

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Botani Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.)

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) merupakan tanaman pangan penting di dunia yang banyak diusahakan dan dikembangkan sebagai bahan makanan pokok di negara-negara Afrika, Amerika Latin, Asia serta negara-negara berkembang lainnya termasuk Indonesia. Tanaman ubi kayu diduga berasal dari Amazon, Brazil dan mengalami penyebaran yang luas ke India Barat, Asia Selatan dan juga Afrika pada abad ke-16 dan 17 (Odigboch, 1983).

Ubi kayu termasuk Familia Euphorbiaceae, genus *Manihot* dan terdapat kurang lebih 100 spesies yang termasuk genus *Manihot*, tetapi hanya satu yang dibudidayakan, yaitu *Manihot esculenta*. Jenis *Manihot esculenta* tidak dikenal dalam bentuk liarnya, tetapi diduga terdapat dua jenis yang merupakan tanaman asli, yaitu *Manihot saxicola* Lanj. dan *Manihot melanobasis* Muell. (Purseglove, 1974).

Menurut Benson (1957), kedudukan taksonomi ubi kayu adalah sebagai berikut :

Divisi : Spermatophyta
Subdivisi : Thalamiflorae
Klas : Angiospermae

- Subklas : Dicotyledoneae
Ordo : Euphorbiales
Familia : Euphorbiaceae
Genus : *Manihot*
Spesies : *Manihot esculenta* Crantz.

Penduduk Indonesia sudah mengenal ubi kayu sejak tahun 1810. Dua jenis ubi kayu yang dikenal dan ditanam pada waktu itu diberi nama *Jenderal* dan *Dangheur*. Nama ini diduga berasal dari kata *General* dan *Daendels*. Perkembangan nama ubi kayu selanjutnya tergantung pada bahasa daerah masing-masing, seperti *singkong*, *sampeau*, *budin*, *sele*, ketela, dan sebagainya (Wargiono, 1979).

Tanaman ubi kayu merupakan tanaman yang tumbuh liar, menyerupai semak belukar dengan ketinggian 1 - 3 meter, bahkan beberapa jenis dapat mencapai ketinggian menyerupai pohon. Batang ubi kayu berbentuk bulat dengan gabus sebagai intinya. Bakal tunas terdapat pada setiap pangkal tangkai daun dan tangkai daun yang telah gugur sering menimbulkan bekas berupa benjolan, sehingga sepintas batang ubi kayu tampak seperti berbuku-buku. Warna batang dapat dibedakan menjadi dua, yaitu gelap kecokelatan dan terang atau kelabu (Wargiono, 1979).

Daun ubi kayu berbentuk menjari dengan tiga variasi, yaitu panjang, elips dan melebar. Menurut Coursey dan Halliday (1974), daun ubi kayu berbentuk seperti tangan dengan 3 - 9 belahan daun. Daun umumnya berwarna hijau dan menampakkan variasi warna hijau tergantung dari jenis dan kandungan HCNnya. Ubi

kayu pahit memiliki warna daun sedikit lebih hijau dibandingkan dengan ubi kayu manis. Daun yang masih muda berwarna antara hijau kuning dan hijau ungu, dengan tangkai daun berwarna hijau, merah, kuning, atau kombinasi dari ketiga warna tersebut.

Bunga ubi kayu berwarna putih, hanya terjadi disetiap percabangan dan terjadi secara bertahap tergantung dari percabangan yang terbentuk. Menurut Onwueme (1978), pembungaan yang terjadi tergantung pada jenis ubi kayu. Jenis-jenis tertentu dapat berbunga secara teratur dan sering, tetapi pada jenis yang lain bunga sangat jarang atau bahkan tidak pernah dijumpai. Bunga ubi kayu berumah satu (*monocious*), bunga betina akan tumbuh dan mekar lebih dulu, diikuti bunga jantan satu bulan kemudian. Buah yang dihasilkan berbentuk kapsul, bulat, kotak tiga, berukuran 1 - 1.5 cm, berkulit keras dan dilengkapi dengan enam sayap kecil yang berbentuk longitudinal.

Ubi kayu mempunyai akar yang dapat menghasilkan umbi, yang secara ekonomis mempunyai arti penting sebagai bahan makanan, industri dan makanan ternak. Menurut Wargiono (1979), kulit ari umbi berwarna cokelat, kelabu atau kombinasi dari kedua warna tersebut. Kulit ari bagian dalam berwarna antara kuning merah dan putih dengan daging umbi berwarna putih dan kuning. Bentuk umbi ubi kayu bervariasi antara besar memendek dan kecil memanjang tergantung dari jenis, umur dan kondisi lingkungan pertumbuhan.

