



**PRODUKSI DAN PERTUMBUHAN BENIH SINTETIK TEBU (*Saccharum officinarum*) HASIL SOMATIK EMBRIOGENESIS MELALUI
PEMBERIAN NATRIUM ALGINAT DAN CaCl_2**

SKRIPSI

Oleh:

**IFFAH
NIM 111510501083**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**PRODUKSI DAN PERTUMBUHAN BENIH SINTETIK TEBU (*Saccharum officinarum*) HASIL SOMATIK EMBRIOGENESIS MELALUI
PEMBERIAN NATRIUM ALGINAT DAN CaCl_2**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Sarjana (S1) pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh:

**IFFAH
NIM 111510501083**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang, saya persembahkan skripsi ini kepada;

1. Ibunda Zumaroh dan Ayahanda Karsidi, terima kasih atas semua doa, dukungan dan pengorbanan selama ini yang tak mungkin terbalaskan dengan apapun.
2. Keluarga besar di Kota Gresik yang selalu memberikan semangat dan doa untuk penyelesaian studi.
3. Sahabat-sahabat yang selalu menemani, membantu dalam suka maupun duka.
4. Bapak dan ibu guru mulai TK hingga Perguruan Tinggi yang telah memberikan nasehat, bekal ilmu dan pengalaman selama ini.
5. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

“The most powerful people are the people who trust and rely on God himself”

"Segala sesuatu ada ilmu pengetahuannya, pengalaman dan keberhasilan ada harganya. Hanya bagi yang mau berkomitmen dan konsisten menjalani prosesnya yang akan mendapat hasilnya."

“Sesungguhnya ilmu itu didapat dengan belajar, sabar itu didapat dengan membiasakan diri untuk bersabar. Barangsiapa yang berusaha mencari kebaikan maka ia akan diberi. Dan barangsiapa yang berlindung diri dari kejahatan maka ia akan dilindungi dari kejahatan”

(HR. ad-Daruquthni dan al-Khatib dalam Shahih al-Jami’)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Iffah

NIM : 11510501083

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul ***“Produksi dan Pertumbuhan Benih Sintetik Tebu (*Saccharum officinarum*) Hasil Somatik Embriogenesis Melalui Pemberian Natrium Alginat dan $CaCl_2$ ”*** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada instansi manapun serta bukan jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh PUPT (Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi) Tahun 2015 atas nama Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isi sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 15 Oktober 2015

Yang menyatakan,

Iffah

NIM. 11510501083

SKRIPSI

PRODUKSI DAN PERTUMBUHAN BENIH SINTETIK TEBU (*Saccharum officinarum*) HASIL SOMATIK EMBRIOGENESIS MELALUI PEMBERIAN NATRIUM ALGINAT DAN CaCl_2

Oleh

IFFAH

NIM 111510501083

Pembimbing :

Pembimbing utama : Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP.

NIP. 196504251990022002

Pembimbing Anggota : Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, MS.

NIP. 196003171983032001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Produksi dan Pertumbuhan Benih Sintetik Tebu (*Saccharum officinarum*) Hasil Somatik Embriogenesis Melalui Pemberian Natrium Alginat dan CaCl₂**” telah diuji dan disahkan pada :

Hari : Kamis

Tanggal : 15 Oktober 2015

Tempat : Ruang Sidang Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP.
NIP. 196504251990022002

Dosen Pembimbing Anggota,

Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, MS.
NIP. 196003171983032001

Dosen Penguji,

Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph.D.
NIP. 196504261994031001

Mengesahkan
Dekan,

Dr. Ir. Jani Januar, MT.
NIP. 195901021988031002

RINGKASAN

“Produksi dan Pertumbuhan Benih Sintetik Tebu (*Saccharum officinarum*) Hasil Somatik Embriogenesis Melalui Pemberian Natrium Alginat dan CaCl_2 ”, Iffah, 111510501083; 2015; Progam Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan salah satu tanaman bernilai ekonomi tinggi yang cocok untuk dikembangkan sebagai benih sintetik. Produksi benih sintetik pada tanaman tebu belum optimal, sehingga diperlukan perlakuan untuk meningkatkan produksi dan pertumbuhan benih sintetik yang baik. Upaya peningkatan produksi benih sintetik tebu yang mempunyai pertumbuhan baik dapat dilakukan melalui pemberian Natrium alginat sebagai bahan kapsul benih dan CaCl_2 sebagai pengeras benih. Produksi dan pertumbuhan benih sintetik yang optimal dipengaruhi oleh pemberian Natrium alginat dan CaCl_2 dengan konsentrasi yang tepat.

