

Pengaruh Beragam Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Induksi Kalus Organogenik Dari Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz) Genotipe Gajah dan Kuning

Influence of Various Growth Regulators on Induction Organogenic Callus from Gajah and Kuning Cassava Genotype (Manihot esculenta Crantz)

Nurhamidar Rahman^{1*}, Hani Fitriani¹, Nurhaidar Rahman², N. Sri Hartati¹

¹*Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong 16911, Indonesia*

²*Pusat Penelitian Teknologi Tepat Guna, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Subang 41213, Indonesia*

*E-mail: nurhamidarr@yahoo.com

ABSTRACT

Kuning and Gajah genotypes are two collections of cassava in the Biotechnology Research Center for Germplasm, LIPI with the advantages of each genotype are high beta carotene and high production. The multiplication in *in vitro* culture can be done one of them through organogenesis. The aim of this study was to evaluate the effect of using 2,4-D; NAA and Kinetin are used singly for the formation of organogenesis of cassava in the Kuning Cassava and Gajah genotypes. This research was conducted at the Laboratory of Molecular Genetics and Modification of Plant Biosynthetic Pathways, Bioteknologi Research Center, LIPI, Bogor since January - February 2018. The source of explants were young leaves and petioles from cassava plant culture *in vitro* genotypes of Gajah and Kuning yam which were three months old. in culture. The basic media used as a planting medium were Murashige and Skoog (MS) media with the addition of growth regulators (ZPT) singly, 2,4-D, NAA and Kinetin with two concentrations of ZPT each, 8 and 10 mg L⁻¹. This research was arranged based on a completely randomized design factorial pattern consisting of 2 factors. All data obtained were analyzed using ANOVA and if there is an influence then proceed with the DMRT test with an error rate of 5% using the SPSS program. The highest number of Kuning genotype cassava organogenic callus that developed into shoots on the medium added by ZPT was 2.4 D and kinetin with the same concentration of 8 mg L⁻¹. Formation of the best organogenic callus in petiole explants in the media with the addition of a single 2,4-D and Kinetin with the same concentration of 8 mg L⁻¹.

Keywords: Cassava, growth regulators, organogenic.

PENDAHULUAN

Ubi kayu termasuk tanaman hasil introduksi yang berasal dari negara Brazil. Ubi kayu termasuk tanaman perdu kaya karbohidrat dari keluarga Euphorbiaceae yang dikenal luas pemanfaatannya mulai dari daun sebagai sayuran dan umbinya dapat dijadikan bahan pangan, pakan, dan industri (Widaningsih, 2015). Seleksi terhadap 107 koleksi ubi kayu milik Kebun Plasma Nutfah-Puslit Bioteknologi, LIPI menunjukkan adanya sifat-sifat unggul. Dua genotipe ubi kayu yang unggul tersebut diantaranya adalah Kuning dan Gajah. Keunggulan dari masing-masing genotipe Kuning dan Gajah adalah kandungan beta karoten dan produksi yang tinggi. Beta karoten merupakan prekursor vitamin A yang berfungsi untuk imunitas, kesehatan mata dan kulit. Kandungan Vitamin A dalam ubi kayu genotipe Kuning sebanyak 385 IU (Kuswara,

2015) dengan produksinya sekitar 5,6 ton per hektar (Hartati & Hartati, 2019). Ubi kayu genotipe Gajah memiliki produktivitas antara 100 ton – 140 ton per hektar (Anggraini, 2014). Secara umum kandungan vitamin A pada ubi kayu adalah sekitar A 13 IU < (USDA, 2017). Selain memiliki umbi yang berukuran besar apabila dibandingkan dengan yang lainnya, ubi kayu Gajah memiliki rasa yang enak, lebih gurih, tekstur umbinya lebih lunak dan lebih tahan terhadap serangan hama (Kuswara, 2015).

