbentuk akan menjadi embrio somatik yang akan

berkembang menjadi bahan tanam sehingga ketersediaan bibit unggul tanaman ubi kayu pada skala industri akan tercukupi.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- (1) Bagaimana pengaruh perbedaan 2 jenis eksplan terhadap pembentukan kalus primer dan embrio somatik Ubi Kayu Varietas Vati-1 secara *in vitro*?
- (2) Bagaimana pengaruh media induksi kalus terhadap pembentukan kalus primer dan embrio somatik Ubi Kayu Varietas Vati-1 secara *in vitro*?
- (3) Apakah terdapat interaksi antara jenis eksplan dan media induksi terhadap pembentukan kalus primer dan embrio somatik Ubi Kayu Varietas Vati-1 secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- (1) Mengetahui pengaruh perbedaan 2 jenis eksplan terhadap pembentukan kalus primer dan embrio somatik Ubi Kayu Varietas Vati-1 secara *in vitro*;
- (2) Mengetahui pengaruh media induksi terhadap pembentukan kalus primer dan embrio somatik Ubi Kayu Varietas Vati-1 secara *in vitro*;
- (3) Mengetahui interaksi antara jenis eksplan dan media induksi terhadap pembentukan kalus primer dan embrio somatik Ubi Kayu Varietas Vati-1 secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu menghasilkan protokol embriogenesis somatik pada Varietas Vati-1 untuk mencukupi ketersediaan bibit unggul ubi kayu pada industri pangan.

1.5 Kerangka Pemikiran

Ubi kayu merupakan salah satu tanaman pangan penting yang memiliki banyak manfaat terutama sebagai bahan makanan karena mengandung sumber karbohidrat yang cukup tinggi. Hal tersebut menyebabkan kebutuhan ubi kayu terus mengalami peningkatan sehingga upaya peningkatan produksi ubi kayu terus dilakukan. Hal tersebut dapat dicapai dengan cara memperluas areal tanam sehingga akan meningkatkan luas panen tanaman ubi kayu. Dengan demikian, produksi ubi kayu akan meningkat.

Perluasan areal tanam menyebabkan kebutuhan bibit unggul ubi kayu meningkat, sehingga diperlukan bibit ubi kayu unggul dalam jumlah yang banyak dan diperoleh dalam waktu singkat. Namun, apabila bibit diperbanyak secara konvensional maka akan membutuhkan waktu yang lama untuk memperoleh bibit dan bibit tidak dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Selain itu, bibit ubi kayu yang diperbanyak secara konvensional juga tidak memiliki kejelasan klon, karena pada satu hamparan lahan biasanya ditanam beberapa jenis varietas ubi kayu. Hal tersebut berpotensi menyebabkan penurunan produksi dikarenakan varietas ubi kayu memiliki karakteristik dan umur panen yang berbeda-beda, sehingga tidak memenuhi kriteria panen apabila dipanen secara bersamaan. Untuk mengatasi hal tersebut maka dapat dilakukan perbanyakan bibit ubi kayu dengan menggunakan teknik kultur jaringan. Menurut Hapsoro dan Yusnita (2018), perbanyakan bibit dengan teknik kultur jaringan memiliki beberapa keuntungan yaitu dapat menghasilkan tanaman *true-to-type* dengan waktu yang singkat dan jumlah yang besar, dapat dilakukan setiap musim, bibit yang dihasilkan lebih sehat, dan mutu bibit terjamin.

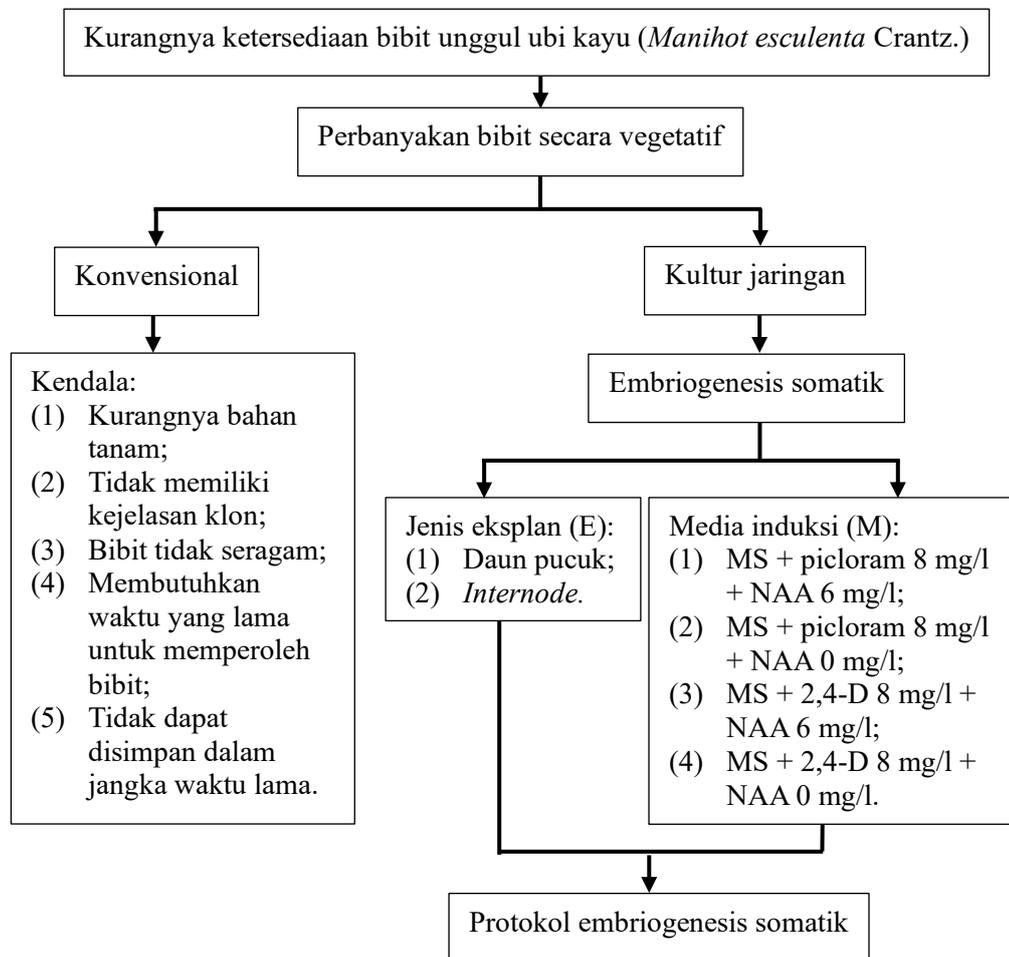
Perbanyakan bibit ubi kayu dengan teknik kultur jaringan dapat dilakukan dengan berbagai metode, salah satunya adalah melalui embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik akan menghasilkan propagul dalam jumlah yang banyak dan waktu yang singkat (Purnamaningsih, 2002). Propagul tersebut yang akan dikembangkan hingga menjadi bibit yang siap untuk ditanam di lapang. Untuk

memperoleh propagul tersebut dibutuhkan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan untuk menginduksi eksplan agar menjadi kalus. Kalus tersebut nantinya akan tumbuh menjadi kalus embriogenik yang berpotensi untuk berkembang menjadi tanaman.

Terbentuknya kalus embrio somatik dipengaruhi oleh jenis eksplan, komposisi media dan genotipe tanaman. Hal tersebut berarti setiap genotipe tanaman akan memberikan respon yang berbeda-beda terhadap pemberian ZPT, sehingga hal tersebut juga akan mempengaruhi pembentukan kalus. Menurut Syoumbua *et al.* (2019), penggunaan eksplan *Immature Leaf Lobes* (ILL) menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan eksplan *internode* pada berbagai kultivar ubi kayu di Afrika. Selain itu, penggunaan ZPT seperti picloram dan 2,4-D terbukti mampu menginduksi eksplan untuk menjadi kalus apabila konsentrasinya sesuai. Hasil penelitian Nugroho (2017) menunjukkan bahwa jumlah dan persentase eksplan membentuk kalus tertinggi, waktu muncul kalus tercepat, pertumbuhan kalus tertinggi, dan diameter kalus tertinggi pada induksi eksplan daun muda dan tunas pucuk yaitu pada komposisi media MS + 20 g/l sukrosa + 8 mg/l 2,4-D dan MS + 20 g/l sukrosa + 10 mg/l NAA. Hasil penelitian Isah *et al.* (2018) menunjukkan bahwa media dengan konsentrasi 2,4-D 4 mg/l dan picloram 7 mg/l menghasilkan frekuensi induksi kalus tertinggi yaitu 72,21% pada ZPT 2,4-D dan 73,11% pada ZPT picloram pada tanaman ubi kayu. Menurut Annilen (2024), picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l merupakan perlakuan terbaik dalam pembentukan embrio somatik dengan persentase eksplan berembrio sebesar $63,9 \pm 0,78$ dengan rerata embrio per kalus sebesar $12,87 \pm 0,18$ dan jumlah total embrio sebanyak 296 embrio pada tanaman Ubi Kayu Varietas Vati-1.