Tanaman ubi kayu termasuk tanaman tropis, tetapi dapat tumbuh dan berkembang baik di daerah subtropis. Daerah pertanaman ubi kayu terletak antara 12° Lintang Utara sampai 12° Lintang Selatan dengan batas ketinggian tempat 1.500 m dpl. Suhu minimum yang diperlukan adalah 10° C dengan kelembaban rata-rata 65 % dan curah tahunan optimum 760 - 1.015 mm. Pertumbuhan ubi kayu memerlukan cahaya dan panas yang cukup tinggi, dengan penyinaran penuh minimum 10 jam perhari. Penanaman ubi kayu di dataran tinggi hanya cocok untuk usaha pemuliaan tanaman dalam usaha mendapatkan biji sebanyak-banyaknya (Anonim, 1983).

Penanaman ubi kayu umumnya ideal dilakukan pada jenis tanah latosol, aluvial dan padosolik. Tanah dengan tipe mediteran, grumosol, andosol dan tanah bekas hutan masih jarang digunakan. Derajat keasaman tanah (pH) yang baik untuk pertumbuhan ubi kayu adalah minimum 5.0. Ubi kayu memerlukan tanah berstruktur gembur untuk perkembangan umbinya sehingga daerah yang tanahnya berat, berair dan pecah-pecah pada musim kering tidak cocok untuk tanaman ini (Anonim, 1983 dan Rukmana, 1997).

Jenis-jenis ubi kayu yang banyak diusahakan tergantung pada tujuan menanam, nisbah masukan keluaran serta keadaan tanah dan iklim setempat (Sostrosoedirjo dan Samad, 1985). Jenis-jenis ubi kayu yang biasa ditanam petani dapat dibedakan menjadi dua, yaitu klon manis dengan kadar HCN rendah yang terdiri atas Valenca (hasil introduksi dari Brazilia), Gading (hasil introduksi dari Jawa Barat), Ambon (asal Ambon) dan W-78 (hasil persilangan antara Mangi x Ambon). Klon pahit

dengan kadar HCN tinggi terdiri atas S.P.P (hasil introduksi dari Brazilia), Bogor (hasil persilangan Maleka x Bosirao), Muara (hasil persilangan antara Bogor x Bosirao), W-236 (hasil persilangan Mangi dan Ambon), klon Adira 1 dan 2 (hasil persilangan antara Mangi x Ambon) (Anonim, 1983).

II.2. Klon Adira-4

Klon Adira-4 merupakan klon pahit jenis unggul yang lebih dikembangkan ke sentra produksi tapioka dan masih sangat jarang dibudidayakan oleh petani lokal. Jenis ini berasal dari hasil persilangan bebas induk betina BIC-528 (muara). Umur mencapai 10.5 - 11.5 bulan dengan tinggi batang 1.5 - 2.0 meter. Daunnya berbentuk biasa yaitu menjari, agak lonjong, warna pucuk daun hijau, tangkai daun bagian atas berwarna merah kehijauan, sedangkan tangkai daun bagian bawah berwarna hijau kemerahan. Tulang daun berwarna merah muda pada bagian atas dan hijau muda pada bagian bawah (Kasim dan Djunainah, 1993).

Batang Adira-4 berwarna hijau ketika masih muda dan berubah menjadi abu-abu saat sudah tua. Kulit umbi bagian luar berwarna coklat dan ros dibagian dalamnya. Daging umbi berwarna putih dan terasa pahit (Kasim dan Djunainah, 1993).

II.3. Perbanyakan Tanaman Ubi Kayu

Tanaman ubi kayu dapat dikembangkan dan diperbanyak secara vegetatif maupun generatif. Perbanyakan secara generatif dilakukan dengan biji dan pada umumnya jarang dilakukan, mengingat biji yang dihasilkan sangat jarang dan terbatas hanya pada jenis-jenis tertentu saja. Perbanyakan dengan biji umumnya lambat, hanya dilakukan bila menghendaki hibrid baru dan bukan untuk tujuan produksi. Perbanyakan secara vegetatif yang umum dilakukan adalah dengan menggunakan stek batang (Wargiono, 1979).

Menurut Onwueme (1978), teknik perbanyakan secara cepat dapat dilakukan dengan mengembangkan teknik kultur *in vitro*. Eksplan tanaman ubi kayu dari potongan batang atau bagian lain dapat ditumbuhkan dan di multiplikasi dalam media tumbuh. Kumpulan massa sel yang dihasilkan kemudian dapat ditumbuhkan untuk menghasilkan tanaman lengkap dengan akar dan tunas dalam medium diferensiasi.

II.4. Teknik Kultur *In Vitro*

Kultur *in vitro* merupakan suatu usaha pengembangan tanaman secara vegetatif yang dapat dikatakan masih baru. Teknik ini berkembang dengan cepat menggantikan teknik vegetatif konvensional karena adanya tuntutan dalam hal penyediaan tanaman dalam jumlah besar, berkualitas unggul, bebas virus atau penyakit tanaman dan dalam waktu yang relatif singkat.