Pemenuhan bibit ubi kayu unggul kaya beta karoten dapat dicapai melalui teknik kultur jaringan. Teknik perbanyakan bibit ubi kayu melalui teknik *in vitro* ini memiliki kelebihan dibanding perbanyakan secara konvensional. Bibit hasil kultur jaringan memiliki keunggulan dibandingkan tanaman konvensional antara lain dapat mengatasi inkompatibilitas, sifatnya

sama dengan induknya, jumlah tanaman yang dihasilkan banyak, hemat tempat, hemat biaya, dan ketersediaan sepanjang musim. Menurut Conger (1980), keuntungan kultur jaringan pada tanaman dapat menghasilkan tanaman dalam jumlah banyak dan relatif seragam. Teknik kultur jaringan tanaman ini telah dimanfaatkan secara luas untuk berbagai kepentingan seperti multiplikasi tanaman-tanaman unik, eksplorasi tanaman langka, rekayasa genetik tanaman dan metabolisme senyawa kimia tertentu, dan sistem model dalam fisiologi sel tanaman (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota 2006).

Salah satu teknik penggandaan biakan tanaman secara kultur jaringan adalah dengan cara embriogenesis somatik dan organogenesis (Purnamaningsih, 2003). Organogenesis merupakan proses pembentukan organ tanaman dari dalam sel-sel kalus, sedangkan embriogenesis somatik merupakan proses pembentukan tanaman lengkap dari sel-sel somatik melalui tahapan perkembangan embrio yang spesifik (Pardal, 2003). Penelitian mengenai pembentukan tunas baru pada ubi kayu (multiplikasi tunas) maupun pembentukan kalus embriogenik secara bioteknologi telah banyak dilakukan antara lain oleh Hankoua *et al.*, 2006; Onuoch & Onwubiku, 2007; Feitosa *et al.*, 2007; Rossin & Rey, 2011; Wongtiem *et al.*, 2011; Mapayi *et al.*, 2013; dan Hartati *et al.*, 2013. Penelitian terkait organogenesis pada ubi kayu telah dipelajari pada beberapa genotipe dan dengan menggunakan berbagai komposisi media dan eksplan sudah banyak dilakukan baik oleh para peneliti Indonesia maupun mancanegara, antara lain Sudarmonowati *et al.*, 2002; Sukmadajaja & Widhiastuti, 2011; Nugroho, 2011; Khumaida & Fauzi, 2013; Mushiyimana *et al.*, 2011; Ogero *et al.*, 2012; Cacai *et al.*, 2013; dan Mapayi *et al.*, 2013. Salah satu penelitian yang dilakukan oleh Nugroho (2017) pada ubi kayu Gajah menyatakan bahwa munculnya kalus pada eksplan dimungkinkan karena pemberian ZPT jenis sitokinin dengan konsentrasi yang cukup besar yaitu 5 mg L⁻¹ dan pemberian auksin jenis NAA sebesar 0,1 mg L⁻¹.

Beberapa faktor yang menentukan keberhasilan organogenesis antara lain genotipe, jenis eksplan, dan komposisi media. Penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang tepat untuk organogenesis ke dalam media tumbuh berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang optimal. ZPT

adalah salah satu komponen dalam media tumbuh yang menjadi stimulus untuk pertumbuhan morfogenesis dalam kultur jaringan tanaman (Gunawan, 1987). Harjadi (2009) mengemukakan jika ZPT berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Efektifitas ZPT dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jenis ZPT yang digunakan, konsentrasi, urutan penggunaan, dan lamanya induksi dalam kultur tertentu. Gunawan (1995) menyatakan bahwa pemilihan ZPT seperti jenis auksin dan konsentrasi tergantung dari tipe pertumbuhan yang dikehendaki, level auksin endogen, kemampuan jaringan mensintesis auksin, dan golongan ZPT lain yang ditambahkan. Wattimena (1992) membagi ZPT tanaman dalam lima kelompok yaitu auksin, giberelin, etilen, sitokinin dan asam absisat (ABA). Akan tetapi, ZPT yang umum digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah auksin dan sitokinin. Konsentrasi auksin yang umum digunakan berkisar antara 0,01 - 10 ppm (Mardhiyetti *et al.*, 2015).