Tanaman jarak pagar yang diinduksi pada media dengan konsentrasi NAA 0 ppm memberikan hasil waktu muncul kalus lebih cepat yaitu 3,9 hari setelah tanam (hst) dibandingkan dengan NAA 1 ppm yaitu 14,5 hst dalam menginduksi kalus (Widyawati, 2010). Pada penelitian ini digunakan media MS yang dikombinasikan dengan ZPT yaitu picloram dan 2,4-D untuk mengetahui pengaruhnya terhadap induksi kalus primer dan embrio somatik Ubi Kayu

Varietas Vati-1. Kombinasi komposisi media tersebut digunakan untuk mengetahui respon pembentukan kalus terhadap dua jenis eksplan yang berbeda. Sehingga akan diperoleh prosedur yang lebih efisien untuk menginduksi kalus embriogenik dan memperoleh planlet yang mencukupi kebutuhan bibit unggul ubi kayu. Kerangka pemikiran disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Bagan kerangka pemikiran.

1.6 Hipotesis

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

- (1) Eksplan daun pucuk merupakan eksplan terbaik dalam pembentukan kalus primer dan embrio somatik Ubi Kayu Varietas Vati-1 secara *in vitro*;

- (2) Komposisi media MS + picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l merupakan media induksi terbaik terhadap pembentukan kalus primer dan embrio somatik Ubi Kayu Varietas Vati-1 secara *in vitro*;
- (3) Terdapat interaksi antara jenis eksplan dan media induksi kalus terhadap pembentukan kalus primer dan embrio somatik Ubi Kayu Varietas Vati-1 secara *in vitro*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.)

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) merupakan salah satu tanaman pangan yang berasal dari Brazil, kemudian menyebar ke Asia Tenggara termasuk Indonesia. Terdapat banyak sekali nama lain dari ubi kayu yang tersebar di beberapa daerah di Indonesia. Nama daerah dari ubi kayu adalah kasapen, sampeu, kowi dangeur, pohon, badih, ketela bodin, tela jendral, dan tela kaspo. Tanaman ubi kayu berasal dari kelas *Dicotyledoneae* dan subkelas *Arhichlamydeae*. Tanaman ini juga masuk ke dalam ordo *Euphorbiales*, famili *Euphorbiaceae*, genus *Manihot*, dan memiliki nama spesies *Manihot esculenta* Crantz. (Rahmat, 2020).

Tanaman ubi kayu memiliki karakteristik yaitu tingginya mencapai 1-4 meter, berbatang bulat dan bergerigi yang berasal dari bekas pangkal tangkai daun, memiliki tangkai daun yang memanjang, bentuk daunnya menjari, dan tiap tangkai daun memiliki 3-8 lembar daun. Tangkai daun tanaman ubi kayu berbeda-beda tergantung dari klonnya, mulai dari berwarna kuning, hijau atau merah. Tanaman ubi kayu dapat hidup pada daerah dengan suhu rata-rata 25-28°C dengan curah hujan 750-1.000 mm/tahun dan dengan ketinggian 0-1.500 mdpl (Rahmat, 2020). Tanaman ubi kayu dapat tumbuh pada beberapa jenis tanah di antaranya adalah tanah alluvial, latosol, podsolik merah kuning, mediteran, grumusol dan andosol. Tanah yang ideal untuk media tumbuh ubi kayu adalah tanah yang memiliki pH 5,80. Namun, tanaman ini dapat tumbuh dengan baik pada pH 4,50-8,00 (Nugraha *et al.*, 2015). Tanaman ubi kayu sebagian besar ditanam di daerah Provinsi Lampung yang merupakan sentra produksi ubi kayu di Indonesia. Ubi

kayu di Provinsi Lampung dibudidayakan pada tanah ultisol yang memiliki pH rendah, Al-dd tinggi, dan kandungan hara yang sedikit (Sugiyarto *et al.*, 2022).

2.2 Varietas Vati-1

Lampung merupakan sentra utama produksi ubi kayu di Indonesia. Salah satu varietas ubi kayu yang dibudidayakan di Lampung adalah Varietas Vati-1. Varietas Vati-1 merupakan hasil persilangan dari tetua betina MLG-10098 dengan tetua jantan MLG-10025. Varietas Vati-1 dirilis oleh balitkabi pada tahun 2022.

Menurut Balitkabi (2023), Varietas Vati-1 memiliki potensi hasil 25,1-46,9 ton/ha dengan rata-rata 37,5 ton/ha. Varietas Vati-1 juga dapat menghasilkan kadar bahan kering umbi sebanyak 48,5%, kadar pati 21,9%, rendemen pati 26,7%, dan kadar gula total tertinggi yaitu 43,0%.

Keunggulan lain dari Varietas Vati-1 yaitu pada saat dipanen umur 7 bulan sudah memiliki bobot umbi mencapai 4-5 kg/tanaman dengan rendemen pati yang cukup tinggi. Hal tersebut menjadikan varietas ini berpotensi menjadi varietas genjah. Selain itu, Varietas Vati-1 termasuk ke dalam kategori tanaman ubi kayu yang agak tahan terhadap hama tungau merah (Balitkabi, 2023). Karakteristik dari Varietas Vati-1 adalah memiliki daun berwarna hijau gelap, umbi berwarna putih, dan tangkai daun berwarna merah.

2.3 Perbanyak Tanaman Ubi Kayu

Tanaman ubi kayu pada umumnya dibudidayakan dan diperbanyak dengan berbagai cara. Teknik perbanyak tersebut yaitu perbanyak secara generatif dan vegetatif. Tanaman ubi kayu yang diperbanyak secara generatif (biji) memiliki kelemahan yaitu pertumbuhannya lambat dan sering mengalami dormansi (Beyene, 2009). Selain itu, perbanyak secara generatif biasanya dilakukan oleh pemulia tanaman untuk memperoleh varietas unggul.

Perbanyakan ubi kayu secara vegetatif dapat dilakukan dengan berbagai cara, di antaranya ialah dengan setek batang dan kultur jaringan. Menurut Purwono dan Purnamawati, (2007), perbanyakan dengan setek batang dilakukan dengan cara mengambil bagian tengah batang yang tidak terlalu tua dan terlalu muda. Setek batang tersebut diperoleh dari hasil panen sebelumnya. Syarat setek ubi kayu yang siap untuk ditanam yaitu umur ubi kayu 7-12 bulan dengan diameter batang 2,3-3 cm, berkayu, lurus, dan tidak kering, panjang setek 20-25 cm yang sudah diruncingi bagian pangkal batangnya, dan kulit batang diusahakan tidak terkelupas terutama bagian bakal tunas. Tanaman ubi kayu memerlukan air di awal pertumbuhan vegetatifnya yaitu umur 4-5 bulan. Oleh sebab itu, waktu yang baik untuk menanam ubi kayu yaitu saat awal musim hujan (Rahmat, 2020). Perbanyakan tanaman ubi kayu dengan setek batang memiliki kelemahan yaitu *bulky* dan sulit disimpan dalam jangka waktu yang lama yang dapat menyebabkan viabilitas benihnya menurun (Utomo *et al.*, 2020), mudah menularkan penyakit dari tanaman induk, jumlah bibit terbatas, dan membutuhkan waktu yang lama untuk memperoleh bibit (Yelli *et al.*, 2023). Untuk mengatasi hal tersebut, maka dilakukan perbanyakan ubi kayu menggunakan teknik kultur jaringan.