Kultur *in vitro* yang dalam bahasa asing sering disebut *tissue culture*, *weefsel cultuss* atau *gewebe kultur* adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan atau organ tanaman, kemudian menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali (Gunawan, 1988). Teknik *in vitro* ini secara sederhana dapat juga diartikan sebagai usaha untuk membudidayakan jaringan tanaman menjadi tanaman kecil yang mempunyai sifat seperti induknya (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Menurut Dodds dan Roberts (1982), prinsip dasar dari metode kultur *in vitro* ini adalah totipotensi sel yang dikemukakan oleh Schwann dan Schleiden pada tahun 1839. Teori totipotensi sel menyatakan bahwa bagian dari organisme multiseluler memiliki kemampuan berkembang secara independen menjadi tanaman sempurna jika ditumbuhkan pada lingkungan yang sesuai.

Penerapan metode kultur *in vitro* sebagai cara perbanyakan vegetatif yang berhasil harus memenuhi syarat-syarat awal, yaitu : (1) kecepatan organogenesis atau embriogenesis dapat menghasilkan tanaman seperti induknya, (2) planlet yang dihasilkan secara *in vitro* harus mampu bertahan selama pemindahan di lapangan dengan penampakan di lapangan seperti yang diharapkan atau bahkan lebih baik, (3) dapat memberikan keuntungan lebih dibandingkan sistem perbanyakan secara konvensional, misalnya bebas penyakit, waktu relatif singkat, harga relatif murah dan

(4) sifat-sifat atau karakteristik yang diinginkan harus dapat dipertahankan (Brown dan Somer, 1982).

Perbanyakan secara *in vitro* terutama ditujukan untuk mendapatkan tanaman dalam jumlah besar dalam waktu yang relatif singkat, yang memiliki sifat dan morfologi sama persis dengan induknya. Penerapan teknik ini juga diarahkan untuk tujuan produksi obat-obatan dan produk alami lainnya, memperbaiki sifat-sifat genetik tanaman, mendapatkan tanaman bebas virus dan penyakit lainnya serta untuk perbanyakan tanaman secara cepat pada beberapa varietas tanaman yang diseleksi (Murashige, 1974).

Menurut Gunawan (1984), teknik *in vitro* mempunyai dua kegunaan utama, yaitu pertama menghasilkan propagula yang bermutu dan kedua menghasilkan tanaman yang baik atau lebih unggul sesuai dengan program perbaikan sifat-sifat genotip dan fenotip yang dikehendaki. Keuntungan dari perbanyakan secara *in vitro* adalah cara ini dapat dilakukan secara terus menerus tanpa tergantung musim, bahan perbanyakan dapat disimpan dalam jangka waktu lama, tempat yang dibutuhkan kecil dan tanaman tidak memerlukan perawatan seperti pemupukan, pengairan ataupun penyemprotan pestisida.

Wattimena (1988) mengungkapkan bahwa terdapat tujuh keuntungan pembiakan menggunakan teknik *in vitro* ini, yaitu : (1) dapat menghasilkan bibit dalam jumlah yang banyak dan lebih cepat, (2) bebas dari hama dan penyakit termasuk virus dan mikoplasma, (3) tanaman-tanaman yang mengandung penyakit

astemik, seperti virus dapat dibebaskan dengan cara fisik (*heat treatment*) atau secara kimia, (4) tidak tergantung pada musim dan tidak merusak tanaman induk, (5) tidak tergantung dari induknya, bila telah memiliki tanaman yang tumbuh secara aseptik dapat digunakan sebagai bibit dasar, (6) mempermudah proses tukar menukar bahan secara nasional maupun internasional serta (7) tidak ada istilah tanaman langka.

Teknik kultur *in vitro* akan berhasil baik apabila syarat-syarat yang diperlukan terpenuhi seperti pemilihan eksplan, penggunaan medium yang sesuai, keadaan aseptik dan pengaturan udara yang baik terutama untuk kultur cair. Pertumbuhan dan organogenesis secara *in vitro* sangat tergantung pada zat pengatur tumbuh baik yang bersifat *endogenous* maupun yang ditambahkan ke dalam medium (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Menurut Wetter dan Constabel (1991), keberhasilan dalam metode *in vitro* terutama disebabkan pengetahuan yang baik tentang kebutuhan hara sel dan jaringan yang dikulturkan.

II.5. Sumber Eksplan

Bahan tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan untuk perbanyakan secara *in vitro* dapat berasal dari jaringan meristem tunas atau daun muda, kepala sari atau tepung sari, putik lembaga (*endosperm*), embrio, kotiledon atau hipokotil. Pemilihan jenis eksplan sangat tergantung pada masalah penelitian yang dihadapi dan bahan tanaman yang digunakan hendaknya disusun menurut aturan preferensi.

Jaringan muda umumnya cenderung membentuk kalus, termasuk bibit, tunas muda, kuncup, ujung akar atau embrio yang tumbuh (Wetter dan Constabel, 1991).

Pertumbuhan eksplan di dalam kultur dipengaruhi oleh organ yang digunakan sebagai eksplan, fisiologi dan ontogeni eksplan, ukuran eksplan, musim pada saat eksplan diambil dan keadaan tanaman yang diambil sebagai sumber eksplan (Murashige, 1974 dan Smith, 1992).