Auksin berpengaruh terhadap pembelahan sel, perpanjangan sel, pembesaran jaringan dan pembentukan akar. Pada konsentrasi tinggi akan merangsang pertumbuhan kalus, tetapi menghambat pertumbuhan tunas dan akar. Sedangkan sitokinin berfungsi sebagai stimulus untuk pertumbuhan sel dalam jaringan dan tunas daun (Wetherell, 1982). Dalam penelitian ini, auksin yang digunakan adalah 2,4-Dichloro phenoxy acetic acid (2,4-D) dan naphthalene acetic acid (NAA). Hendaryono & Wijayani (1994) berpendapat bahwa 2,4-D dan NAA termasuk golongan auksin sintesis memiliki sifat yang stabil karena tidak mudah terurai. Untuk penelitian ini sitokinin yang digunakan adalah kinetin (6-furfuryl amino purine). Penggunaan pada konsentrasi sitokinin tinggi dengan kisaran 1 - 10 mg L⁻¹ dapat mendorong pertumbuhan tunas, namun dapat menghambat pertumbuhan akar. Jika konsentrasi sitokinin lebih tinggi dari auksin dapat mendorong pembentukan tunas menjadi lebih cepat, sedangkan jika konsentrasi auksin dan sitokinin sama akan cenderung membentuk kalus (Dinarti *et al.*, 2010). Dengan demikian, jenis dan konsentrasi ZPT sangat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman kultur terutama respon terhadap organogenesis pada ubi kayu genotipe Kuning dan Gajah.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika Molekuler dan Modifikasi Jalur Biosintesa Tanaman, Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Bogor sejak bulan Januari - Februari 2018.

Material sebagai sumber eksplan yang digunakan untuk penelitian adalah daun muda dan petiol dari tanaman ubi kayu *in vitro* genotip Gajah dan Kuning yang telah berumur tiga bulan di kultur. Media perlakuan untuk pembentukan organogenesis yaitu media dasar (MS0) yang ditambahkan 2,4-D, NAA dan Kinetin secara tunggal dengan konsentrasi masing-masing 8 dan 10 mg L⁻¹, sukrosa 2%, dan mikro agar 0,8%. pH media diatur hingga mencapai 5,8 dengan penambahan HCl atau NaOH.

Penelitian ini disusun berdasarkan rancangan acak lengkap pola faktorial yang terdiri atas 2 faktor. Faktor pertama adalah faktor jenis ubi kayu dan kedua faktor variasi zat pengatur tumbuh (ZPT). Masing-masing ZPT tersebut digunakan secara tunggal sehingga terdapat enam jenis media perlakuan dan satu media kontrol, MS0 (media dasar tanpa penambahan ZPT) (Tabel 1). Setiap perlakuan dilakukan pada 3 unit percobaan yang masing-masing terdiri lima ulangan. Penanaman dilakukan di Laminar Air Flow (LAF). Kultur diinkubasi di dalam ruang kultur dengan suhu $\pm 25^{\circ}$ C, tanpa penerangan dan diamati setiap 2 hari sekali selama 4 minggu. Parameter yang diamati adalah jumlah eksplan yang berhasil membentuk organ karena eksplan mengalami organogenesis. Selanjutnya, seluruh data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan ANOVA dan jika ada pengaruh maka dilanjutkan dengan uji DMRT dengan tingkat kesalahan 5% menggunakan program SPSS.

Tabel 1. Komposisi media perlakuan untuk organogenesis ubi kayu

No.	Kode media	ZPT	Konsentrasi (mg L ⁻¹)
1	Kontrol (MS0)	-	-
2	2,4-D 1	2,4D	10
3	2,4-D 2	2,4D	8
4	NAA 1	NAA	10
5	NAA 2	NAA	8
6	Kin 1	KIN	10
7	Kin 2	KIN	8

HASIL DAN PEMBAHASAN

Eksplan petiol dan daun muda dari genotipe ubi kayu Gajah dan Kuning yang dikulturkan pada berbagai media MS dengan penambahan ZPT secara tunggal (kinetin, NAA dan 2,4-D) pada dua konsentrasi yang berbeda (8 dan 10 mg L⁻¹) ataupun tanpa ZPT selama penelitian berlangsung 30 hari ternyata memberikan respon perkembangan organogenesis yang beragam.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa pembentukan kalus terjadi di semua jenis media perlakuan termasuk kontrol, meskipun jumlah kalus yang dihasilkan berbeda-beda pada setiap eksplan. Rata-rata jumlah kalus yang terbentuk lebih banyak pada media dasar dengan penambahan ZPT dibanding pada media kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa terbentuknya kalus sangat dipengaruhi oleh keberadaan ZPT. Adanya hormon endogen dalam eksplan dapat mendorong terbentuk kalus pada media kontrol. Hormon endogen tersebut memacu pembelahan sel dan mengatur pertumbuhan serta perkembangan tanaman.