Percobaan ini dilaksanakan di Laboratorium CDAST Universitas Jember dari bulan Januari sampai Juli 2015. Penelitian ini bertujuan mengetahui konsentrasi Natrium alginat dan CaCl_2 yang terbaik terhadap produksi dan pertumbuhan benih sintetik. Percobaan disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dan dilanjutkan uji lanjut Duncan terhadap semua parameter dengan faktor pertama 3 macam konsentrasi Natrium alginat dan faktor kedua 3 macam konsentrasi CaCl_2 .

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian Natrium alginat dan CaCl_2 berpengaruh nyata terhadap produksi dan pertumbuhan benih sintetik tebu. Kombinasi Natrium alginat dan CaCl_2 menunjukkan nilai yang berbeda nyata terhadap waktu, jumlah dan presentase perkecambahan benih. Pemberian konsentrasi 4% Natrium alginat + 100 mM CaCl_2 menunjukkan produksi dan pertumbuhan benih sintetik yang paling baik. Pemberian konsentrasi Natrium alginat tunggal dengan konsentrasi 4% menunjukkan hasil terbaik dalam produksi dan pertumbuhan benih sintetik.

Kata kunci : *benih sintetik, Natrium alginat, CaCl_2 , somatik embryogenesis*

SUMMARY

“The Production and The Growth Of Sugarcane Synthetic Seed (*Saccharum officinarum*) Result of Somatic Embryogenesis by Giving Natrium Alginate and CaCl_2 ”, Iffah, 111510501083; 2015; Agrotechnology Departement, Agriculture Faculty of Jember University.

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) has high economic value that appropriate to be developed become synthetic seeds. The production of sugarcane is not optimum so it needs an act to develop the production and the growth of good synthetic seeds. The efforts of developing the production of sugarcane synthetic seeds that has good growth can be done by giving Natrium alginate as a matter of capsule of seeds and CaCl_2 as ossification of seeds. The production and the growth of optimum synthetic seeds are influenced by giving Natrium alginate and CaCl_2 with the appropriate concentration.

This research was done in CDAST laboratory Universty of Jember started from January 2015 until July 2015. This research aims to know Natrium alginate concentration and CaCl_2 that has the best impact in production and growth of synthetic seed. The tests are arranged based on factorial Complete Random Design (CRD) and continued to Ducan further test to all parameters with first factor three kinds of Natrium alginate concentration and second factor is three kinds of CaCl_2 concentration.

The result of this research shows that giving Natrium alginate and CaCl_2 has real impact to production and growth of sugarcane synthetic seed. The combination of Natrium alginate and CaCl_2 show real difference in score to time, quantity and percentage of seed germination. Giving 4% Natrium alginate concentration + 100 mM CaCl_2 show the best production and growth of synthetic seed. The giving single Natrium alginate with 4% concentration show the best result in production and growth of synthetic seed.

Key words : *synthetic seed, Natrium alginate, CaCl_2 , somatic embryogenesis*

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan ridhonya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi yang berjudul “Produksi dan Pertumbuhan Benih Sintetik Tebu (*Saccharum officinarum*) Hasil Somatik Embriogenesis Melalui Pemberian Natrium Alginat dan CaCl_2 ” sebagai syarat untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pertanian.

Penyelesaian karya tulis (skripsi) ini tak lepas dari dukungan dan motivasi semua pihak dan penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Jani Januar, MT selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
2. Ir. Hari Purnomo, MSi., Ph.D., DIC selaku Ketua Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
3. Dr. Ir. Parawita Dewanti MP selaku Dosen Pembimbing Utama, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, ilmu, pengalaman, serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, MS selaku Dosen Pembimbing Anggota dan Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph.D sebagai dosen penguji yang memberikan bimbingan, pengarahan menulis, saran dan masukan dalam penyelesaian skripsi.
5. Dr. Ir. Tri Candra Setiawati, M.Si selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan pengarahan selama masa perkuliahan.
6. Ir. Raden Soedrajad, MT selaku Ketua Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember.
7. Ibunda Zumaroh dan Ayahanda Karsidi, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas jasa yang tiada tara selama ini. Serta keluarga di Kota Gresik yang senantiasa memberikan dukungan penuh.
8. Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberikan beasiswa Bidik Misi selama masa studi di Universitas Jember.
9. Prof. Bambang Sugiarto selaku kepala Laboratorium CDAST (*Center for Development of Advance Science And Technology*) yang telah memberikan

kesempatan, tempat belajar dan tempat penelitian. Serta seluruh teman-teman peneliti Sugar Group (Retno, Intan, Retna, Wulan, Rian dll), Phage Group, Melinjo Group, seluruh dosen dan staff yang banyak membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

