

**INDUKSI TUNAS MAJEMUK UBI KAYU *IN VITRO* TINGGI *B-CAROTENE*
GENOTIP MENTEGA 2 DAN UBI KUNING ASAL REGENERAN DARI
EMBRIO SOMATIK BERDASARKAN VARIASI KONSENTRASI CuSO₄**

Hani Fitriani^{1*}, Nurhamidar Rahman¹, N. Sri Hartati¹

¹Pusat Penelitian (Puslit) Bioteknologi, LIPI

Jl. Raya Bogor KM 46, Cibinong, Telp. 021-8754587

*Penulis untuk korespondensi: hfitriani76@yahoo.com

ABSTRACT

CuSO₄ is an essential micronutrient for normal plant growth and the development because it has various functions such as cofactors of many important enzyme in respiration, photosynthesis and electron transport, and formation of amino acids such as cysteine and methionine. This study was carried out to investigate the best effect of level CuSO₄ on induction of compound shoot of regenerant cassava. The research conducted since January-February 2017, at the Laboratory of Plant Molecular Genetics and Biosynthetic Pathway Alteration, LIPI. Material used is regenerant cassava of somatic embryo from genotype Mentega 2 and Ubi Kuning and as control is shoot cassava *in vitro* from the same genotype. Shoot induction medium is Murashige & Skoog (MS) supplemented with 0.4 mg L⁻¹ Benzil Adenine Phosfat (BAP) and different concentration of CuSO₄. The level of CuSO₄ used were 0 uM (CEM 0), 2 uM (CEM 2), and 4 uM (CEM 4). The result showed that CuSO₄ stimulated plant growth especially number of shoot from regenerant and control. Higher level CuSO₄ had effect on formation of shoot longer but the number of shoot increased. Otherwise on control, level CuSO₄ decreased was most effective for number of shoot but the longest formation of shoot. The medium induction of shoot with 4 uM CuSO₄ produces the highest number of shoot for regenerant (genotype Mentega 2 and Ubi Kuning). Meanwhile, the best result number of shoot on control was obtained by using CuSO₄ at 2 uM. Application of the research result will give positive effect on efficiency propagation of *in vitro* culture of cassava, especially from regenerant as superior seed candidates.

Keywords: Cassava, CuSO₄, induction of compound shoot, regenerant

ABSTRAK

CuSO₄ merupakan mikroelemen yang penting bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman karena memiliki berbagai fungsi diantaranya adalah kofaktor beberapa enzim dalam proses respirasi, fotosintesis dan transport elektron, serta pembentukan asam amino seperti sistein dan metionin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat konsentrasi CuSO₄ untuk menghasilkan induksi tunas majemuk yang terbaik pada ubi kayu regeneran. Penelitian dilaksanakan sejak Januari sampai Februari 2017, di Laboratorium Genetika Molekuler dan Modifikasi Jalur Biosintesis Tanaman Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Material yang digunakan adalah ubi kayu *in vitro* hasil regenerasi embrio somatik dari genotip Mentega 2 dan Ubi Kuning yang disebut tanaman regeneran serta sebagai kontrol adalah tunas ubi kayu *in vitro* dari genotip yang sama. Media induksi tunas majemuk adalah Murashige & Skoog