Pembentukan kalus pada ubi kayu genotipe Kuning dari kedua jenis eksplan lebih banyak dibanding dengan genotipe Gajah pada berbagai media perlakuan termasuk kontrol. Penambahan ZPT 2,4-D dapat meningkatkan pembentukan kalus pada genotipe Kuning dan Gajah paling tinggi dibanding ZPT lainnya (Tabel 2). Rahayu *et al.* (2003) menyatakan bahwa adanya 2,4-D dalam media kultur akan mendorong terjadinya pembelahan dan perbesaran sel pada eksplan. Akibatnya terjadi peningkatan senyawa kimia alami seperti flavonoid serta memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus.

Pemberian 2,4-D dalam media kultur menyebabkan terjadinya pelunakan dinding sel dengan cara mengaktivasi pompa proton (ion H⁺) pada membran plasma. Hal ini berdampak terhadap derajat keasamaan (pH) pada bagian dinding sel mendekati pH membran plasma (sekitar pH 4,5). Hal ini seperti yang terjadi pada tanaman Melati ketika ZPT 2,4-D ditambahkan dalam media kulturnya maka akan terjadi pemutusan ikatan Hidrogen di antara mikrofibril selulosa dinding sel akibat aktifnya pompa proton. Putusnya ikatan hidrogen menyebabkan jarak antar dinding sel merenggang dan berpengaruh terhadap penurunan tekanan dinding sel pada tanaman Melati. Hal ini berdampak pada sel dari tanaman Melati menjadi lentur. Untuk menguji pengaruh jenis ZPT dan variasi konsentrasi pada genotip Kuning dan Gajah, hasil dari rerata kemudian diuji lanjut DMRT yang disajikan pada Tabel 3. Selain 2,4-D, NAA juga memberikan jumlah kalus tertinggi kedua setelah 2,4-D. Hal ini memperjelas bahwa 2,4-D dan NAA termasuk auksin yang mampu menghambat terjadinya pembentukan tunas, tetapi dapat meningkatkan proses embriogenesis somatik (Nugroho, 2014).

Tabel 2. Rata-rata jumlah eksplan daun muda dan petiol yang membentuk kalus pada ubi kayu Gajah dan Kuning

Perlakuan	Genotipe Ubi Kuning		Genotipe Gajah	
	Eksplan daun muda	Eksplan petiol	Eksplan daun muda	Eksplan petiol
Kontrol	2,4	5,28	0,56	3,36
NAA 2	3,72	3,72	3,12	4,12
NAA 1	4,56	5,04	4,12	4,12
Kin 2	4,16	3,12	3,68	5,32
Kin 1	4,20	4,96	2,68	3,00
2,4 D 2	4,68	5,60	4,20	5,40
2,4 D 1	5	5,32	3,64	4,48b

Keterangan:

2,4D 1 = 2,4D 10 mg L-1, 2,4D 2 = 2,4D 8 mg L-1, NAA 1 = NAA 10 mg L-1, NAA 2 = NAA 8 mg L-1, KIN 1 = Kinetin 10 mg L-1, dan KIN 2 = Kinetin 8 mg L-1

Sedangkan kinetin termasuk sitokinin yang berperan dalam proses pembelahan sel dan pembentukan tunas (Sari, 2013) sehingga jumlah kalus yang terbentuk pada eksplan dari kedua genotip ubi kayu tergolong rendah.

Jenis eksplan juga berpengaruh terhadap respon pembentukan kalus dari genotip ubi kayu yang diuji. Jenis eksplan petiol memberikan rata-rata pembentukan kalus paling tinggi dibanding daun muda pada sebagian besar jenis dan konsentrasi ZPT.