10. Teman-teman Agroteknologi 2011, keluarga Kelas C, Keluarga F-Siap dan Rekan Asisten Laboratorium Produksi Tanaman Jurusan Budidaya Tanaman dan teman-teman seperjuangan eksekutif 66 (Erlif, Nita, Mirfat, Titis, Titis dan Uun) yang telah menemani, mendukung dan memberikan motivasi.
11. Pihak-pihak yang banyak membantu dari Litbang PTPN XI dan pihak-pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Jember, 15 Oktober 2015

Penulis

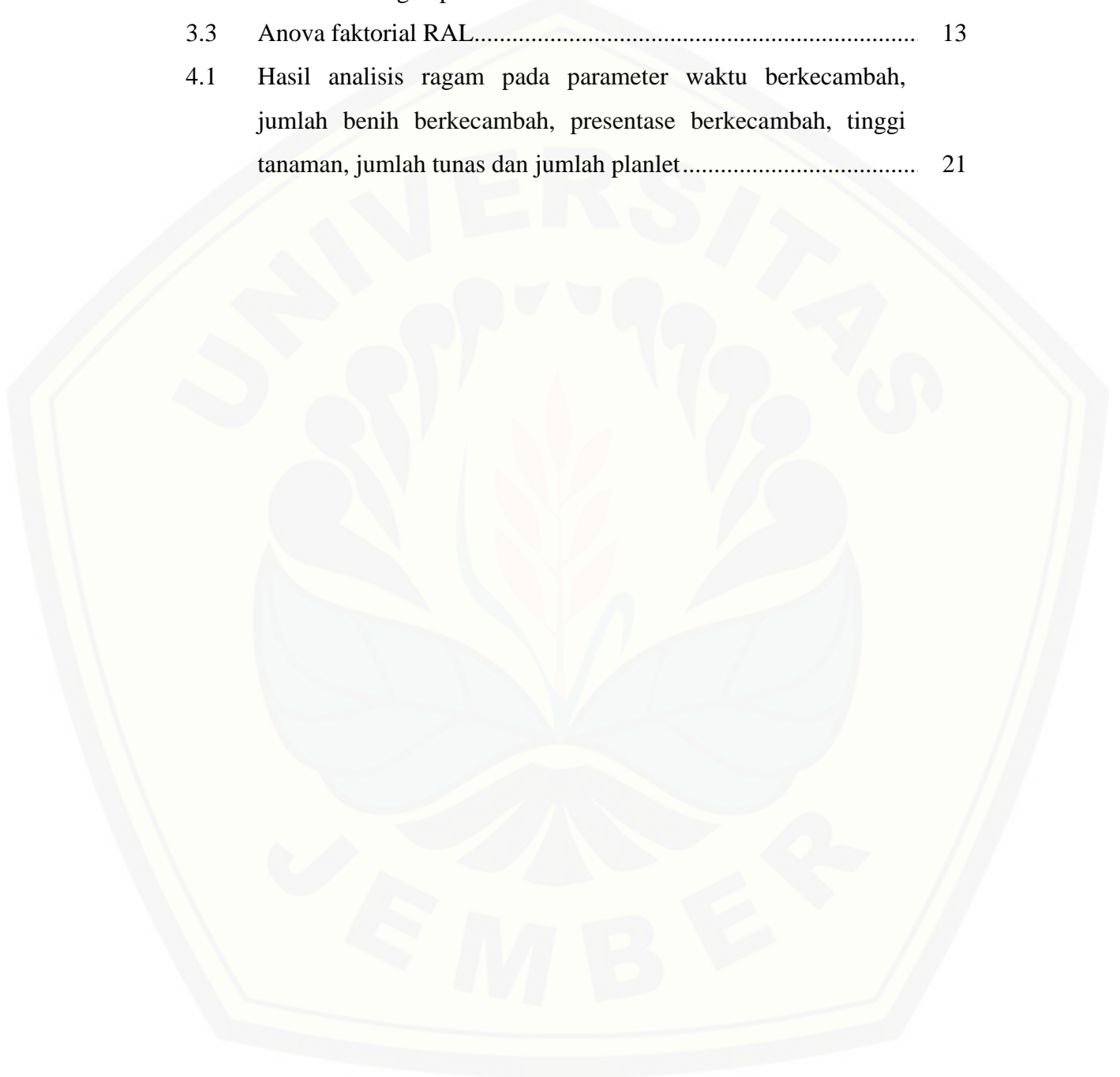
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	ix
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Bibit Tanaman Tebu (<i>Saccharum officinarum</i>)	4
2.2 Somatik Embriogenesis	4
2.4 Benih Sintetik	5
2.5 Faktor Yang Mempengaruhi Produksi dan Pertumbuhan Benih Sintetik	7
2.4 Hipotesis	10
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
3.1 Waktu dan Tempat.....	11
3.2 Bahan dan Alat	11
3.3 Rancangan Percobaan.....	11
3.4 Pelaksanaan Percobaan.....	14