(MS) yang ditambahkan zat pengatur tumbuh (ZPT) BAP 0.4 mg L⁻¹ dan berbagai konsentrasi CuSO₄ yang berbeda. Tingkatan konsentrasi CuSO₄ yang digunakan yaitu 0 uM (CEM 0), 2 uM (CEM 2), dan 4 uM (CEM 4). Hasil penelitian menunjukkan bahwa CuSO₄ berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman terutama pembentukan tunas-tunas baru pada ubi kayu regeneran maupun kontrol. Pembentukan tunas baru pada tanaman regeneran lebih lama saat konsentrasi CuSO₄ ditingkatkan tapi jumlah tunas baru yang terbentuknya lebih banyak. Sebaliknya pada tanaman kontrol pada genotip Mentega 2 dan Ubi Kuning, pembentukan tunas lebih cepat ketika tingkat konsentrasi CuSO₄ ditingkatkan, namun jumlah tunas baru yang dihasilkan lebih sedikit. Konsentrasi CuSO₄ sebesar 4 uM menghasilkan jumlah tunas paling banyak untuk tanaman regeneran baik genotip Mentega 2 ataupun Ubi Kuning. Sedangkan, 2 uM CuSO₄ pada tanaman ubi kayu kontrol untuk kedua genotip yang diuji dapat membentuk tunas baru yang lebih banyak. Diharapkan dari hasil penelitian ini akan memberikan dampak positif pada perbanyak kultur *in vitro* ubi kayu terutama regeneran sebagai kandidat bibit ubi kayu unggul.

Kata kunci: CuSO₄, induksi tunas majemuk, regeneran, ubi kayu

PENDAHULUAN

Keberhasilan teknik kultur jaringan ditentukan di antaranya oleh sumber eksplan yang sesuai, komposisi media, zat pengatur tumbuh (ZPT) serta kandungan hara makro maupun mikro yang terdapat di dalam media kultur. Pada umumnya media dasar yang digunakan adalah media Murashige & Skoog (MS) yang mengandung unsur hara makro, terutama nitrogen dan amonium; serta hara mikro seperti Boron, seng, *cobalt chloride* ataupun *copper sulphate*.

CuSO₄ merupakan mikroelemen yang penting bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman karena memiliki berbagai fungsi di antaranya adalah kofaktor enzim dalam proses respirasi, fotosintesis dan transpor elektron (Yruela, 2005), serta pembentukan asam amino seperti sistein dan metionin (Bhojwani & Dantu, 2013). Pada konsentrasi yang sesuai, CuSO₄ bersifat menguntungkan bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman, namun pada konsentrasi yang berlebihan dapat bersifat toksik. Setiap tanaman memiliki resistensi terhadap Cu yang berbeda-beda, seperti pada *Brassica pekinensis* dimana batas maksimal resistensinya 2 µM (Xiong and Wang, 2005), *Chloris gayana* (2.06 µM) (Sheldon & Manziés, 2004) dan *Musa acuminata* (100 µM) (Deo & Nayak, 2011). Konsentrasi Cu berlebih pada tanaman dapat menyebabkan deformasi struktur akar, kerusakan pada kutikula akar dan meristem akar (Deo & Nayak, 2011; Sheldon & Menziés, 2004), serta menghambat proses fotosintesis dan sintesis pigmen, kerusakan permeabilitas membran plasma dan juga gangguan metabolik lainnya, baik pada tanaman lapangan (Lanaras *et al.*, 1993; Ouzounidou *et al.*, 1993) atau tanaman *in vitro* (Gori *et al.*, 1998; Romeu-Moreno & Mas, 1999).

Ubi kayu merupakan tanaman perdu *monoecious* (berumah satu) dengan bunga betina mekar 10-14 hari sebelum bunga jantan pada cabang yang sama (Ceballos *et al.*, 2010). Ubi kayu merupakan salah satu sumber karbohidrat yang berasal dari umbi, karbohidrat yang dihasilkan lebih tinggi 40% dibanding beras dan 25% lebih tinggi dibanding jagung. Komposisi umbi pada ubi kayu terdiri atas air 70%, tepung 24%, serat 2%, protein 1% dan senyawa lain 1% (Tonukari, 2004).

Pada penelitian sebelumnya, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI telah melakukan seleksi untuk mendapatkan kandidat bibit ubi kayu unggul, terutama bibit ubi kayu unggul yang memiliki potensi nutrisi tinggi seperti ubi kayu Mentega 2 dan ubi kayu Kuning yang keduanya tinggi akan β -carotene (Hartati *et al.*, 2012; Priadi *et al.*, 2009), sehingga dapat meningkatkan nilai gizi dari konsumsi ubi kayu. β -carotene dikenal juga dengan provitamin A yang merupakan antioksidan yang berfungsi untuk melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas dan sangat bermanfaat bagi kesehatan manusia terutama berkaitan dengan indera penglihatan.