Menurut Mattjik (1996), umur tanaman pada masa pengambilan eksplan juga berpengaruh terhadap pertumbuhan regenerasi pada kultur *in vitro*. Tanaman berkayu yang sudah berumur lanjut, biasanya akan mengalami kesulitan jika digunakan sebagai sumber eksplan. Tanaman ini harus distek terlebih dahulu dan tunasnya dipakai sebagai sumber eksplan (*rejuvenilisasi*).

Ukuran eksplan merupakan faktor yang penting dalam keberhasilan kultur *in vitro*. Eksplan yang berukuran besar mengandung jumlah sel yang lebih banyak dibandingkan dengan yang kecil serta kemungkinan besar untuk hidup dan berkembang, tetapi kemungkinan eksplan untuk mengalami kontaminasi cenderung akan lebih tinggi (Junairiah, 1994).

Eksplan yang berupa tunas apikal atau mata tunas aksiler biasanya berukuran kurang lebih 2 cm (Hu dan Wang, 1981 dan George dan Sherrington, 1984). Eksplan yang berasal dari tunas aksiler yang sedang dalam tahap perkembangan, merupakan sumber inokulum yang baik dan dapat menghasilkan regenerasi yang optimum (Maslakhah, 1995).

II.6. Medium Kultur

Medium kultur memegang peranan penting dalam menentukan tingkat keberhasilan dari berbagai teknologi pengembangan sel tanaman, jaringan atau jaringan organ, terutama dalam hal pemilihan komponen nutrisi dan zat pengatur tumbuh. Medium kultur biasanya terdiri atas garam-garam inorganik, sumber karbon, vitamin dan zat pengatur tumbuh. Komponen lain juga dapat ditambahkan untuk kepentingan khusus, seperti nitrogen organik, asam organik dan ekstrak tanaman (Gamborg dan Phillips, 1995). Menurut Hartman dan Kester (1983), garam-garam inorganik yang ditambahkan merupakan sumber penyedia hara makro (N, P, K, Ca, Mg, Na) dan hara mikro (B, Co, I, Mn, Fe, Zn, Cu). Senyawa organik lain yang sering digunakan adalah gula sebagai sumber energi dan karbohidrat.

Komposisi media yang digunakan tergantung dari tujuan penerapan teknologi kultur *in vitro* yang akan dikembangkan dan spesies atau varietas tumbuhan yang digunakan. Media tumbuh yang umum digunakan terbagi atas media dasar dan media perlakuan. Media dasar biasanya mengandung hara makro, hara mikro, vitamin dan sumber energi (Junairah, 1994).

Media dasar Murashige dan Skoog (1962) atau Linsmaier dan Skoog (1965) paling banyak digunakan untuk berbagai macam kebutuhan, terutama untuk tujuan penelitian yang mengarah pada regenerasi tanaman. Medium B5, N6, Nitsch dan Nitsch (1969) juga merupakan medium dasar yang banyak digunakan untuk berbagai tanaman dengan tujuan yang berbeda. Medium Driver/Kuniyuki Walnut (DKW) dan

WPM lebih banyak digunakan untuk tanaman berkayu, sedangkan media Knudson, White, Vasin *and* Went khusus digunakan untuk tanaman anggrek, yang masing-masing media ini memiliki kandungan garam inorganik yang rendah (Mattjik, 1996).

Nutrisi organik yang sering ditambahkan ke dalam medium kultur adalah vitamin dan asam amino. Thorpe (1982) menyatakan bahwa penambahan vitamin dapat meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi kalus. Vitamin yang paling umum digunakan dalam kultur *in vitro* adalah tiamin. Penambahan tiamin dalam medium kultur dapat mempertinggi pertumbuhan dan diferensiasi tanaman. Asam nikotinat dan piridoksin juga sering ditambahkan ke dalam medium untuk mendorong pertumbuhan (Gamborg dan Phillips, 1995 dan Dodds dan Roberts, 1982).

Penambahan senyawa organik kompleks seperti *juice* tomat, *juice* jeruk, ekstrak ragi, kasein hidrolisat, air kelapa dan irisan-irisan pisang pada beberapa kasus dapat memberikan hasil yang lebih baik (Gunawan, 1988). Kasein hidrolisat mengandung campuran dari semua asam amino yang ada pada protein asli dan merupakan salah satu sumber asam amino campuran yang relatif murah, biasanya diberikan dalam konsentrasi 200 - 500 mg/l. Penambahan garam kalsium, sulfat, fosfat dan magnesium pada konsentrasi 1 - 3 mM juga cukup memadai (George dan Sherrington, 1984 dan Gunawan, 1988).

Sukrosa, glukosa dan beberapa jenis disakarida lainnya ditambahkan ke dalam medium sebagai sumber energi dan karbon bagi pertumbuhan eksplan. Menurut Dodds dan Roberts (1982), konsentrasi sukrosa yang ditambahkan ke dalam medium

selalu berkisar antara 20.000 - 45.000 mg/l dan hampir semua kultur menunjukkan pertumbuhan yang optimum dengan penambahan sukrosa ini.