3.4.1 Perbanyak Somatik Embriogenesis	13
3.4.2 Produksi Benih Sintetik.....	15
3.4.3 Pertumbuhan Benih Sintetik	16
3.5 Variabel Pengamatan	17
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1 Somatik Embriogenesis	19
4.2 Hasil.....	20
4.3 Pembahasan	25
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan.....	34
5.1 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	39

DAFTAR TABEL

No	Judul	Hal
3.1	Kombinasi dua faktor percobaan	12
3.1	Denah rancangan percobaan faktorial	12
3.3	Anova faktorial RAL.....	13
4.1	Hasil analisis ragam pada parameter waktu berkecambah, jumlah benih berkecambah, presentase berkecambah, tinggi tanaman, jumlah tunas dan jumlah planlet.....	21



DAFTAR GAMBAR

No	Judul	Hal
4.1	Hasil induksi <i>spendel leaf</i> tebu	19
4.2	Tahapan perkembangan somatik embryogenesis.....	20
4.3	Waktu perkecambahan benih sintetik tebu pada pemberian Na-alginat dan CaCl ₂ yang berbeda	21
4.4	Jumlah benih berkecambah pada pemberian Na-Alginat dan CaCl ₂ yang berbeda	22
4.5	Presentase perkecambahan benih sintetik tebu pada pemberian Na-alginat dan CaCl ₂ yang berbeda	23
4.6	Tinggi tanaman tebu pada konsentrasi Na-alginat yang berbeda	24
4.7	Jumlah tunas tanaman tebu pada konsentrasi Na-alginat yang berbeda	24
4.8	Jumlah planlet tanaman tebu pada konsentrasi Na-alginat yang berbeda	25
4.9	Perkecambahan benih sintetik pada umur 4 hari	28
4.10	Pertumbuhan benih hari ke-14 pada konsentrasi Na-alginat yang berbeda	29
4.11	Pertumbuhan tanaman tebu umur 48 hari pada konsentrasi Na-alginat yang berbeda	32

DAFTAR LAMPIRAN

No	Judul	Hal
1	Dokumentasi kegiatan penelitian	39
2	Tahapan produksi benih sintetik	40
3	Pertumbuhan benih sintetik umur 14 hari	41
4	Data waktu perkecambahan benih	42
5	Data jumlah benih berkecambah	44
6	Data presentase berkecambah	46
7	Data tinggi tanaman	48
8	Data jumlah tunas	49
9	Data jumlah planlet	50

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Benih sintetik merupakan salah satu teknologi penyiapan bibit hasil kultur jaringan yang menghasilkan bibit seragam. Benih sintetik merupakan embrio somatik yang berada didalam mantel (kapsul), sehingga sifatnya mirip dengan benih zigotik (Radenbaugh, 1992). Benih mempunyai sifat yang lebih tahan dan kuat karena dilakukan pelapisan kapsul benih. Benih sintetik mempunyai ketahanan terhadap kerusakan benih, dapat mempertahankan sifat yang dimiliki oleh tanaman dalam waktu lama, menjaga kemurnian genetik, dapat memudahkan pengaturan dan pengiriman, dan dapat disimpan dalam waktu lama tanpa kehilangan viabilitasnya (Roostika *et al.*, 2012).