Kultur jaringan tanaman merupakan teknik untuk mengisolasi bagian tanaman, seperti sekelompok sel atau jaringan yang kemudian dibudidayakan dalam kondisi aseptik sehingga bagian tanaman yang diisolasi tersebut akan berkembang biak dan tumbuh menjadi tanaman utuh yang memiliki sifat yang serupa dengan tanaman induknya. Teknik kultur jaringan biasa dikenal dengan istilah kultur *in vitro* dilakukan dalam kondisi aseptik di dalam sebuah botol transparan (Harahap *et al.*, 2019). Kondisi lingkungan di dalam botol tersebut harus aseptik untuk menghindari kontaminasi mikroorganisme. Botol yang digunakan untuk kultur *in vitro* tersebut sudah berisi media yang mengandung nutrisi lengkap yang dibutuhkan oleh tanaman untuk tumbuh dan berkembang.

Teknik kultur jaringan memiliki prinsip dasar kultur jaringan. Prinsip kultur jaringan tersebut merupakan teori sel yang dikemukakan pada 1838 oleh Schwann dan Schleiden yang menyatakan bahwa setiap sel memiliki kemampuan

totipotensi sel. Menurut Widyastuti dan Deviyanti (2018), teori totipotensi menyatakan bahwa sel memiliki kemampuan untuk tumbuh dan berkembang menjadi satu tanaman utuh apabila distimulasi dengan benar. Apabila dibudidayakan pada media yang sesuai maka sel tersebut dapat tumbuh dan berkembang serta dapat beregenerasi, bereproduksi, dan berkembang biak dengan sempurna. Hal tersebut dapat terjadi karena sel bersifat autonom yang dapat melakukan metabolisme, tumbuh, dan berkembang apabila diisolasi dari jaringan induknya. Menurut Yuliarti (2024), perbanyakan tanaman dengan kultur jaringan memiliki beberapa keunggulan yaitu dapat memproduksi bibit dalam skala besar, penyediaan bibit tidak tergantung musim, hasil bibit seragam, menghasilkan bibit bebas penyakit, biaya pengangkutan bibit relatif murah dan mudah, dan proses pembibitannya bebas dari hama dan penyakit.

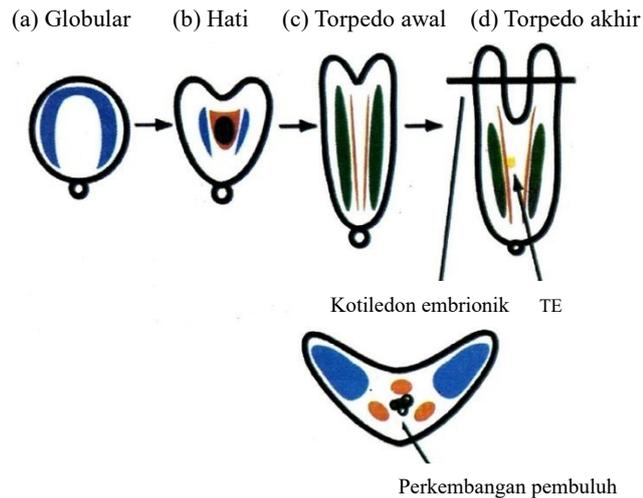
Sumber eksplan yang digunakan pada teknik kultur jaringan berasal dari bagian tanaman seperti daun, batang, akar kuncup, dan sel meristem. Eksplan merupakan bahan tanam yang digunakan pada teknik kultur jaringan. Maheswari (2021) menyatakan bahwa berdasarkan eksplan yang digunakan terdapat beberapa jenis kultur jaringan tanaman diantaranya adalah kultur anthera atau kultur pollen, kultur kloroplas, kultur meristem, kultur protoplasma, dan *somatic cross*. Kultur anthera atau kultur pollen menggunakan benang sari atau serbuk sari sebagai sumber eksplan. Kultur meristem menggunakan jaringan meristematik atau jaringan muda sebagai sumber eksplan. Kultur protoplasma menggunakan sel hidup yang sudah dihilangkan dinding selnya sebagai sumber eksplan.

Teori totipotensi sel menyatakan bahwa setiap sel dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh apabila dikulturkan pada lingkungan yang sesuai. Hal tersebut terjadi karena sel tanaman bersifat morfogenetik plastis. Eksplan-eksplan yang dikulturkan akan melewati beberapa pola regenerasi sebelum menjadi tanaman utuh. Pola regenerasi tersebut adalah *axillary branching*, organogenesis, dan embriogenesis somatik. Pola regenerasi *axillary branching* menggunakan tunas aksilar sebagai eksplan yang dikulturkan pada media yang mengandung sitokinin. Eksplan yang sudah menghasilkan tunas atau propagul kemudian

disubkultur pada media yang berbeda. Jika tunas sudah tumbuh maka tunas atau batang berbuku dipotong-potong lalu diperbanyak dan diakarkan agar menghasilkan planlet yang siap untuk diaklimatisasi. Berbeda dengan *axillary branching*, pola regenerasi organogenesis akan membentuk tunas adventif yang bukan berasal dari mata tunas melainkan organ tanaman seperti ujung akar atau potongan daun. Berdasarkan pola tersebut, sel tanaman akan berdediferensiasi menjadi kalus lalu akan tumbuh tunas-tunas adventif yang dapat ditumbuhkan perakarannya dan diaklimatisasi menjadi tanaman utuh (Yusnita, 2015). Pada penelitian ini menggunakan pola regenerasi *in vitro* melalui embriogenesis somatik.

2.4 Embriogenesis Somatik

Embriogenesis somatik merupakan suatu proses pembentukan embrio yang berasal dari sel-sel somatik. Pada proses embriogenesis somatik, sel-sel somatik akan diinduksi dan akan mengalami diferensiasi menjadi embrio somatik. Diferensiasi merupakan proses transformasi sel-sel menjadi sel-sel yang memiliki bentuk dan fungsi tertentu. Proses diferensiasi tersebut akan mengubah sel somatik menjadi embrio somatik yang memiliki bagian yang akan berkembang menjadi tajuk dan akar (Yusnita dan Hapsoro, 2022). Kondisi lingkungan yang sesuai akan membuat sel somatik terus tumbuh dan berkembang menghasilkan sel-sel embriogenik yang akan mengalami perubahan baik dari morfologi maupun biokimia lalu menjadi struktur bipolar. Sel embriogenik tersebut memiliki kemampuan untuk menjadi embrio. Tahapan perkembangan embriogenesis somatik adalah fase globular, fase hati, fase torpedo, dan planlet. Menurut Mendez-Hernandez *et al.* (2019), embriogenesis somatik merupakan suatu metode bagi tanaman untuk meregenerasi struktur bipolar yang berasal dari sel somatik. Proses diferensiasi yang terjadi akan membuat eksplan merespon rangsangan internal yang memicu induksi yang pada akhirnya akan mengubah genetik sel. Tahapan perkembangan embrio somatik disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Tahap perkembangan embrio somatik (Purnamaningsih, 2002).

Embriogenesis somatik dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu embriogenesis secara langsung dan embriogenesis somatik secara tidak langsung. Embriogenesis secara langsung melibatkan pembentukan embrio somatik dari jaringan teratur yang terdediferensiasi tanpa pembentukan kalus, sedangkan embriogenesis somatik secara tidak langsung melibatkan proses pembentukan embrio somatik dari jaringan teratur yang terdediferensiasi menjadi kalus terlebih dahulu lalu mengalami perubahan menjadi embrio somatik (Slater *et al.*, 2003). Berdasarkan proses terbentuknya embrio, embriogenesis somatik dibagi menjadi dua yaitu embriogenesis somatik primer dan embriogenesis somatik sekunder. Avivi (2011) menyatakan bahwa eksplan yang terbentuk pada tahap inisiasi akan mengalami perubahan menjadi kalus embriogenik yang disebut sebagai proses embriogenesis somatik primer. Ibrahim *et al.* (2018) menyatakan bahwa embriogenesis somatik sekunder merupakan embrio somatik sekunder adalah embrio somatik yang terbentuk dari proliferasi embrio somatik primer.

Proses embriogenesis somatik terbagi ke dalam beberapa tahapan. Taryono (2016) menyatakan bahwa terdapat 4 tahapan dalam embriogenesis somatik, yaitu induksi kalus embriogenik, perbanyakkan kalus embriogenik, pemasakan (maturasi) embrio somatik, dan perkecambahan embrio somatik. Faktor yang menentukan keberhasilan induksi kalus embriogenik adalah jenis eksplan, media induksi, ZPT, dan kondisi lingkungan selama induksi. Induksi kalus akan berhasil

apabila ditambahkan ZPT pada media. ZPT yang biasanya digunakan untuk menginduksi kalus embriogenik adalah ZPT jenis auksin seperti 2,4-D dan sitokinin. Upaya untuk menghasilkan kalus embriogenik juga ditentukan oleh besarnya wadah (botol), kelembaban, dan pertukaran udara di dalam dan di luar wadah. Induksi kalus akan menghasilkan kalus embriogenik yang kemudian akan diperbanyak.