Pembentukan kalus tertinggi pada genotipe Kuning dan Gajah hampir sebagian besar berasal dari eksplan petiol yang dikulturkan di media dengan penambahan 2,4-D pada konsentrasi 8 dan 10 mg L-1. Pada eksplan daun muda, perlakuan 2,4-D dengan konsentrasi 8 mg L-1 dapat meningkatkan jumlah kalus lebih banyak dibandingkan konsentrasi 10 mg L-1 ataupun penggunaan ZPT lainnya. Hal ini mengindikasikan bahwa untuk induksi kalus dibutuhkan konsentrasi auksin yang tidak terlalu tinggi. Fletcher *et al.* (2011) mengemukakan bahwa penggunaan eksplan daun yang dikulturkan dalam media yang mengandung 8 mg L-1 2,4-D menghasilkan persentase kalus tertinggi pada semua kultivar ubi kayu yang dicobakan. Hasil yang berbeda dengan induksi kalus embriogenik pada pepaya, penambahan 2,4-D sebesar 20 ppm adalah media perlakuan terbaik (Hutami *et al.*, 2001).

Proses pembentukan organogenesis pada eksplan ubi kayu secara *in vitro* dapat terjadi secara langsung ataupun tidak langsung. Proses organogenesis pada kultur *in vitro* dari eksplan daun ubi kayu tidak diawali dengan pembentukan kalus tapi langsung membentuk organ tanaman berupa tunas atau akar selanjutnya menjadi tanaman lengkap (Zhang & Lemaux, 2004; Hartmann *et al.*, 1990). Proses organogenesis tersebut dikendalikan oleh keberadaan ZPT yang mempengaruhi

terhadap pembelahan sel dan proses diferensiasinya.

Setelah 3 MST, pada genotip Kuning kalus berkembang menjadi tunas pada semua media yang dicoba dengan jumlah yang bervariasi (Tabel 3). Sedangkan pada genotipe Gajah, hingga 4 MST belum menunjukkan pembentukan organogenik. Perbedaan ini diduga kebutuhan genotipe Gajah akan ZPT untuk membentuk tunas sangat tinggi, sehingga pada konsentrasi 8 maupun 10 mg L-1 belum dapat membentuk tunas. Selain itu, kemungkinan kandungan hormon endogen pada genotipe Gajah berbeda dengan genotipe Kuning yang ditanam pada media kultur yang sama akan tetap mempengaruhi respon terhadap pemberian ZPT. Menurut Abidin (1990), pada konsentrasi ZPT tertentu pertumbuhan dan perkembangan sel akan terganggu karena aktivitas hormon endogennya terhambat.

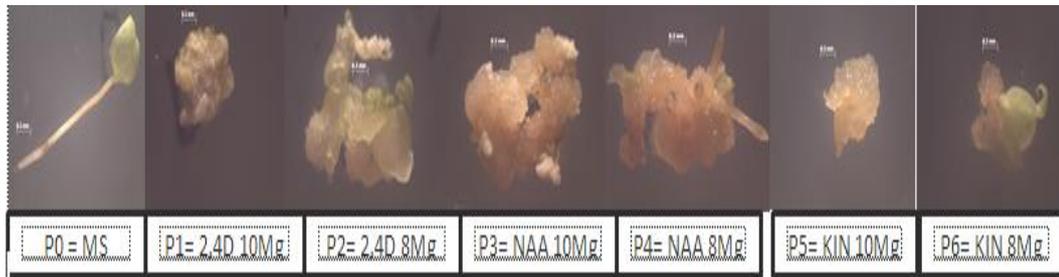
Tabel 3. Rata-rata jumlah eksplan daun muda dan petiol ubi kayu dari genotipe Kuning yang membentuk kalus organogenik

Perlakuan	Eksplan daun muda	Eksplan petiol
Kontrol	0,04 a	0,12 a
NAA 2	0,12 a	0,04 a
NAA 1	0,04 a	0,04 a
Kin 2	0,16 a	0,20 a
Kin 1	0,04 a	0,04 a
2,4 D 2	0,12 a	0,20 a
2,4 D 1	0,16 a	0,04 a

Keterangan:

1) 2,4D 1 = 2,4D 10 mg L-1, 2,4D 2 = 2,4D 8 mg L-1, NAA 1 = NAA 10 mg L-1, NAA 2 = NAA 8 mg L-1, KIN 1 = Kinetin 10 mg L-1, dan KIN 2 = Kinetin 8 mg L-1.

2) Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama di tiap eksplan menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT pada taraf 5%.