Salah satu faktor utama yang menentukan keberhasilan dalam perbanyakan kultur jaringan adalah munculnya tunas baru dari eksplan tanaman atau kalus (Grozeva, 2015). Beberapa penelitian mengenai induksi tunas dengan perlakuan penambahan CuSO_4 ke dalam media kultur telah banyak dilakukan pada tanaman dikotil maupun monokotil seperti tanaman *sweet orange* dan *Eleusine coracana* L. (Niedz & Evens, 2007; Kothari-Chajer *et al.*, 2008). Namun, masih belum diketahui pengaruh penambahan CuSO_4 pada media kultur terhadap pembentukan tunas majemuk ubi kayu lokal Indonesia asal regenerasi. Berdasarkan penelitian Ngugi *et al.* (2015), didapatkan hasil bahwa terdapat pengaruh penambahan CuSO_4 pada media kultur untuk tanaman ubi kayu. Akan tetapi berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh N. Sri Hartati *et al.* (2012) tidak ditemukan adanya pengaruh dari penambahan CuSO_4 pada media kultur ubi kayu genotipe Apuy. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui komposisi media dengan penambahan CuSO_4 yang optimal untuk menghasilkan induksi tunas majemuk yang terbaik pada ubi kayu lokal Indonesia terutama ubi kayu tinggi beta karoten. Diharapkan dari hasil penelitian ini akan membantu untuk tahap perbanyakan bibit ubi kayu unggul hasil regenerasi embrio somatik.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan sejak Januari sampai Februari 2017, di Laboratorium Genetika Molekuler dan Modifikasi Jalur Biosintesis Tanaman (*Laboratory of Plant Molecular Genetics and Biosynthetic Pathway Alteration*) Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Material yang digunakan adalah ubi kayu *in vitro* hasil regenerasi embrio somatik dari genotip Mentega 2 dan Ubi Kuning yang disebut tanaman regenerasi serta sebagai kontrol adalah tunas ubi kayu *in vitro* dari genotip yang sama yaitu Mentega 2 dan Ubi Kuning. Media induksi tunas majemuk adalah Murashige & Skoog (MS) yang ditambahkan zat pengatur tumbuh (ZPT) BAP 0.4 mg L^{-1} dan berbagai konsentrasi CuSO_4 yaitu 0 uM (CEM 0), 2 uM (CEM 2), dan 4 uM (CEM 4). Komposisi dari tiap media perlakuan dapat dilihat pada tabel 1.

Setiap media perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, sehingga untuk setiap media perlakuan terdapat 3 ulangan. Eksplan disimpan dalam ruang inkubasi dengan intensitas cahaya 1000 lux , suhu ruang $25 \text{ }^\circ\text{C}$ dan kelembaban 45% . Parameter yang diamati adalah saat muncul tunas (Hari Setelah Tanam, HST) dan jumlah tunas.

Tabel 1. Komposisi media perlakuan

Komposisi	Media			
	MS	CEM 0	CEM 2	CEM 4
Makro (mL L^{-1})	50	50	50	50
Mikro (mL L^{-1})	2	2	2	2
Vitamin (mL L^{-1})	10	10	10	10
NaFeEDTA (mL L^{-1})	10	10	10	10
<i>Myo</i> -inositol (mg L^{-1})	50	50	50	50
Sukrosa (g L^{-1})	40	40	40	40
Agar (g L^{-1})	8	8	8	8
BAP ($\mu\text{L L}^{-1}$)	-	400	400	400
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (mL L^{-1})	-	-	1	2
Ph		5,81		

Data hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan *One Way* ANOVA dengan signifikansi 0.05 untuk melihat ada tidaknya perbedaan yang nyata dari tiap media perlakuan yang diberikan terhadap perbanyakan tanaman ubi kayu Mentega 2 dan ubi kayu Kuning.