Kalus embriogenik dapat diperbanyak pada media padat maupun media cair. Kalus embriogenik yang diperbanyak pada media cair biasanya akan tumbuh lebih cepat, namun harus dilakukan pengocokan media yang tepat agar pertumbuhan kalus tidak terhambat karena kekurangan oksigen. Embrio somatik yang sudah dihasilkan kemudian harus dimaturasi dengan cara dipindahkan ke media lain. Faktor yang mempengaruhi pemasakan embrio adalah adanya senyawa pengatur pemasakan seperti asam absisat (ABA). ABA berfungsi dalam pengendalian pemasakan embrio, menghindari perkembangan embrio abnormal, menghambat perkecambahan dini, dan meningkatkan ketahanan terhadap kekeringan.

Eksplan yang digunakan pada pola regenerasi embriogenesis somatik berbeda-beda. Pada umumnya menggunakan jaringan meristematik dikarenakan sel-selnya masih aktif membelah. Anuradha *et al.* (2015) melaporkan bahwa eksplan *immature leaf lobes (ILL)* tanaman ubi kayu India Varietas H-226 yang diinduksi pada media yang mengandung picloram 12 mg/l menghasilkan embrio somatik primer tertinggi yaitu 66,77%. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Fariroh *et al.* (2023) bahwa empat kultivar ubi kayu dari Jawa Timur (kaspro, kuning, gajah, dan gendruwo) diuji kemampuannya dalam menghasilkan kalus embriogenik menggunakan eksplan ILL yang diinduksi pada media yang mengandung picloram 33 μ M dan CuSO_4 2 μ M menghasilkan frekuensi kalus embriogenik sebesar 72% hingga 57%.

2.5 Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan senyawa organik bukan hara yang apabila digunakan dalam jumlah rendah dapat mendorong, menghambat, serta mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Widyastuti dan Tjokrokusumo, 2006). Terdapat banyak jenis zat pengatur tumbuh mulai dari yang dihasilkan secara alami oleh tumbuhan (endogen) maupun yang dihasilkan oleh manusia secara sintetis (eksogen). Adapun lima kelompok ZPT yang dikenal sebagai hormon tumbuhan yaitu auksin, sitokinin, giberelin, etilen, dan asam absisat (Jayati *et al.*, 2021). Menurut Zulkarnaen (2009), auksin berfungsi sebagai hormon untuk menstimulus pembentukan akar pada setek batang, giberelin berfungsi meningkatkan pembesaran dan perpanjangan sel, sitokinin berfungsi dalam meningkatkan pembentukan dan perkembangan daun, asam absisat berfungsi untuk menghambat pertumbuhan dan etilen merupakan zat pengatur tumbuh yang memiliki struktur sederhana berbentuk gas yang memiliki respon terhadap kelebihan air.

Penggunaan ZPT pada kultur jaringan tanaman dilakukan dengan mengkombinasikan ZPT dengan media kultur yang digunakan. Formulasi media dasar yang biasanya digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah Media MS (Murashige dan Skoog). Golongan ZPT penting yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang dibudidayakan dengan kultur jaringan adalah ZPT dari golongan auksin dan sitokinin. Menurut Widiastoety (2014), auksin seperti NAA, IAA, IBA, dan 2,4-D, memiliki peran dalam meningkatkan tekanan osmotik, memperbaiki permeabilitas sel, mengurangi tekanan dinding sel, meningkatkan plastisitas, mengembangkan dinding sel, merangsang sintesis protein, serta merangsang pemanjangan dan pembesaran sel.

ZPT golongan auksin yang digunakan untuk menginduksi terbentuknya kalus pada penelitian ini adalah picloram dan 2,4-D. Menurut Tu *et al.* (2001), picloram dan 2,4-D memiliki cara kerja yang sama yaitu dengan cara mengasamkan dinding sel sehingga dinding akan longgar dan terjadi pemanjangan sel. Picloram

dan 2,4-D pada konsentrasi rendah mampu merangsang sintesis DNA, RNA, dan protein sehingga menyebabkan diferensiasi sel yang tidak terkendali dan pada akhirnya jaringan vaskular akan mengalami kerusakan. Menurut Ahansal *et al.* (2022), picloram memiliki kemampuan menginduksi kalus embriogenik 40,86% lebih tinggi dibandingkan dengan 2,4-D.

Auksin yang dikombinasikan dengan sitokinin mampu memberikan respon yang baik pada induksi kalus eksplan kultur jaringan. Auksin berperan dalam merangsang proses dediferensiasi sel, menekan proses organogenesis, dan menjaga pertumbuhan kalus (Rohmah, 2014). ZPT golongan sitokinin, seperti kinetin, BAP, atau BA berperan dalam proses pembelahan sel. Menurut Zulkarnaen (2009), BA berfungsi merangsang pembentukan tunas, proliferasi sel, dan morfogenesis. BA bekerja dengan cara mendorong aktivitas mitosis pada jaringan meristematik yang menyebabkan terjadinya proliferasi sel yang lebih cepat terutama pada bagian apikal pucuk.

Kombinasi antara auksin dan sitokinin yang ditambahkan pada media kultur dapat menjadi faktor pemicu pertumbuhan dan perkembangan jaringan tanaman akibat peningkatan konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen di dalam sel (Lestari, 2011). Kombinasi yang tepat tersebut akan meningkatkan aktivitas pembelahan sel dalam proses morfogenesis dan organogenesis. Wahyuni (2009) menyatakan bahwa penambahan ZPT dalam beberapa konsentrasi pada media kultur juga dapat meningkatkan persentase pertumbuhan eksplan. Hal tersebut dikarenakan media kultur yang ditambahkan ZPT mengandung nutrisi lengkap seperti vitamin, unsur hara makro dan mikro, zat besi, dan sukrosa yang dapat merangsang pertumbuhan eksplan.

Kombinasi antara auksin dan sitokinin terbukti dapat memacu pembentukan kalus (Zheng *et al.*, 2003). Menurut Fauziah dan Widoretno (2015), penambahan auksin dan sitokinin pada media kultur berpengaruh terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus bawang putih. Berdasarkan hasil penelitiannya, semakin tinggi konsentrasi auksin yaitu 2,4-D dan sitokinin yaitu kinetin yang ditambahkan pada

media kultur maka berat basah dan berat kering kalus akan semakin turun. Pertumbuhan kalus terbaik diperoleh pada eksplan meristem basal yang diinduksi pada Media MS + 2,4-D 0,3 ppm + kinetin 0,5 ppm menghasilkan pertumbuhan kalus terbaik, sedangkan kalus yang dikulturkan pada Media MS + NAA 0,1 ppm + BAP 2 ppm menghasilkan pertumbuhan tunas terbaik.

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Desember 2024 sampai April 2025. Lokasi pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Ilmu Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, gelas ukur, gelas *beaker*, botol *schott*, botol kultur, kompor gas, sendok pengaduk, panci, *erlenmeyer*, *hand sprayer*, destilator, bak, kereta dorong, rak kultur, pipet tetes, *magnetic stirrer*, timbangan analitik, timbangan digital, mikro pipet, pH meter, kamera, *petridish*, mikroskop binokuler, *showcase*, *box*, pembakar bunsen, ubin, alat-alat diseksi (*scalpel*, *blade*, dan pinset), *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), dan *plastic wrapping*.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Ubi Kayu Varietas Vati-1, Media MS, picloram, 2,4-*Dichloropenoxyacetic acid* (2,4-D), *Naphthalene acetic acid* (NAA), *Benzyladenine* (BA), *Giberrellic acid* (GA), CuSO_4 4 μM , KOH 1 N, HCl 1 N, akuades, agar-agar oxioid, agar-agar gelrite, sukrosa, spirtus, kapas steril, larutan pemutih komersial (NaClO), detergen, dan sabun cuci piring. Pada penelitian ini digunakan dua jenis eksplan yaitu daun pucuk dan *internode* tanaman Ubi Kayu Varietas Vati-1. Media dasar yang digunakan adalah Media Murashige dan Skoog (MS).