Gambar 1. Pembentukan kalus ubi kayu genotipe Kuning dari eksplan daun muda pada semua perlakuan pada 3 MST



Gambar 2. Pembentukan organogenesis ubi kayu genotipe Kuning

Berdasarkan Gambar 2, dari eksplan daun langsung muncul organ berupa akar yang diduga berasal dari sel-sel prokambial yang terinduksi karena adanya penambahan ZPT auksin dan sitokinin pada konsentrasi tertentu (Rose *et al.*, 2006). Selaras dengan hasil penelitian organogenesis pada tanaman pameloyang menunjukkan bahwa eksplan daun pameloyang tersebut langsung membentuk akar adventif saat diinduksi pada media MS0. Hal ini kemungkinan kandungan auksin endogen pada eksplan daun tersebut cukup tinggi yang memicu terjadi pembentukan akar. Sebagaimana diketahui, daun termasuk salah satu bagian pada tanaman yang memproduksi auksin (Davies, 2004) dan berperan dalam inisiasi akar (Srivastava, 2002).

Berdasarkan Tabel 3, penambahan berbagai ZPT dengan konsentrasi berbeda menunjukkan respon tunas yang terbentuk dari kalus organogenik tidak berbeda nyata pada ubi kayu genotipe Kuning asal eksplan daun muda maupun petiol. Semua jenis eksplan tersebut dapat membentuk organogenik pada dua jenis konsentrasi di semua ZPT yang dicoba. Pembentukan kalus organogenik pada eksplan petiol di media dengan penambahan secara tunggal 2,4-D dan Kinetin dengan konsentrasi yang sama yaitu 8 mg L⁻¹ merupakan yang paling optimal dibanding konsentrasi yang

lebih tinggi (Gambar 2). Wattimena *et al.* (1992) menyatakan bahwa proliferasi pada tunas aksilar membutuhkan konsentrasi sitokinin yang tinggi tanpa auksin atau auksin dalam konsentrasi rendah sekali. Induksi tunas secara optimal terjadi jika ke dalam media kultur ditambahkan auksin 2,4-D dengan konsentrasi rendah. Hasil ini sama seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Indah & Ermavitalini (2013) bahwa penambahan auksin pada konsentrasi rendah selain media dan konsentrasi ZPT yang tepat dapat memacu pembentukan kalus.

Hasil penelitian Suyitno *et al.* (2011) melaporkan bahwa dalam medium yang cocok, penambahan hormon 2,4-D pada eksplan batang maupun daun Ngukilo sudah dapat terinduksi membentuk kalus. Induksi kalus terjadi pada semua konsentrasi 2,4-D yang diberikan dan sebagian besar ada yang diikuti organogenesis yakni pembentukan akar atau tunas. Waktu pembentukan organogenik lebih cepat pada eksplan petiol dibanding daun muda. Rahayu (2003) menyatakan bahwa keberhasilan pembentukan kalus ditentukan salah satunya oleh ketersediaan kandungan kambium yang ada pada eksplan, jika eksplan memiliki kambium akan lebih mudah untuk menginduksi kalus seperti pada petiol, embrio muda, hipokotil dan batang muda. Hal ini

diduga menjadi faktor yang dapat mempercepat waktu pembentukan kalus pada petiol dibanding pada eksplan daun.