HASIL

Waktu Terbentuknya Tunas Baru

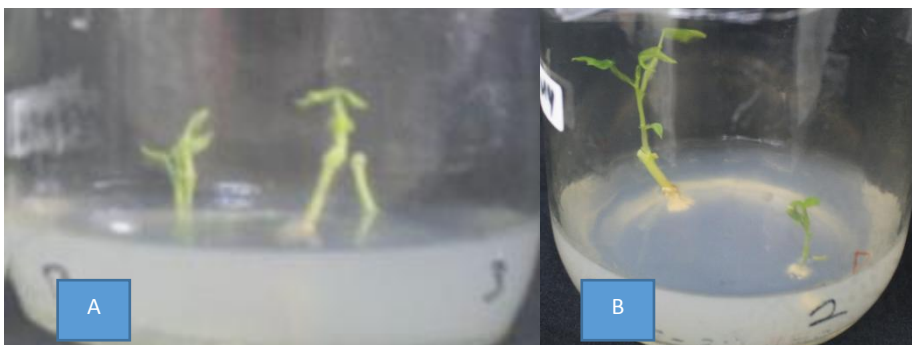
Secara umum untuk semua genotip ubi kayu, pembentukan tunas terjadi pada semua jenis media perlakuan baik pada tanaman regeneran maupun kontrol. Tunas baru yang terbentuk pada tanaman regeneran baik Mentega 2 maupun Ubi Kuning adalah sama lebih lama terbentuk tunasnya yaitu sekitar 12-14 hari setelah tanam (HST) daripada tanaman kontrolnya dengan genotip yang sama yaitu sekitar 10-12 HST. Untuk tanaman ubi kayu regeneran dari dua genotip ubi kayu yang diuji, pembentukan tunas baru dipengaruhi oleh konsentrasi CuSO_4 , semakin tinggi konsentrasi CuSO_4 semakin lama terbentuknya tunas-tunas baru (Tabel 2). Sebaliknya, pembentukan tunas baru pada tanaman ubi kayu kontrol baik Mentega 2 ataupun Ubi Kuning akan lebih cepat dengan meningkatnya konsentrasi CuSO_4 .

Tabel 2. Waktu terbentuknya tunas baru pada tanaman ubi kayu kultur *in vitro* tunas pucuk dan regeneran di berbagai perlakuan

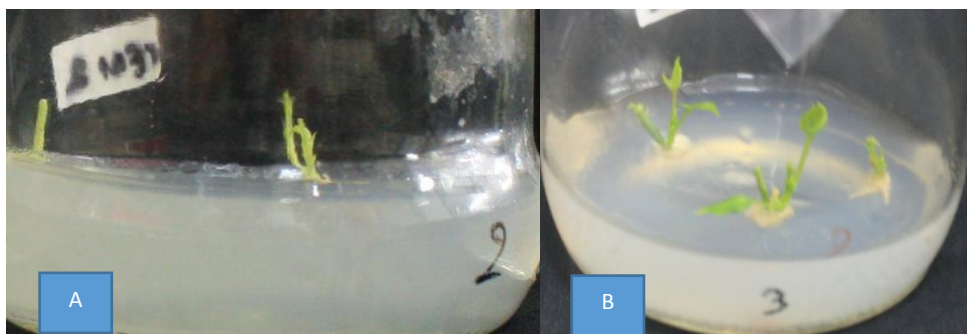
	Jenis media			
	MS	CEM 0	CEM 2	CEM 4
Ubi Kuning regeneran	-	12 HST	10 HST	14 HST
Mentega 2 regeneran	-	-	12 HST	14 HST
Ubi kuning (tunas <i>in vitro</i>)	-	12 HST	10 HST	10 HST
Mentega 2 (tunas <i>in vitro</i>)	-	10 HST	10 HST	10 HST