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial 2 x 4. Faktor pertama adalah jenis eksplan (E) Ubi Kayu Varietas Vati-1 yang terdiri dari eksplan daun pucuk (E1) dan eksplan *internode* (E2). Faktor kedua adalah media induksi (M) yang terdiri dari MS + picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l (M1), MS + picloram 8 mg/l + NAA 0 mg/l (M2), MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 6 mg/l (M3), dan MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 0 mg/l (M4). Berdasarkan hal tersebut, diperoleh 8 kombinasi perlakuan dengan 7 ulangan. Setiap ulangan terdiri atas 3 botol kultur dan setiap botol kultur terdiri atas 3 eksplan, sehingga total terdapat 168 botol kultur dan 504 eksplan. Data yang diperoleh diuji homogenitas ragamnya dengan Uji Bartlett. Data yang diperoleh kemudian diolah menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) pada taraf 5%, kemudian dilanjutkan dengan pemisahan nilai tengah dengan Uji BNT pada taraf 5%.

Rincian faktor perlakuan yang digunakan pada masing-masing percobaan adalah sebagai berikut:

E1M1 = Eksplan daun pucuk + MS + picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l;

E1M2 = Eksplan daun pucuk + MS + picloram 8 mg/l + NAA 0 mg/l;

E1M3 = Eksplan daun pucuk + MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 6 mg/l;

E1M4 = Eksplan daun pucuk + MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 0 mg/l;

E2M1 = Eksplan *internode* + MS + picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l;

E2M2 = Eksplan *internode* + MS + picloram 8 mg/l + NAA 0 mg/l;

E2M3 = Eksplan *internode* + MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 6 mg/l;

E2M4 = Eksplan *internode* + MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 0 mg/l.

3.4 Sterilisasi Alat

Teknik kultur jaringan merupakan kultur aseptik sehingga setiap pekerjaan yang dilakukan harus dalam kondisi steril. Hal tersebut dilakukan untuk menghindari potensi kegagalan akibat kontaminasi mikroorganisme, misalnya jamur dan bakteri. Tahapan dalam sterilisasi alat yaitu mencuci botol kotor yang masih

terdapat media terkontaminasi dan mencuci botol bersih yang sudah diautoklaf. Tahap pertama adalah membersihkan botol kotor yang masih terdapat media terkontaminasi dengan cara membuang media yang sudah terkontaminasi hingga bersih kemudian botol kultur dicuci dengan larutan detergen 5 g/l. Apabila sudah bersih, botol kultur tersebut kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 30 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Setelah botol diautoklaf, botol kemudian direndam selama \pm 24 jam dengan larutan detergen 5 g/l dan ditambah dengan larutan NaClO 100 ml. Setelah direndam \pm 24 jam, botol kemudian dicuci hingga bersih.

Botol kultur yang sudah direndam dicuci dengan cara menggosok bagian dalam botol yaitu permukaan bawah dan samping botol serta leher botol dengan menggunakan serabut kawat dan jaring yang sudah dicelupkan ke dalam larutan sabun cuci piring. Botol yang sudah dicuci kemudian dibilas menggunakan air mengalir hingga bersih, kemudian direndam ke dalam air panas selama \pm 15 menit. Setelah 15 menit, botol kemudian ditiriskan dan ditutup bagian mulut botol dengan plastik berukuran 12 x 12 cm². Botol tersebut kemudian disterilkan kembali menggunakan autoklaf selama 30 menit pada suhu dan tekanan yang sama seperti sebelumnya.

Alat-alat yang digunakan dalam perbanyakan bibit menggunakan teknik kultur jaringan juga harus dalam kondisi aseptik sehingga harus melalui proses sterilisasi. Alat-alat tersebut yaitu alat diseksi (pinset dan *scalpel*), ubin, botol *schott*, dan kapas dibungkus dengan kertas kemudian dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan diikat dengan karet. Kapas dimasukkan ke dalam botol steril kemudian mulut botol ditutup dengan plastik berukuran 12 x 12 cm² kemudian diikat dengan karet. Alat-alat tersebut kemudian disterilisasi dan dimasukkan ke dalam autoklaf selama 30 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

3.5 Persiapan Eksplan

Penelitian ini menggunakan dua jenis eksplan yaitu daun pucuk dan *internode*. Untuk memperoleh eksplan tersebut perlu dilakukan persiapan eksplan agar eksplan tercukupi sesuai dengan kebutuhan. Persiapan eksplan dilakukan dengan cara perbanyak tunas tanaman dengan teknik kultur jaringan melalui buku tanaman. Perbanyak tunas tanaman tersebut dilakukan dengan cara subkultur tunas Ubi Kayu Varietas Vati-1 yang tersedia di laboratorium (*mother stock*) ke Media MS.

3.6 Pembuatan Media

Penelitian ini menggunakan komposisi media sebagai perlakuan. Media yang digunakan yaitu media pre-kondisi, media induksi kalus primer, media pematangan embrio (maturasi), dan media regenerasi tunas.

3.6.1 Media Pre-Kondisi

Media pre-kondisi yang digunakan pada penelitian ini adalah Media MS. Media ini digunakan untuk persiapan eksplan yaitu untuk menghasilkan tunas-tunas ubi kayu yang steril. Tahap pertama dalam membuat media pre-kondisi adalah dengan cara memasukkan formulasi Media MS (Tabel 1) ke dalam gelas *beaker* yang sudah ditambahkan 300 ml akuades, kemudian ditambahkan sukrosa 30 g/l. Larutan media tersebut kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah homogen, larutan kemudian ditera dengan cara menambahkan akuades hingga volume larutan menjadi 1000 ml menggunakan gelas ukur 1000 ml. Setelah ditera, larutan dimasukkan kembali ke gelas *beaker* lalu dihomogenkan kembali menggunakan *magnetic stirrer* kemudian diatur pH larutan menjadi 5,8. Apabila pH kurang dari 5,8 maka ditambah larutan KOH 1 N hingga pH larutan mencapai 5,8. Apabila pH lebih dari 5,8 maka ditambah larutan HCl 1 N hingga pH larutan mencapai 5,8. Apabila semua komposisi media sudah dicampurkan dan

pH sudah sesuai, maka ke dalam larutan tersebut ditambahkan agar-agar 7 g/l. Formulasi Media Murashige dan Skoog disajikan pada Tabel 1.

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

Larutan media yang sudah dibuat kemudian dimasak menggunakan panci dan kompor dengan api sedang hingga mendidih. Larutan media yang sudah mendidih kemudian dituang ke dalam botol steril sebanyak ± 30 ml, lalu botol ditutup kembali menggunakan plastik dan diikat menggunakan karet. Media tersebut kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

3.6.2 Media Induksi Kalus Primer (MIKP)

Media induksi kalus primer digunakan untuk induksi pembentukan kalus. Media ini terdiri atas Media MS + picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l, MS + picloram 8 mg/l + NAA 0 mg/l, MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 6 mg/l, dan MS + 2,4-D 8 mg/l + NAA 0 mg/l. Media tersebut ditambahkan CuSO_4 4 μM , sukrosa 40 g/l, dan agar-agar oxoid 8 g/l.

3.6.3 Media Pematangan Embrio (MPE)

Media pematangan embrio (maturasi) digunakan untuk menghentikan perkembangan eksplan yang terus mengalami dediferensiasi menjadi kalus. Pada fase ini, kalus primer yang sebelumnya sudah diperoleh akan membentuk embrio somatik yang sudah berkembang mencapai fase kotiledon. Media pematangan embrio yang digunakan sama seperti media yang digunakan ketika induksi kalus, namun konsentrasinya diturunkan (Tabel 2) dan ditambahkan CuSO_4 4 μM , sukrosa 40 g/l, dan agar-agar oxoid 8 g/l. Formulasi media pematangan embrio disajikan pada Tabel 2.

3.6.4 Media Regenerasi Tunas (MR)

Media regenerasi tunas digunakan untuk menginduksi pertumbuhan tunas dari embrio yang sudah terbentuk hingga menjadi kotiledon hijau (*green cotyledon*).

Komposisi media yang digunakan adalah Media MS, sukrosa 20 g/l, agar-agar gelrite 2,5 g/l, *Benzyladenine* (BA) 0,2 mg/l dan *Gibberellic acid* (GA) dengan konsentrasi 0,01 mg/l.