Media kultur dapat berbentuk padat ataupun cair, tergantung dari tujuan penelitian. Media padat menggunakan agar sebagai bahan pematat. Penggunaan agar sebagai pematat terutama disebabkan oleh kemampuannya untuk meleleh ketika dipanaskan, dapat berubah menjadi gel semisolid pada temperatur ruang dan tidak menimbulkan reaksi biologis (Hartman *et al.*, 1990).

Derajat keasaman medium (pH) juga harus diperhatikan. Derajat keasaman medium (pH) biasanya berkisar antara 5.0 - 6.0 dan pH ini harus diatur dengan penambahan basa NaOH atau asam HCl. Medium dengan pH yang terlalu asam akan mengakibatkan agar kehilangan kepadatannya dan medium susah membeku, sedangkan pH yang terlalu basa akan mengakibatkan medium menjadi terlalu keras (Bhojwani dan Razdan, 1993).

II.7. Zat Pengatur Tumbuh

Pertumbuhan dan perkembangan eksplan dalam kultur *in vitro* dapat diatur dengan menambahkan zat pengatur tumbuh tertentu. Zat pengatur tumbuh yang digunakan umumnya tergantung dari jenis tanaman, tipe pertumbuhan dan perkembangan kultur yang diinginkan serta tujuan penelitian yang hendak dicapai (Gunawan, 1988).

Jenis-jenis zat pengatur tumbuh yang biasa digunakan dalam kultur *in vitro* adalah auksin, sitokinin, giberelin dan asam absisik. Auksin dan sitokinin secara bersama-sama sering ditambahkan ke dalam medium untuk proses morfogenesis (Smith, 1992). Menurut Salisbury dan Ross (1995), auksin secara alami diproduksi oleh tumbuh-tumbuhan, terutama pada meristem pucuk pada tajuk dan meristem pucuk pada akar. Jenis auksin ini disebut *Indole acetic acid* (IAA) dan dikenal sebagai auksin endogen.

Auksin dapat juga berupa auksin eksogen dan ditambahkan ke dalam medium untuk meningkatkan pertumbuhan sel. Menurut Hussey (1983) dan Torres (1989), auksin eksogen yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* antara lain 1 H-*Indole 3-acetic acid* (IAA), 1-*naphtalene acetic acid* (NAA), 1 H-*Indole-3-butyric acid* (IBA), 2,4 *dichlorophenoxy acetic acid* (2,4 D), 4 - CPA, (2,4,5-*trichlorophenoxy*) *acetic acid* (2,4,5-T), 3,6-*dichloro-2-methoxybenzoid acid* (dicamba) dan 4-*amino 3,5,6-trichloropicolinic acid* (pikloram). Penggunaan auksin ini cenderung lebih efektif pada konsentrasi rendah, yaitu berkisar antara 0.001 mg/l - 10 mg/l untuk merangsang pembesaran sel, pembesaran jaringan dan pembentukan kalus. Penggunaan auksin dengan konsentrasi tinggi akan menghambat pembentukan tunas aksiler, tunas adventif dan embriogenesis dalam kultur.

Auksin 2,4 D merupakan auksin sintesis yang tidak mempunyai ciri indol, tetapi mempunyai gugus asam asetat dengan keaktifan biologis seperti IAA (Wattimena, 1988). Auksin 2,4 D merupakan jenis auksin kuat, tidak dapat diuraikan di dalam

tubuh tanaman dan hanya dapat berkonyugasi dengan tanaman. Konsentrasi 2,4 D yang umum digunakan adalah antara 0.001 - 2 mg/l, konsentrasi tinggi hanya digunakan sebagai herbisida (Gunawan, 1995). Menurut Smith (1992), auksin 2,4 D digunakan secara luas dalam kultur *in vitro* untuk inisiasi kalus.

Raemakers *et al.* (1993) dan Konan *et al.* (1994) menyatakan bahwa pemberian 2,4 D pada kultur *cassava* atau ubi kayu mampu mendorong pertumbuhan dan perkembangan kalus serta perkembangan embrio somatik yang diharapkan sangat tergantung pada konsentrasi 2,4 D yang diberikan. Konsentrasi 0.1 mg/l 2,4 D tidak menghasilkan formasi embrioid, eksplan hanya membesar ukurannya serta membentuk akar. Morfologi abnormal dari embrio juga ditemukan pada semua konsentrasi 2,4 D.

Pikloram dalam konsentrasi rendah juga dapat digunakan sebagai auksin dalam kultur *in vitro*. Konsentrasi pikloram yang rendah cenderung lebih efektif dalam memacu pertumbuhan dan perkembangan sel dibandingkan dengan jenis auksin lainnya (Collins *et al.*, 1978).