Induksi Tunas Majemuk

Pertambahan jumlah tunas baru tertinggi pada tanaman regeneran baik Mentega 2 maupun Ubi Kuning adalah sama banyaknya sekitar 2 tunas selama 15 hari pengamatan pada konsentrasi CuSO_4 sebesar 4 μM (Gambar 1). Sedangkan pada tanaman kontrol pada kedua genotip yang diuji tertinggi yaitu 2 tunas selama 15 hari pengamatan pada konsentrasi 2 μM CuSO_4 (data tidak ditampilkan) (Gambar 2). Formulasi media dengan penambahan CuSO_4 yang optimal untuk eksplan regeneran (genotip Mentega 2 maupun Ubi Kuning) dan tanaman kontrol dengan genotip yang sama memiliki perbedaan pada tingkat konsentrasi CuSO_4 . Komposisi media induksi tunas majemuk dengan konsentrasi 4 μM CuSO_4 merupakan media yang optimal untuk pembentukan tunas-tunas baru dimana jumlah tunas baru yang terbentuk lebih banyak jika dibandingkan dengan konsentrasi CuSO_4 lainnya pada ubi kayu asal regeneran. Sedangkan pada tanaman kontrol memerlukan konsentrasi CuSO_4 lebih rendah yaitu 2 μM untuk menghasilkan jumlah tunas yang lebih banyak.



Gambar 1. Jumlah tunas baru yang terbentuk pada tanaman ubi kayu hasil regenerasi dari embrio somatik di media induksi tunas majemuk dengan penambahan 4 μM CuSO_4 saat umur 15 hari setelah tanam (HST), A. Mentega 2 dan B. Ubi Kuning



Gambar 2. Jumlah tunas baru yang terbentuk pada tanaman ubi kayu kontrol *in vitro* di media induksi tunas majemuk dengan penambahan 2 μM CuSO_4 saat umur 15 hari setelah tanam (HST), A. Mentega 2 dan B. Ubi Kuning

Pada Tabel 3 terdapat korelasi positif pada $P \leq 0.05$ antara media dengan sumber eksplan yaitu tanaman ubi kayu regeneran maupun tanaman kontrol yang menunjukkan respon yang sama, yaitu jumlah tunas majemuk yang terbentuk akan meningkat jika ke dalam media kultur tersebut diberikan 2 μM CuSO_4 . Sementara itu, pada tanaman kontrol terdapat korelasi positif ($P \leq 0.01$) yang menunjukkan adanya peningkatan jumlah tunas-tunas baru yang terbentuk

jika ke dalam media induksi tunas majemuk tersebut ditambahkan 2 uM CuSO₄ ataupun tidak.

Tabel 3. Korelasi antara media perlakuan terhadap jumlah tunas yang terbentuk

	MS R	CEM 0R	CEM 2R	CEM 4R	MS TP	CEM 0TP	CEM 2TP	CEM 4TP
MS TP	. ^a	. ^a	. ^a	. ^a	. ^a			
CEM 0 T	. ^a	.426 ^{ns}	-.213 ^{ns}	.250 ^{ns}	. ^a	1		
CEM 2 T	. ^a	-.197 ^{ns}	.592 [*]	-.231 ^{ns}	. ^a	-.285 ^{ns}	1	
CEM 4 T	. ^a	.255 ^{ns}	-.357 ^{ns}	.239 ^{ns}	. ^a	.598 ^{**}	-.147 ^{ns}	1

Keterangan: T= tunas *in vitro*, R= regeneran, angka yang diikuti dengan ns adalah tidak berbeda nyata pada $P \geq 0.05$. Angka yang diikuti dengan * dan ** menunjukkan berbeda nyata masing-masing pada $P \leq 0.05$ dan $P \leq 0.01$