KESIMPULAN

Konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D sebesar 8 mg L⁻¹ pada dua jenis eksplan yaitu daun muda dan petiol dari ubi kayu genotipe Kuning dan Gajah dapat menginduksi kalus paling banyak dibanding zat pengatur tumbuh lainnya. Namun demikian, kalus pada ubi kayu genotipe Kuning mengalami organogenesis hingga membentuk tunas baru. Pembentukan organogenik ubi kayu genotipe Kuning terbanyak pada media yang mengandung zat pengatur tumbuh secara tunggal 2,4 D dan kinetin dengan konsentrasi yang sama 8 mg L⁻¹. Jenis eksplan juga berperan terhadap kecepatan terbentuknya kalus organogenik. Eksplan petiol lebih cepat membentuk kalus organogenik dibanding eksplan daun muda.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini I. 2014. Pengaruh BAP dan GA3 terhadap Multiplikasi Tunas Tanaman Singkong Gajah (*Manihot esculenta* Crantz) Melalui Kultur Meristem. Skripsi. Fakultas Pertanian, Universitas Jember, Jember.
- Abidin RR. 1990. Parenting Stress Index (PSI). Charlottesville, VA: Pediatric Psychology Press.
- Cacai GHT, Adoukonou-Sagbadja H, Kumulugui BS, Ovono PO, Houngue J & Ahanhanzo C. 2013. Eradication of Cassava (*Manihot esculenta*) Mosaic Symptoms Through Thermotherapy and Meristems Cultured in Vitro. *International Journal of Agronomy and Plant Production*. 4 (Special Issue): 3697-3701.
- Conger BV. 1980. Cloning Agricultural Plants via In Vitro Technique. CRC Press Inc. Florida. 11-22 p.
- Dinarti DU, Sayekti & Alitalia A. 2010. Kultur Jaringan Kantong Semar (*Nepenthes mirabilis*). *J. Hort. Indonesia*. 1(2): 59 - 65.
- Feitosa T, Bastos JLP, Ponte LFA, Juca TL, Campos FAP. 2007. Somatic Embryogenesis in Cassava Genotypes from The Northeast of Brazil. *Braz Arch Biol Technol*. 50(2): 201-206.
- Fletcher EKA, Amoako TNE, Twumasi P. 2011. Effect of 2,4-D, Explants Type and Cultivar on The Callogenesis Expression of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) in Ghana. *Afr J Biotechnol*. 10(46): 9396-9401.
- Gunawan LW. 1987. Teknik Kultur Jaringan. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi. IPB Bogor.
- Gunawan LW. 1995. *Teknik Kultur In Vitro dalam Hortikultura*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Hankoua BB, Taylor NJ, Ng SYC, Fawole I, Puonti-Kaerlas J, Padmanabhan C, ... & Fondong VN. 2006. Production of The First Transgenic Cassava in Africa via Direct Shoot Organogenesis from Friable Embryogenic Calli and Germination of Maturing Somatic Embryos. *African Journal of Biotechnology*. 5(19).
- Harjadi SS. 2009. *Zat Pengatur Tumbuh*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Hartati NS, Rahman N, Fitriani H & Sudarmonowati E. 2013. Koleksi Kultur In Vitro Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) Sebagai Material Perakitan Bibit Unggul. Dalam Sutanto RUMS, Soedjanaatmadja U, Supriatman T, & Panji (Eds.). Seminar Nasional Riset Pangan, Obat-obatan, dan Lingkungan untuk Kesehatan. Bogor 27-28 Juni 2013. 389-398.
- Hartati & Hartati NS. 2019. Potential of Yields and Starch Production from Several Local Cassava Genotypes. *Bioscience*. 3(1): 31-39.
- Hartmann HT, Kester DE & Davies FT. 1990. Plant Propagation Principles and Practices. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliff. New Jersey.
- Hendaryono IDPS & Wijayani IA. 1994. *Teknik kultur jaringan, pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman secara Vegetatif-Modern*. Kanisius.
- Hutami S, Mariska I, Purnamaningsih R, Herman M, Damayanti D & Utami IR. 2001. Regeneration of Papaya (*Carica papaya* L.) through Somatic Embryogenesis. Proc of the 2nd. Indonesian Biotechnology Conference. Indonesian Biotechnology Consortium.
- Indah PN & Ermavitalini D. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzeyla minopurine (BAP) dan 2,4-Dichloro-phenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2:16.
- Sari PK. 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.
- Khumaida N & Fauzi A.R. 2013. Induksi Tunas Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) var. Adira 2 Secara *In vitro*. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*. 41(2).