Sitokinin merupakan turunan basa adenin yang memiliki peranan penting dalam pengaturan pembelahan sel, proliferasi tunas dan morfogenesis tunas (Smith, 1992). Sitokinin yang pertama ditemukan dalam kultur *in vitro* adalah kinetin (6-*furfuryl amino purine*) yang diisolasi di laboratorium *Strong University of Winconsin*. Kinetin ini diperoleh dari DNA ikan Herring yang diautoklaf dalam larutan asam. Kinetin merupakan zat yang dapat merangsang terjadinya

embriogenesis, meskipun kurang kuat untuk merangsang terjadinya pucuk (Gunawan, 1988).

Jenis sitokinin lain yang aktif adalah *benzil amino purine* (BAP) dan *thidiazuron* (TZD). Penelitian Konan *et al.* (1997) menunjukkan bahwa penambahan BAP pada medium dapat merangsang pertumbuhan tunas pada kultur ubi kayu, sedangkan Raemakers *et al.* (1993) menyatakan bahwa pemberian 2,4 D dan BAP bersama-sama pada kultur ubi kayu merangsang terjadinya pembentukan embrio.

II.8. Lingkungan Fisik Kultur

Regenerasi tanaman dipengaruhi oleh lingkungan kultur yang ada. Lingkungan fisik kultur dapat berupa cahaya atau penyinaran, panjang penyinaran, intensitas penyinaran, kualitas sinar, ukuran wadah kultur dan temperatur (Gunawan, 1995).

Cahaya sangat dibutuhkan untuk pengendalian perkembangan eksplan, pembentukan klorofil dan pengaturan proses morfogenesis tertentu seperti pembentukan tunas dan inisiasi akar (Murashige, 1974). Penyinaran kultur biasanya dilakukan menggunakan lampu fluorescent (TL) dengan intensitas berkisar antara 600 - 1000 lux. Penyinaran yang terlalu tinggi dapat menghambat pembentukan kalus yang terjadi (Gunawan, 1995).

Panjang pendeknya penyinaran yang diberikan pada kultur umumnya mengikuti kebutuhan cahaya tanaman di lapangan. Panjang penyinaran yang diberikan dapat bervariasi antara 10 - 24 jam. Menurut Murashige (1974), hasil terbaik diperoleh

dengan lama penyinaran 16 jam per hari untuk inisiasi tunas dan akar pada berbagai jenis tanaman.

Kualitas dan jenis cahaya yang digunakan dalam kultur juga memberikan hasil yang berbeda dalam regenerasi tanaman. Cahaya putih umumnya merupakan cahaya yang baik untuk pertumbuhan kultur, meskipun pada kasus-kasus tertentu pemberian cahaya lain seperti biru atau merah lebih merangsang pertumbuhan kultur. Menurut Gunawan (1995), cahaya biru yang diberikan pada kultur tembakau ternyata merangsang pertumbuhan tunas, sedangkan pemberian cahaya merah cenderung merangsang pertumbuhan akar yang terjadi.

Ukuran wadah yang dipergunakan dalam kultur juga mempengaruhi regenerasi dan jumlah regeneran yang terbentuk. Ukuran wadah yang besar menghasilkan regeneran lebih banyak dibandingkan dengan wadah kecil dalam periode kultur yang sama. Ukuran wadah mempengaruhi regenerasi tanaman, terutama untuk kultur melalui pembentukan tunas adventif dan pucuk aksiler.

Suhu ruangan kultur juga harus diatur untuk menghasilkan pertumbuhan yang optimal. Menurut Murashige (1974), suhu ruangan kultur biasanya berkisar antara 20° - 25° C, sehingga laboratorium kultur jaringan di negara-negara tropis harus dilengkapi dengan *air conditioner* agar suhu ruangan yang diinginkan tercapai. Pemakaian *air conditioner* pada laboratorium juga akan menjamin sirkulasi udara yang baik.

II.9. Regenerasi Tanaman

Regenerasi tanaman merupakan salah satu prasyarat penting dalam keberhasilan seleksi *in vitro* (Remotti dan Loffler, 1995). Regenerasi tanaman atau morfogenesis sel dapat dilakukan melalui dua jalur, yaitu morfogenesis langsung dan morfogenesis tidak langsung. Morfogenesis langsung terjadi apabila eksplan yang dikulturkan langsung berkembang membentuk organ tanaman berupa tunas, akar atau embrio, sedangkan morfogenesis tidak langsung diawali dengan pembentukan kalus (Andrini, 1993).

Kalus merupakan massa sel yang memiliki pusat-pusat proliferasi sel yang nantinya dapat berkembang menjadi nodul yang dapat membentuk tunas batang, akar atau embrio. Pusat-pusat proliferasi ini disebut sel-sel embriogenik (Beverdors dan Bingham, 1977). Menurut Gunawan (1988), kalus terdiri atas jaringan parenkim yang memiliki ikatan yang renggang dengan sel-sel yang lain. Pembentukan kalus dilakukan dengan penambahan auksin maupun sitokinin, tergantung dari jaringan yang digunakan sebagai eksplan.