PEMBAHASAN

Menurut George *et al.* (2007), media kultur berperan penting dalam pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro*. Sama seperti yang dikemukakan oleh Niedz and Evans (2007) bahwa jenis media kultur, konsentrasi nutrisi akan mempengaruhi kecepatan pertumbuhan *in vitro*, pemanjangan dan kualitas morfogenesisnya. Faktor lainnya yang turut menentukan terhadap keberhasilan kultur *in vitro* tanaman adalah kesesuaian eksplan yang dikultur dan medium yang digunakan. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh terlihat bahwa asal sumber eksplan memberikan respon yang berbeda terhadap media perlakuan.

Cu yang diberikan ke dalam media kultur dalam bentuk CuSO₄ merupakan salah satu komponen penting yang berperan dalam pembentukan tunas. Hal ini dikarenakan, Cu sebagai aktivator beberapa enzim penting yang terlibat dalam transfer elektron, protein, biosintesis karbohidrat, dan metabolisme polifenol (Al-Mayahi, 2014). Penambahan CuSO₄ ke dalam media induksi tunas majemuk untuk ubi kayu dengan beragam konsentrasi memberikan pengaruh yang berbeda terhadap jumlah tunas-tunas baru yang terbentuk. Untuk eksplan asal regeneran memerlukan konsentrasi CuSO₄ yang lebih tinggi untuk menghasilkan jumlah tunas-tunas baru yang terbentuk lebih banyak dibandingkan tanaman kontrol. Hal ini mengindikasikan bahwa Cu merupakan salah satu mikroelemen penting bagi pertumbuhan tanaman, sehingga kecepatan pertumbuhan dari suatu tanaman dan kualitas respon morfogenik dari tanaman sangat bergantung pada ketersediaan dan jenis nutrisi yang ada pada media (Niedz & Evens, 2007).

Pertumbuhan pada tanaman ubi kayu regeneran akan optimal terutama pertambahan tunas-tunas baru jika ditanam di media induksi tunas dengan konsentrasi CuSO₄ sebesar 4 uM, sebaliknya pada tanaman kontrol ditanam di media induksi tunas dengan konsentrasi yang lebih rendah sekitar 2 uM. Perbedaan tingkat konsentrasi CuSO₄ tersebut kemungkinan terkait dengan tingkat respirasi dari tanaman regeneran yang lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrol. Al-Mayahi (2014) menyatakan bahwa respirasi pada sel tanaman akan lebih tinggi selama proliferasi kalus dan pembelahan sel untuk menghasilkan energi yang dibutuhkan. Oleh karena itu, pada sebagian besar jenis tanaman Seperti *barley*, gandum, triticale dan tembakau, pembentukan tunas dari hasil regenerasi embriogenesis somatik lebih banyak ketika media induksi tunas tersebut ditambahkan CuSO₄ dengan konsentrasi tinggi dibandingkan MS0 maupun tingkat konsentrasi Cu yang lebih rendah (Dahleen, 1995; Purnhauser &

Gyulai, 1993). Mikronutrient terutama Cu berperan penting dalam proses respirasi. Oleh karena itu, ketersediaan Cu di media dengan konsentrasi yang sesuai akan memberikan dampak positif pada morfogenesis *in vitro* dan ketersediaan yang berlebih akan memberikan efek negatif (Jain *et al.*, 2009). Hal tersebut sesuai dengan Al-Mayahi (2014) yang menyatakan pemberian CuSO₄ pada media kultur dapat meningkatkan laju regenerasi dan pertumbuhan dari tunas karena CuSO₄ merupakan komponen penting dalam metabolisme sel. Namun pemberian logam berat yang berlebih akan menyebabkan terjadinya akumulasi berlebih pada jaringan tanaman, yang akan berdampak pada terjadinya perubahan pada beberapa proses fisiologis seperti transpirasi, fotosintesis, sistem transport elektron dan biosintesis klorofil serta integritas membran sel (Hussein *et al.*, 2010). Lenartowics *dalam* Kowalska *et al.* (2012) berpendapat bahwa tanaman memiliki mekanisme kontrol secara genetika untuk mengatur level konsentrasi CuSO₄ di dalam sel tanaman itu sendiri yang dapat diterima.