Tabel 2. Formulasi Media Pematangan Embrio

Jenis Eksplan	Formulasi Media
Daun pucuk	MS + picloram 2 mg/l + NAA 0,5 mg/l
	MS + picloram 2 mg/l + NAA 0 mg/l
	MS + 2,4-D 2 mg/l + NAA 0,5 mg/l
	MS + 2,4-D 2 mg/l + NAA 0 mg/l
<i>Internode</i>	MS + picloram 2 mg/l + NAA 0,5 mg/l
	MS + picloram 2 mg/l + NAA 0 mg/l
	MS + 2,4-D 2 mg/l + NAA 0,5 mg/l
	MS + 2,4-D 2 mg/l + NAA 0 mg/l

3.7 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian yang dilakukan adalah penanaman eksplan pada media pre-kondisi, induksi kalus primer, induksi embrio somatik dan pematangan embrio, serta regenerasi tunas.

3.7.1 Penanaman Eksplan pada Media Pre-Kondisi

Tunas yang akan digunakan diperoleh dari *mother stock* tanaman yang ada di laboratorium. Tunas ini dikultur sebagai sumber eksplan daun pucuk dan eksplan *internode* untuk induksi kalus. Sumber eksplan harus mencukupi kebutuhan sehingga perlu dilakukan subkultur agar jumlah eksplan tercukupi. Subkultur merupakan proses pemindahan tanaman dari media sebelumnya ke media baru. Penanaman sumber eksplan ini dilakukan di laboratorium dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC). Sebelum melakukan penanaman LAFC harus dalam kondisi aseptik sehingga harus disterilisasi dengan cara menghidupkan *blower* kemudian dibersihkan menggunakan spirtus sampai benar-benar bersih kemudian di UV selama 1-2 jam. Apabila sudah dalam kondisi aseptik, maka dilakukan

subkultur dengan cara memotong tunas ubi kayu dengan menyertakan *node* atau buku tunasnya. Tunas tersebut ditanam pada Media MS yang ada di botol dan setiap botol berisi 3 eksplan tunas. Setelah penanaman, kultur diinkubasi selama 29 hari pada suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$ dan dalam kondisi terang.

3.7.2 Induksi Kalus Primer dan Embrio Somatik

Induksi kalus primer dilakukan dengan menanam eksplan ke dalam media perlakuan yang bertujuan untuk menginduksi kalus primer. Eksplan daun yang digunakan adalah daun pertama setelah pucuk, sedangkan eksplan *internode* yang digunakan adalah ruas batang kedua setelah pucuk. Eksplan daun pucuk dan *internode* berasal dari tanaman steril yang telah dikulturkan pada media pre-kondisi selama 29 hari. Pengambilan eksplan dilakukan dengan cara memilih daun pertama setelah pucuk lalu dipotong dengan ukuran $\pm 2 \times 5 \text{ mm}^2$, sedangkan bagian *internode* diambil pada bagian ruas ke-2 setelah tunas pucuk lalu dipotong dengan ukuran $\pm 3 \text{ mm}$. Setiap botol kultur berisi 3 eksplan yang ditanam pada media sesuai dengan perlakuan yang diberikan dengan permukaan bawah daun (abaksial) menyentuh permukaan media. Setelah itu, kultur diinkubasi pada ruang gelap dengan suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 3 minggu. Setelah 3 minggu, eksplan berdediferensiasi menjadi kalus. Kalus tersebut kemudian ditimbang dengan cara menimbang sampel beberapa ukuran kalus di dalam LAFC. Tahapan yang dilakukan adalah, pertama dibersihkan timbangan dan LAFC dengan spirtus kemudian timbangan dimasukkan ke dalam LAFC bersamaan dengan alat-alat diseksi, ubin, dan alat subkultur lainnya. Setelah itu, alat-alat tersebut di UV selama 2 jam. Apabila sudah 2 jam, UV kemudian dimatikan kemudian kalus ditimbang. Kalus yang ditimbang adalah 3 kalus pada masing-masing perlakuan yang mewakili ukuran besar, sedang, dan kecil. Kalus kemudian dipindahkan pada media yang sama seperti sebelumnya (MIKP) lalu diinkubasi kembali selama 3 minggu di ruang gelap untuk memperoleh embrio somatik. Setelah embrio muncul maka dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop stereo.

3.7.3 Pematangan Embrio

Kalus yang sudah diinkubasi selama 6 minggu pada media induksi kalus primer tumbuh menjadi kalus embriogenik yang menghasilkan embrio somatik. Kalus tersebut kemudian disubkultur pada media pematangan embrio sesuai perlakuan yang diberikan namun dengan konsentrasi ZPT yang sudah diturunkan (Tabel 2), setiap botol berisi 3 kalus. Kalus diinkubasi kembali pada ruangan gelap dengan suhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$ untuk memacu pertumbuhan embrio agar mencapai fase kotiledon. Pada tahap ini dilakukan pengamatan visual dengan menggunakan mikroskop stereo untuk mengamati perkembangan embrio yang terbentuk.

3.7.4 Regenerasi Tunas

Kalus yang sudah diinduksi pada media pematangan embrio menunjukkan pertumbuhan embrio hingga fase kotiledon. Embrio tersebut berkembang menjadi kotiledon hijau (*green cotyledon*) sehingga harus disubkultur pada media regenerasi tunas. Media regenerasi tunas yang digunakan adalah formulasi Media MS + BA 0,2 mg/l + GA 0,01 mg/l. Kalus diinkubasi pada media induksi tunas selama 4 minggu dan dalam kondisi terang hingga kotiledon berkembang menjadi kotiledon hijau.

3.8 Variabel Pengamatan

Pengamatan pada penelitian ini terbagi menjadi 2 yaitu pengamatan kualitatif dan pengamatan kuantitatif. Pengamatan kualitatif terdiri dari pengamatan visual kalus yaitu warna kalus, struktur kalus, dan fase perkembangan embrio. Pengamatan kuantitatif terdiri dari pengamatan waktu muncul kalus primer, bobot kalus primer 3 msi (minggu setelah induksi), persentase kalus berembrio, jumlah embrio, dan persentase eksplan berkalus.

3.8.1 Pengamatan Kualitatif

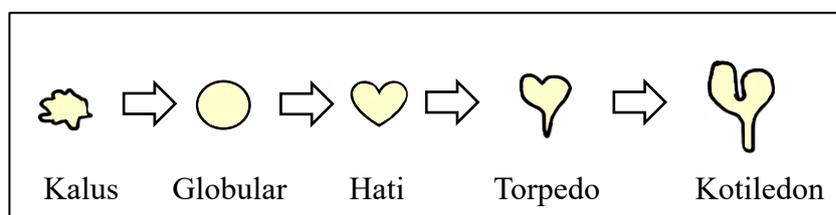
Pengamatan kualitatif merupakan pengamatan visual kalus yang terdiri dari 2 jenis variabel pengamatan yaitu warna kalus dan struktur kalus. Selain itu juga dilakukan pengamatan fase pembentukan embrio somatik.

3.8.1.1 Warna kalus

Pengamatan warna kalus diamati setiap 2 hari sekali setelah eksplan diinduksi pada media induksi kalus primer. Perubahan warna yang tampak diamati dan dicatat. Apabila kalus yang terbentuk berwarna putih atau kekuningan maka kalus tersebut merupakan kalus embriogenik.

3.8.1.2 Struktur kalus

Pengamatan struktur kalus diamati ketika kalus sudah terbentuk sempurna. Kalus embriogenik memiliki struktur yang remah, sedangkan kalus non-embriogenik memiliki struktur yang padat (kompak). Selain itu, diamati juga fase perkembangan embrio somatik. Kalus berkembang menjadi kalus embriogenik yang memiliki embrio somatik. Embrio somatik tersebut melalui fase-fase yang dimulai dari fase globular, hati, torpedo, dan kotiledon. Fase perkembangan embrio somatik disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Fase perkembangan embrio somatik (Greer, 2008).

3.8.2 Pengamatan Kuantitatif

Pengamatan kuantitatif yang dilakukan terdiri dari 5 variabel pengamatan yaitu waktu muncul kalus primer, bobot segar kalus primer, persentase kalus berembrio, jumlah embrio, dan persentase eksplan berkalus. Variabel pengamatan yang akan dianalisis menggunakan anova yaitu waktu muncul kalus primer, bobot kalus primer 3 msi, dan persentase kalus berembrio. Variabel yang tidak dianalisis menggunakan anova yaitu jumlah embrio dan persentase eksplan berkalus.