Menurut Witherell (1982), pembentukan embrio dari sel-sel *non* seksual yang dikulturkan disebabkan oleh kacaunya pertumbuhan normal dan teratur dari eksplan oleh pemberian zat pengatur tumbuh dalam kadar cukup tinggi. Perubahan susunan zat pengatur tumbuh yang diberikan mengakibatkan sebagian sel-sel mulai memisah dan berubah menjadi embrioid dan bukannya akar atau tunas.

Proses pembentukan sel-sel embriogenik dari kalus dikenal dengan istilah embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik yang normal terdiri atas dua tahapan, yaitu : (1) tahap pembentukan kalus embriogenik yang terjadi karena adanya auksin dengan konsentrasi tinggi dan (2) tahap perkembangan massa yang bersifat embriogenik menjadi embrio dengan atau tanpa penambahan auksin dalam konsentrasi rendah (Thorpe, 1982). Menurut George dan Sherrington (1984), embrio somatik dapat diinduksi dari jaringan vegetatif seperti potongan daun, antera, polen, jaringan, atau sel dan tunas yang dihasilkan dikenal dengan tunas adventif.

Perkembangan kalus juga dapat langsung membentuk organ tanaman berupa tunas atau akar. Proses perkembangan ini dikenal dengan istilah organogenesis, yang dipengaruhi oleh perbandingan auksin dan sitokinin yang ditambahkan ke dalam medium (Andrini, 1993).

Organogenesis mengacu pada proses penginduksian pembentukan jaringan, sel atau kalus menjadi tunas dan tanaman sempurna (Wetter dan Constabel, 1991). Menurut Sukarni (1998), organogenesis juga dapat terjadi dalam dua jalur, yaitu organogenesis langsung tanpa melalui pembentukan kalus dan organogenesis tidak langsung yang terjadi melalui tahapan kalus untuk menghasilkan tunas. Thorpe (1982) menyatakan bahwa pembentukan tunas dan akar pada organogenesis langsung dapat terjadi bersamaan dalam medium kultur, tetapi hal ini jarang terjadi. Kalus umumnya akan diinduksi membentuk tunas, baru kemudian dipindahkan ke medium perakaran. Tunas yang dihasilkan dari proses ini disebut tunas adventif.

II.10. Aklimatisasi Tanaman

Aklimatisasi tanaman merupakan suatu proses adaptasi dan hal yang paling menentukan dalam keberhasilan produksi tanaman secara *in vitro*. Masa aklimatisasi diperlukan planlet untuk beradaptasi dengan kondisi lingkungan luar yang ekstrim, seperti kelembaban yang berkurang, temperatur yang lebih tinggi, intensitas cahaya yang lebih tinggi, perlu mengadakan proses fotosintesis sendiri serta adanya serangan hama dan penyakit (Gunawan, 1995).

Menurut Whetterel (1982), planlet hasil kultur *in vitro* umumnya mempunyai batang dan daun kecil-kecil akibat dari kemampuan fotosintesis yang rendah. Kutikula planlet juga amat tipis dan jaringan pembuluh yang ada belum tumbuh dengan sempurna. Hal ini mengakibatkan tanaman tersebut tidak tahan hidup di bawah cahaya matahari yang kuat dan kelembaban rendah di dalam rumah kaca.

Pelaksanaan kegiatan aklimatisasi hendaknya diusahakan sehati-hati mungkin untuk mengurangi stres pada tanaman. Sisa-sisa medium yang masih menempel pada akar sebaiknya dicuci terlebih dahulu untuk mengurangi terjadinya pertumbuhan mikroorganisme dalam media pot selama periode awal dari kondisi tidak steril. Media pot dibasahi terlebih dahulu dengan air agar akar tanaman tidak kekeringan. Pot-pot yang telah berisi planlet ditempatkan di tempat lembab, terlindung dari cahaya matahari dengan memberi sungkup dari bahan plastik untuk menjaga kelembaban tinggi disekeliling tanaman.

Menurut Gunawan (1995), temperatur aklimatisasi hendaknya berkisar antara 25°C - 28°C. Temperatur yang lebih tinggi dari 30°C dapat mengakibatkan kematian pada planlet. Proses aklimatisasi umumnya dilakukan selama 2 - 3 minggu, tergantung dari kondisi tanaman. Tanaman akan makin kuat dengan pengaturan intensitas cahaya dan kelembaban. Peningkatan intensitas cahaya dan penurunan kelembaban harus dilakukan secara bertahap dan hati-hati untuk menghindari kerugian akibat kematian tanaman. Planlet yang telah menunjukkan pertumbuhan dipindahkan ke bagian pembibitan dengan intensitas cahaya yang lebih tinggi. Tanaman yang telah kuat dan mampu beradaptasi baik dalam ruang pembibitan dapat dipindahkan ke lapangan untuk penanaman selanjutnya (Gunawan, 1995).