Pembentukan tunas majemuk tidak terjadi pada media MS karena tidak terdapat hormon pertumbuhan pada media MS tersebut dan tidak adanya penambahan CuSO₄, sehingga tidak terjadi induksi tunas baru. Penambahan hormon pertumbuhan, terutama sitokinin pada media dapat memicu munculnya tunas baru, karena sitokinin berperan dalam pembelahan sel, modifikasi dominansi tunas apikal dan diferensiasi tunas (Bhojwani & Dantu, 2013). BAP merupakan salah satu hormon sitokinin yang paling baik untuk melakukan perbanyakan tunas (Bohidar *et al.*, 2008). Selain hormon pertumbuhan, unsur anorganik pada media juga berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan dari eksplan karena unsur anorganik bersifat esensial untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman, salah satunya adalah tembaga (Cu) yang memiliki peranan penting dalam fungsi fisiologis dan biokimia (Al-Mayahi, 2014).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, pengaruh tingkat konsentrasi CuSO₄ terhadap waktu pembentukan tunas maupun jumlah tunas baru yang terbentuk tidak dipengaruhi oleh genotip ubi kayu. Akan tetapi, perbedaan tingkat konsentrasi CuSO₄ terhadap pertumbuhan tanaman dipengaruhi oleh asal sumber eksplan yaitu regenerasi atau tunas *in vitro* (kontrol). Pembentukan tunas baru pada tanaman regenerasi lebih lama saat konsentrasi CuSO₄ ditingkatkan tapi jumlah tunas baru yang terbentuknya lebih banyak. Sebaliknya pada tanaman kontrol pada genotip Mentega 2 dan Ubi Kuning, pembentukan tunas lebih cepat ketika tingkat konsentrasi CuSO₄ ditingkatkan, namun jumlah tunas baru yang dihasilkan lebih sedikit. Konsentrasi CuSO₄ sebesar 4 uM menghasilkan jumlah tunas paling banyak untuk tanaman regenerasi baik genotip Mentega 2 ataupun Ubi Kuning. Sedangkan, 2 uM CuSO₄ pada tanaman ubi kayu kontrol untuk kedua genotip yang diuji dapat membentuk tunas baru yang lebih banyak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Supatmi atas bantuannya dalam menganalisis data serta Stefanus Junliem Nugratama Herina, Muhamad Usen, dan Suwinaryani atas bantuan teknis di laboratorium dan di lapangan. Penelitian