3.8.2.1 Waktu muncul kalus primer

Pengamatan waktu muncul kalus primer dilakukan setelah penanaman eksplan pada media induksi kalus primer. Pengamatan tersebut dilakukan setiap 2 hari sekali selama 3 minggu untuk melihat waktu terbentuknya kalus pada masing-masing perlakuan yang diberikan.

3.8.2.2 Bobot kalus primer 3 msi

Pengamatan bobot segar kalus primer dilakukan dengan cara menimbang kalus primer pada saat kalus berumur 3 msi pada media induksi kalus primer. Penimbangan kalus dilakukan dengan cara menimbang 3 kalus pada masing-masing perlakuan yang memiliki kriteria kalus paling besar, sedang, dan kecil. Kalus ditimbang dengan timbangan digital di dalam LAFC dengan kondisi aseptik untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Kalus yang sudah ditimbang disubkultur pada media yang sama (MIKP) dan diinkubasi selama 3 minggu di ruangan gelap.

3.8.2.3 Persentase kalus berembrio

Pengamatan persentase kalus berembrio dilakukan dengan menghitung jumlah kalus yang sudah menghasilkan embrio pada 3 msi pada media pematangan embrio. Persentase diperoleh berdasarkan masing-masing perlakuan yang sudah

diberikan. Adapun rumus perhitungan persentase kalus berembrio adalah sebagai berikut:

$$\text{Persentase kalus berembrio} = \frac{\text{Jumlah kalus berembrio}}{\text{Jumlah seluruh kalus}} \times 100$$

3.8.2.4 Jumlah embrio

Pengamatan jumlah embrio dilakukan dengan menghitung jumlah embrio pada saat kalus berumur 3 minggu setelah disubkultur pada media pematangan embrio menggunakan mikroskop stereo. Pengamatan ini dilakukan untuk mengetahui jumlah embrio yang terbentuk dari kalus yang sudah diinduksi.

3.8.2.5 Persentase eksplan berkalus

Pengamatan persentase eksplan berkalus dilakukan dengan cara menghitung jumlah eksplan yang mengalami perkembangan menjadi kalus dalam waktu 3 msi. Adapun rumus menghitung persentase eksplan berkalus adalah sebagai berikut:

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

3.9 Analisis Data

Data yang sudah diperoleh dari hasil pengamatan kemudian dianalisis menggunakan anova. Variabel pengamatan yang dianalisis menggunakan anova yaitu waktu muncul kalus, bobot kalus primer 3 msi, dan persentase kalus berembrio. Variabel yang tidak dianalisis menggunakan anova yaitu jumlah embrio dan persentase eksplan berkalus.

Data yang tidak dianalisis akan diuji standar error nya dengan rumus sebagai berikut:

$$\begin{aligned} var &= \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \\ SD &= \sqrt{var} \\ SE &= \frac{SD}{\sqrt{n}} \end{aligned}$$

Keterangan:

Var = Varian;

SD = Standar Deviasi;

SE = Standar Error.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Simpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- (1) Eksplan daun pucuk dan *internode* memberikan respon yang baik ketika diinduksi pada media induksi kalus primer dan menghasilkan persentase eksplan berkalus 100%. Namun, eksplan *internode* memiliki struktur non-embriogenik sehingga tidak dapat menghasilkan embrio somatik;
- (2) Media induksi yang mengandung MS + picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l merupakan jenis media terbaik yang dapat menghasilkan persentase eksplan berkalus (100%) dan menginduksi embrio somatik dengan persentase kalus berembrio 34,92%;
- (3) Interaksi antara eksplan daun pucuk dengan media induksi MS+ picloram 8 mg/l + NAA 6 mg/l merupakan perlakuan terbaik yang menghasilkan embrio somatik dengan persentase eksplan berembrio sebesar 34,92%, jumlah embrio somatik 299 embrio, dan rata-rata embrio per kalus sebesar 15,74 embrio.

5.2 Saran

Pada penelitian ini telah ditemukan protokol pembentukan embrio somatik Ubi Kayu Varietas Vati-1, namun embrio somatik yang dihasilkan tidak dapat membentuk planlet. Berdasarkan hasil tersebut disarankan penelitian lanjutan untuk meningkatkan frekuensi pembentukan tunas menjadi planlet melalui modifikasi media regenerasi tunas dan penambahan durasi waktu inkubasi embrio pada kondisi gelap.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahansal, K., Aadel, H., Udupa, S. M., Gaboun, F., Abdelwahd, R., Ibriz, M., and Iraqi, D. 2022. Effect of picloram and 2, 4-D on plant regeneration from mature and immature embryos of moroccan durum wheat varieties. *Journal of Plant Biotechnology*. 49(2): 131-138.
- Annilen. 2024. *Embriogenesis Somatik Eksplan Daun Muda Ubi Kayu (Manihot esculenta Crantz) Varietas Vati-1 dengan Penambahan Picloram atau 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) pada Media In Vitro*. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Anuradha, T., Kumar, K., and Balasubramanian, P. 2015. Cyclic somatic embryogenesis of elite Indian cassava variety H-226. *Indian Journal of Biotechnology*. 14(4): 559-565.
- Arianto, D., Basri, Z., dan Bustami, M. U. 2013. *Induksi kalus dua klon kakao (Theobroma cacao L.) unggul Sulawesi pada berbagai konsentrasi 2, 4 dichlorophenoxy acetic acid secara in vitro*. (Doctoral dissertation). Tadulako University). Palu.
- Aristin, F.N., Budijanto., Taryana, D., dan Ruja, N.I. 2022. *Lahan dan Petani: Ubi Kayu Sebagai Pendukung Kawasan Sentra Industri Tape Bondowoso*. Media Nusa Creative. Malang.
- Avivi, S. 2011. Regenerasi embrio zigot kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan penambahan kinetin pada Media B5. *Jurnal Ilmu Dasar*. 12(2): 132-139.
- Balitkabi. 2023. *Laporan Kerja Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi Tahun 2022*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan.
- Basri, A. H. H. 2016. Kajian pemanfaatan kultur jaringan dalam perbanyakan tanaman bebas virus. *Agrica Ekstensi*. 10(1): 64-73.
- Berhanu, R and Feyissa, T. 2020. Factors influencing micropropagation and somatic embryogenesis of two cassava varieties, Kello and Qulle. *Cell Biology and Development*. 4(2): 71-81.

- Beyene D. 2009. *Micropropagation of Selected Cassava Varieties (Manihot esculenta Crantz) from Meristem Culture*. (Thesis). Addis Ababa University. Eithopia.
- Dwipayana, G.A.J., Yuswanti, H., dan Mayun, I.A. 2016. Induksi kalus stroberi (*Fragaria spp.*) melalui aplikasi asam 2,4-Diklorofenoksiasetat secara in vitro. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. 5(3): 310–321.
- Fauziah, A dan Widoretno, W. 2015. Regenerasi tanaman dari eksplan kalus bawang putih (*Allium sativum* L.) secara in vitro. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*. 3(1): 32-35.
- Fariroh, I., Kriswanto, B., Restanto, D. P., and Hariyono, K. 2023. Somatic embryogenesis induction in four cassava landraces in East Java, Indonesia. *Journal of Plant Biotechnology*. 50: 11-18.
- Greer, M.S. 2008. Effect of a ammonium nitrate upon direc somatik embriogenesis anad biolistic transformation of wheat. *Thesis*. 16(1): 1-23.
- Hapsoro, D dan Yusnita. 2018. *Kultur Jaringan: Teori dan Praktik*. Andi. Yogyakarta. 23 hlm.
- Harahap, F., Hasanah, A., Insani, H., Harahap, K.N., Pinem, D.M., Edi, Syahmi., Sipahutar, H., dan Silaban, R. 2019. *Kultur Jaringan Nanas*. Media Sahabat Cendekia. Surabaya. 6 hlm.
- Heriansyah, P. 2020. *Rahasia Mudah Menguasai Kultur Jaringan Tanaman: Teori dan Praktiknya*. Lindan Bestari. Bogor. Hlm 59.
- 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.
- Hrazdina, G. 1992. *Phenolic Metabolism in Plants*. Plenum Press. pp: 1-23.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., and Iwase, A. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The plant cell*. 25(9): 3159-3173.
- Indah, P.N dan Ermavitalini, D. 2013. Induksi kalus daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4- D). *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2(1): 23-37.
- Isah, B. I., Mustapha, Y., dan Sani, L. A. 2018. Effect of types and concentrations of auxins on callus induction and primary somatik embriogenesis in low cyanide cassava cultivars (*Manihot esculentum* Cranz). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. 11(1): 497-501.