II.11. Kultur *In Vitro* Ubi Kayu (*Manihot esculenta*)

Kultur *in vitro* pada tanaman ubi kayu telah dikembangkan sejak 20 tahun yang lalu dan lebih diarahkan untuk memproduksi tanaman yang bebas virus untuk genotip-genotip tertentu (Konan *et al.*, 1997). Teknik ini berkembang sebagai bentuk aplikasi bioteknologi dan merupakan metode yang efektif untuk mengatasi permasalahan penyediaan bibit tanaman, tingkat keragaman jenis, virus dan penyakit tanaman (Anthony *et al.*, 1995).

Media dasar yang digunakan untuk kultur *in vitro* ubi kayu adalah medium Murashige dan Skoog (1962) dengan penambahan zat pengatur tumbuh auksin, sitokinin maupun giberelin. Menurut Raemakers *et al.* (1993), pengembangan ubi

kayu dengan teknik *in vitro* sangat tergantung pada genotip tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan.

Bhogwat *et al.* (1996) berhasil melakukan penggandaan tunas pada ubi kayu dengan menggunakan eksplan yang berasal dari nodus batang. Delapan genotip ubi kayu ditumbuhkan pada medium basal MS cair dengan penambahan *thidiazuron* (TZD) pada tahap awal, kemudian dipindahkan ke medium MS padat dengan penambahan 2.2 μM *benzyladenine* (BA) dan 1.6 μM asam giberelin (GA_3). Penambahan TZD mengakibatkan pembesaran meristem dan proliferasi sel meristem untuk membentuk batang dan tunas. Pertumbuhan eksplan juga terus berlangsung saat eksplan dikulturkan ke dalam medium dengan penambahan BA dan GA_3 . Multiplikasi tunas terjadi pada kisaran 31.5 tunas setelah 10 minggu usia kultur pada genotip CGI-56. Respon positif juga ditemukan pada ketujuh genotip lainnya. Konan *et al.* (1997) juga berhasil membuktikan bahwa penambahan BAP 10 mg/l pada medium MS mampu menginduksi tunas hingga mencapai 25 tunas per eksplan.

Penelitian dengan tujuan perbanyakkan melalui pembentukan tunas adventif juga telah dilakukan, meskipun tingkat keberhasilannya sangat dipengaruhi oleh genotip masing-masing ubi kayu. Pembentukan tunas adventif umumnya ditujukan untuk manipulasi genetik pada ubi kayu, walaupun pada genotip tertentu eksplan tidak mampu membentuk formasi embrioid.

Raemakers *et al.* (1993) telah berhasil melakukan serangkaian penelitian untuk melihat kemampuan perkembangan embrio somatik dari daun muda ubi kayu. Enam

genotip ubi kayu yang diuji, semuanya memiliki kemampuan membentuk embrio dengan frekuensi pembentukan yang berbeda dalam medium MS dengan penambahan 2,4 D, NAA dan BAP. Bentuk embrio somatik terbaik ditemukan pada genotif M.Col 22 dan Tjurug dengan penambahan 1-8 mg/l 2,4 D dan hanya satu dari 60 kultur yang mampu membentuk formasi embrio dengan penambahan 0.5 mg/l 2,4 D. Penambahan 2 - 40 mg/l NAA dengan atau tanpa 0.1 mg/l BAP meningkatkan pertumbuhan dan memperbesar ukuran kalus.

Pembentukan embrio somatik dari daun muda ubi kayu asal Afrika juga telah berhasil dilakukan. Enam belas kultivar ubi kayu dikulturkan dalam medium MS padat yang mengandung 4.0 mg/l 2,4 D mampu membentuk embrio somatik, meskipun hanya enam dari sepuluh kultivar yang berkembang lebih lanjut (Sudarmonowati dan Henshaw, 1993).

Penelitian Konan *et al.* (1994) dengan eksplan yang berasal dari kotiledon ubi kayu membuktikan bahwa penambahan 4 mg/l 2,4 D akan menghasilkan massa proembriogenik. Massa proembriogenik ini selanjutnya berkembang menjadi somatik embrio setelah dipindahkan pada medium yang mengandung NAA (0.01 mg/l) dan GA₃ (0.1 mg/l).

II.12. Hipotesis Penelitian

1. Teknik kultur *in vitro* dapat digunakan untuk menghasilkan planlet ubi kayu dalam jumlah besar dan waktu yang relatif singkat, yaitu kurang dari 10-14 bulan.

2. *Benzyl amino purine* (BAP) pada konsentrasi tertentu akan mampu menginduksi dan menggandakan tunas aksiler.
3. Zat pengatur tumbuh IBA yang ditambahkan ke dalam medium basal MS akan mampu menginduksi perakaran tunas, sehingga menghasilkan planlet yang mampu bertahan hidup sampai akhir proses aklimatisasi.
4. Penggunaan *2,4 Dichlorofenoksi acetic acid* (2,4 D) dan pikloram pada konsentrasi tertentu di dalam medium kultur daun muda ubi kayu akan mampu menginduksi kalus pada ubi kayu.
5. Konsentrasi zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin tertentu yang ditambahkan ke dalam medium kultur daun mampu merangsang terjadinya embriogenesis dan tunas adventif.