ini merupakan bagian dari kegiatan DIPA Tematik Puslit Bioteknologi LIPI tahun anggaran 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Mayahi, A.M.W. 2014. Effect of copper sulphate and cobalt chloride on growth of The in vitro culture tissue for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) CV. Ashgar. American Journal of Agricultural and Biological Science. 9(1): 6-18.
- Bhojwani, S.S., P.K. Dantu. 2013. Plant tissue culture: An introductory text. India, Springer International Publishing.
- Bohidar, S., M. Thirunavoukkrasu, T.V. Rao. 2008. Effect of plant growth regulator on in vitro micropropagation of 'garden rue' (*Ruta graveolens* L.). International Journal of Integrative Biology. 3(1): 36-43.
- Ceballos, H., E. Okogbenin, J.C. Perez, A.B. Lopez-Valley, D. Debouck. 2010. Cassava. *dalam*: Bradshaw, J.E. 2010. Handbook of plant breeding: Root and tuber crops. New York, Springer.
- Dahleen, L.S. 1995. Improved plant regeneration from barley callus culture by increased copper levels. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 43: 267-269. DOI: 10.1007/BF00039954.
- Deo, B., P.L. Nayak. 2011. Studi of copper phytotoxicity on in vitro culture of *Musa acuminata* cv. 'Bantala'. Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development. 3(8): 136-140.
- George, E.F., M.A. Hall, G.J. De Klerk. 2007. Plant propagation by in vitro culture. 3rd edition: Volume 1, The Background, Exegetic, Basingstone, UK.
- Gori, P., S. Schiff, G. Santandrea, A. Bennici. 1998. Response of in vitro cultures of *Nicotiana tabacum* L. to copper stress and selection of plants from copper-tolerant callus. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 53: 161-9.
- Grozeva, S. 2015. Effect of copper levels in the culture medium on shoot regeneration in pepper. Banat's Journal of Biotechnology. 12: 86-91.
- Hartati, N.S, H. Fitriani, Supatmi, E. Sudarmonowati. 2012. Karakter umbi dan nutrisi tujuh genotipe ubi kayu. Jurnal Agricola. 2(2):101-110.
- Hussein, K., K.K Sahadevan, N. Salim. 2010. Bioaccumulation and release of mercury in *Vigna mungo* (L.) hepper seedlings. J. Stress Phys. Biochem. 6: 56-63.
- Jain, P., S. Kachhwaha, S.L. Kothari. 2009. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high copper level in the culture medium. Scientia Horticulturae. 119: 315-319.
- Kothari, S.L., K. Agarwal, S. Kumar. 2004. Inorganic nutrient manipulation for highly improved in vitro plant regeneration in finger *millet-Eleusine coracana* (L.) Gaertn. In Vitro Cell Dev Biol-Plant. 40:515-519.
- Lanaras, T., M. Moustakas, L. Symeonidis, S. Diamantoglou, S. Karataglis. 1993. Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. Physiol. Plant. 88: 307-14.
- Lenartowicz, M. 2002. Genetyczna regulacja transportu i metabolizmu miedzi. Postępy Biologii Komórki, 29: 221-236. (in Polish) *Dalam* Kowalska, U., K. Szafrńska, D. Krzyżanowska. 2012. Effect of increased copper ion content in the medium on the regeneration of androgenetic embryos of carrot (*Daucus carota* L.). Acta Agrobotanica. 65 (2): 73-82.

- Marschner, H. 2011. Mineral nutrition of higher plants. London, Academic Press.
- Nguni, M.P., R.O. Oduor R.O. Omwoyo, J.M. Njagi, A.J. Mgtutu, R.C. Cheruiyot. 2015. Regeneration of Kenyan cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Genotypes. J Plant Biochem Physiol. 3(2):1-7.
- Niedz, R.P., T.J. Evens. 2007. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 43:370:381.
- Ouzounidou, G., R. Lannoye, S. Karataglis. 1993. Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in intact leaves under copper stress. Plant Sci. 89:221–6.
- Priadi, D., D. Permana, S. Dona, S. Hartati, E. Sudarmonowati. 2009. Selection of Indonesia cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes as source of β -carotene. Biodiversitas. 10(1): 6-11.
- Purnhauser, L., G. Gyulai. 1993. Stimulation of shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 35: 131-9.
- Romeu–Moreno, A., A. Mas. 1999. Effect of copper exposure in tissue cultured *Vitis vinifera*. J. Agric. Chem. 47: 2519–22.
- Sheldon, A., N.W. Menzies. 2004. The effect of copper toxicity on the growth and morphology of rhodes grass (*Chloris gayana*) in olution culture. Australian New Zealand Soils Conference. 1: 1-8.
- Tonukari, N.J. 2004. Cassava and the future starch. Journal of Biotechnology. 7(1): 5-8.
- Xiong, Z.T., H. Wang. 2004. Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). Wiley InterScience. 1: 188-194.
- Yruela, I. 2005. Toxic metal in plants. Copper in plants. Braz. J. Plant Physiol. 17(1):145-156.