- Jayanti, D.R dan Nopiyanti, N. 2021. *Efektivitas zat pengatur tumbuh (ZPT) alami dan kimiawi terhadap pertumbuhan setek batang mawar jepang*. Ahlimedia Press. Malang. 21 hlm.
- Kementerian Pertanian. 2024. *Laporan Tahun 2023*. Direktorat Jenderal Tanaman Pangan. 126 hlm.
- Lestari, E. G. 2011. Peranan zat pengatur tumbuh dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal AgroBiogen*. 7(1): 63-68.
- Lutfiah, A dan Habibah, N. A. 2022. Pengaruh pemberian elisitor ekstrak khamir pada pertumbuhan kultur kalus gambeli dengan penambahan ZPT 2, 4-D dan kinetin. *Indonesian Journal of Mathematics and Natural Sciences*. 45(2): 77-83.
- Mahadi, I., Syafi'i Y., dan Sari. 2016. induksi kalus jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*) menggunakan hormon 2,4-D dan BAP dengan metode in vitro. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 21(2): 84-89.
- Maheswari, O. 2021. *Panduan Bioteknologi Pertanian*. DIVA Press. Yogyakarta. 48 hlm.
- Marigi, E. N., Masanga, J. O., Munga, T. L., Karanja, L. S., Ngugi, M. P., Thagana, W. M., 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(1): 35-44.
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., and Loyola-Vargas, V. M. 2019. Signaling overview of plant somatik embryogenesis. *Frontiers in plant science*. 10(77): 1-15.
- Mongomake, K., Doungous, O., Khatabi, B., and Fondong, V. N. 2015. Somatik embryogenesis and plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces from Cameroon. *SpringerPlus*. 4(477): 1-12.
- Murashige, T and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15: 473-497.
- Nugroho, C. C. 2017. Induksi kalus embriogenik beberapa genotipe ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.). *Jurnal Magrobis*. 17(1): 1-15.
- Nugroho, C.C., Khumaida, N. dan Ardie, D.S.W. 2016. Pertumbuhan tunas ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) genotipe jame-jame secara in vitro. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*. 44(1): 40.

- Priadi, D dan Sudarmonowati, E. 2006. Pengaruh komposisi media dan ukuran eksplan terhadap pembentukan kalus embriogenik beberapa genotip lokal ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.). *Biodiversitas*. 7(3): 269-272.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Bul. Agrobio* 5 (2): 51-58.
- Purwono dan Purnamawati, H. 2007. *Budidaya 8 Jenis Tanaman Pangan Unggul*. Jakarta. Penebar Swadaya. Hlm 64.
- Rahardja, B.S., Purwitasari, A.T., Moch, dan Alamsjah, A. 2012. Pengaruh ZPT terhadap pertumbuhan *Nannochloropsis oculata*. *Jurnal of Marine and Coastal Science*. 1(2): 71-75.
- Rahmat, M. 2020. *Tanaman Penghasil Bahan Bakar*. Alprin. Semarang. 28 hlm.
- 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
- Raza, G., Singh, M. B., and Bhalla, P. L. 2019. Somatic embryogenesis and plant regeneration from commercial soybean cultivars. *Plants*. 9(1): 38.
- Riyadi, I dan Tirtoboma. 2004. Pengaruh 2,4-D terhadap induksi embrio somatik kopi arabika. *Buletin Plasma Nutfah*. 10(2). 82-89.
- Rivai, R.R dan Hendra, H. 2015. Induksi Kalus *Chrysanthemum indicum* Untuk Meningkatkan Keragaman Genetik dari Sel Somatik. *Prosiding Seminar Nasional Biodiversitas Indonesia*. 1(1): 167-170.
- Rohmah, D.I. 2014. *Pengaruh Berbagai Konsentrasi 2,4 D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) Terhadap Induksi dan Viabilitas Kalus Daun dan Nodus Tanaman Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) pada Medium New Phalaenopsis (NP) secara In Vitro*. (Skripsi). Universitas Negeri Surabaya. Surabaya.
- Schädel, C., Blöchl, A., Richter, A., and Hoch, G. 2010. Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plants. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 48(1): 1-8
- Setiawan, R. B., Khumaida, N., dan Dinarti, D. 2024. Proliferasi kalus embriogenik dan embrio somatik tanaman gandum (*Triticum aestivum* L.). *Jurnal Sains Agro*. 9(1): 61-67.
- Sugiyarto., Suwarni, T., Dan Hidayah, L. 2022. *Keragaman Plasma Nutfah Ubi Kayu (Manihot esculenta) di Wilayah Kabupaten Wonosobo, Temanggung, dan Magelang*. Pustaka Rumah Cinta. Magelang. 13 hlm.

- Syombua, E. D., Wanyonyi, C. N., Adero, M. O., Mbinda, W. M., Ngugi, M. P., Alakonya, A. E., and Oduor, R. O. 2019. Explant type and hormone regime influences somatic embryogenesis and regeneration of cassava. *African Journal of Biotechnology*. 18(25): 532-539
- Taryono. 2016. *Pengantar bioteknologi untuk pemuliaan tanaman*. UGM Press. Yogyakarta. 30 hlm.
- Utomo, S.D., Edy, A., Pujisiswanto, H., dan Yuliadi, E. 2020. Peningkatan pengetahuan petani dalam melakukan grafting ubi kayu sebagai batang atas dan singkong karet sebagai batang bawah dan inisiasi kebun bibit. *Jurnal Sinergi*. 1(1): 80-85.
- Wahyuni, D dan Firianingsih. A. 2009. Teknik pemberian Benzyl Amino Purin untuk memacu pertumbuhan kalus dan tunas pada kotiledon melon (*Cucumis melo L.*). *Buletin Teknik Pertanian*. 14(2): 50-53.
- Wardani, D. K. 2020. Induksi kalus tanaman nilam (*Pogostemon cablin Benth*) dengan pemberian konsentrasi auksin jenis 2, 4-D (*dichlorophenoxyacetic acid*) dan picloram. *Jurnal Indonesia Sosial Sains*. 1(5): 396-401.
- Widyastuti, N dan Deviyanti, J. 2018. *Kultur Jaringan: Teori dan Praktik Perbanyak Tanaman Secara In Vitro*. ANDI. Yogyakarta. 2 hlm.
- Widyastuti, N dan Tjokrokusumo, D. 2006. Peranan beberapa Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) tanaman pada kultur in vitro. *Jurnal Sains dan Teknologi BPPT*. 3(5): 55-63.
- Yelli, F., Ardian, A., Utomo, S. D., Setiawan, K., dan Surtono, A. 2023. Sosialisasi perbanyak bibit ubi kayu melalui teknologi kultur jaringan kepada Kelompok Tani Wira Bakti 1 Lampung Tengah, Lampung. *Abdimas Galuh*. 5(1): 337-345.
- Yelli, F., Titin, A., Utomo, S. D., and Pathak, A. 2023. Somatic embryogenesis in two cassava (*Manihot esculenta Crantz*) genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 51(1): 1-13.
- Yuliarti, N. 2024. *Kultur Jaringan Tanaman Skala Rumah Tangga*. Andi. Yogyakarta. 3 hlm.
- Yusnita. 2015. *Kultur Jaringan Tanaman Sebagai Teknik Penting Bioteknologi Untuk Menunjang Pembangunan Pertanian*. Aura Publishing. Bandar Lampung. 14 hlm.
- Zheng, S. J., Henken, B., Krens, F.A., dan Kik, C. 2003. The development of efficient cultivar-independent plant regeneration system from callus derived from both apical and non-apical root segments of garlic (*Allium sativum L.*). *Journal Biol. Plant*. 39: 288-292.

Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman; Solusi Perbanyak Tanaman Budi Daya*. Bumi Aksara. Jakarta. 249 hlm.

Zuyasna, Z., Hafsah, S., Fajri, R., Syahputra, M. O., dan Ramadhan, G. 2012. The effect of picloram concentrations and explants types on the induction of somatik embryo on North Aceh Cocoa genotype. In *2nd Syiah Kuala University Annual International Conference 2012*. Syiah Kuala University. Banda Aceh.