- Kuswara S. 2015. Teknik Pengelolaan Umbi-Umbian bagian 6: Pengelolaan Singkong. Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology (SEAFAST). Bogor Agricultural University.
- Loyola-Vargas VM & Vasques-Flota F. 2006. Plant cell culture protocols. In: Loyola-Vargas, V.M. and Vázquez-lota, F. (Eds). 2nd Methods in Molecular Biology 318. Humana press Inc. New Jersey: 3-8.
- Mardhiyetti ZS, Jamarun N & Suliansyah I. 2015. Pengaruh BAP (Benzil Adenin Purin) Dan Naa (Naphthalen Acetic Acid) Terhadap Eksplan Tanaman Turi (*Sesbania grandiflora*) dalam Media Multiplikasi *In Vitro*. *Pasture*. 5(1): 35-38.
- Mapayi EF, Ojo DK, Oduwaye OA & Porbeni JBO. 2013. Optimization of In Vitro Propagation of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Genotypes. *J Agric Sci*. 5(3): 261-269.
- Mushiyimana I, Hakizimana E, Gashaka G, Sallah PYK, Kalisa S, Gatunzi F, Asiiuwe T, Kahia J & Gahakwa D. 2011. Micro-Propagation of Disease resistant Cassava Variety in Rwanda. *Rwanda J*. 24: 49-57
- Nugroho CC. 2011. *Penambahan Kinetin dan Ca-P terhadap Multiplikasi Tanaman Ubi Kayu (Manihot esculenta Crantz.) Varietas Adira 2 dan Adira 4 secara In Vitro*. skripsi. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nugroho CC. 2014. *Studi embriogenesis dan organogenesis serta respon beberapa genotipe ubi kayu terhadap AlCl3*. Tesis. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nugroho CC. 2017. Induksi Kalus Embriogenik Beberapa Genotipe Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz.). *Jurnal Magrobis*. 17(1): 1-15.
- Ogero KO, Gitonga NM, Mwangi M, Ombori O & Ngugi M. 2012. Cost-Effective Nutrient Source for Tissue Culture of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *Afr. J. Biotechnol*. 11: 12964-12973.
- Onuoch CI & Onwubiku NIC. 2007. Micropropagation of Cassava (*Mannihot esculenta* Crantz) Using Different Concentrations of Benzyl Amino Purine (BAP). *J. Eng. Appl. Sci*. 2: 1229-1231.
- Pardal SJ. 2003. Perkembangan Penelitian Regenerasi dan Transformasi Pada Tanaman Kedelai. *Bul. Agrobio*. 5(2): 37-44.
- Purnamaningsih R. 2003. Regenerasi Tanaman melalui Embryogenesis Somatic dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Bul. Agrobio*. 5(2): 51-58.
- Rahayu B, Solichatun & Anggarawulan E. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*. 1(1): 1-6.
- Rossin CB & Rey MEC. 2011. Effect of Explants Source and Auxins on Somatic Embryogenesis of Selected Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar. *S Afr J Bot*. 77: 59-65.
- Sudarmonowati E, Hartati S & Taryana T. 2002. Produksi Tunas, Regenerasi dan Evaluasi Hasil Ubi Kayu (*Manihot esculenta*) Indonesia Asal Kultur Jaringan di Lapang. *Natur Indonesia*. 4(2): 96-108
- Sukmadjaja D & Widhiastuti H. 2011. Effects of Plant Growth Regulators on Shoot Multiplication and Root Induction of Cassava Varieties Culture In Vitro. *BIOTROPIA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology*. 18(1).
- Suyitno A & Henuhili V. 2010. Induksi Kalus dan Organogenesis Tanaman Ngukilo (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) dengan 2,4 D dan Kombinasi NAA - Air Kelapa secara *In Vitro*. Prosiding Seminar Nasional "Biology and Local Wisdom: Past, Present And Future": 56-67. Yogyakarta, 2 Juli 2011.
- USDA National Nutrient Data Base 2017. (Online), (<http://www.nutrition-andyou.com/cassava.html>), diakses 22 Agustus 2017).
- Wattimena GA, Gunawan LW, Mattjik NA, Syamsudin E, Wiendi NMA & Ernawati A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor : Institut Pertanian Bogor Press.
- Widaningsih R. 2015. Outlook Komoditas Pertanian Tanaman Pangan. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. Kementerian Pertanian.
- Wongtiem P, Courtois D, Florin B, Juchaux M, Peltier D, Broun P & Ducos, JP. 2011. Effects of Cytokinins on Secondary Somatic

- Embryogenesis of Selected Clone Rayong 9 of *Manihot esculenta* Crantz for Ethanol Production. *African Journal of Biotechnology*. **10**(9): 1600–1608.
- Zhang SP & Lemaux. 2004. Molecular Aspect of in Vitro Shoot Organogenesis in Plant Development and Biotechnology. CRC Press. New York.