Penelitian benih sintetik telah dikembangkan di manca Negara, seperti Korea, India, Kenya dan Spanyol. Penelitian benih tersebut umumnya ditujukan untuk perbanyakan tanaman yang bernilai ekonomi tinggi, seperti ginseng, pisang, tebu, bambu, teh dan kentang (Noviati dan Roostika, 2004). Tanaman tebu merupakan salah satu tanaman bernilai ekonomi tinggi dan sangat potensi untuk dikembangkan di Indonesia, karena termasuk tanaman perkebunan yang mempunyai peran penting dalam kebutuhan pokok masyarakat. Perbanyakan bibit tebu banyak dilakukan melalui somatik embriogenesis pada berbagai jenis tanaman. Perbanyakan tersebut banyak dimanfaatkan sebagai pengembangan benih sintetik. Namun pada tanaman tebu hanya diperbanyak melalui somatik embriogenesis dan belum diproduksi menjadi benih sintetik.

Penerapan teknologi benih sintetik di Indonesia masih dalam tahap penelitian, hingga saat ini penelitian benih sintetik tersebut lebih ditujukan untuk usaha konservasi dan pemeliharaan genotipe (Roostika *et al.*, 2003), sehingga belum ada penelitian mengenai upaya peningkatan produksi benih sintetik yang mempunyai pertumbuhan yang baik. Benih sintetik tebu selama ini belum dikembangkan di Indonesia sehingga produksinya rendah. Produksi benih sintetik pada tanaman tebu belum dapat dilakukan karena belum ditemukan bahan pelapis (kapsul) benih yang sesuai dalam pertumbuhan benih. Bahan kapsul benih

berperan sebagai endosperm yang mengandung sumber karbon, nutrisi dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang mempengaruhi kehidupan embrio. Bahan kapsul tersebut akan menjadi gel ketika dimasukkan ke dalam elektrolit (pengeras benih) yang tepat, tingkat pengerasan yang berbeda akan mempengaruhi daya hidup embrio dalam benih. Sehingga dibutuhkan bahan kapsul dan pengeras benih yang sesuai dalam menghasilkan produksi dan pertumbuhan benih sintetik yang baik.

Terdapat beberapa macam bahan kapsul yang digunakan dalam pembuatan benih sintetik, diantaranya asam alginat, natrium alginat, kalsium alginat, kalium alginat, ammonium alginat dan propilogikol alginat. Sedangkan bahan pengeras dapat terdiri dari NaCl, CaCl₂, CuSO₄ dan NH₄Cl. Diantara bahan-bahan tersebut belum diketahui bahan dan konsentrasi yang sesuai dalam produksi dan pertumbuhan benih sintetik.

Upaya peningkatan produksi benih sintetik tebu yang mempunyai pertumbuhan baik dapat dilakukan melalui pemberian bahan alginat sebagai bahan gel (kapsul) dan CaCl₂ sebagai pengeras benih. Natrium alginat merupakan salah satu hidrogel yang paling cocok dalam pembuatan benih sintetik karena diperkaya hara, zat pengatur tumbuh, mempunyai daya toksisitas rendah, biaya rendah, tidak terlalu lengket, cepat menggumpal dan mempunyai sifat biokompatibilitas (Reddy *et al.*, 2012). Sedangkan CaCl₂ merupakan jenis garam dan senyawa ionik yang berperan dalam pengeras tekstur (Winarni, 1986). Kosentrasi Natrium alginat dan CaCl₂ tersebut mempengaruhi produksi dan pertumbuhan benih sintetik.

Embrio yang digunakan dalam produksi benih sintetik berasal dari eksplan hasil kultur jaringan seperti somatik embrio, zigotik embrio, basal, tunas, tunas apikal, tunas aksilar dan kalus (Lambardi *et al.*, 2006). Somatik embrio merupakan salah satu metode perbanyakan embrio yang menghasilkan bibit tebu bebas dari penyakit sistemik. Embrio somatik mempunyai struktur yang bipolar yaitu mempunyai dua calon meristem yang terdiri dari meristem akar dan meristem tunas (Figueroa *et al.*, 2006). Pemanfaatan somatik embrio dalam produksi benih sintetik mampu menghasilkan benih yang mempunyai pertumbuhan optimal.

1.2 Perumusan Masalah

Tanaman tebu merupakan salah satu tanaman bernilai ekonomi tinggi yang cocok untuk dikembangkan sebagai benih sintetik. Produksi benih sintetik pada tanaman tebu belum dapat dilakukan secara optimal karena belum ditemukan bahan pelapis (kapsul) dan pengeras benih yang sesuai dalam pertumbuhan benih. Upaya peningkatan produksi benih sintetik tebu dapat dilakukan melalui pemberian bahan Natrium alginat dan CaCl_2 , sehingga dibutuhkan konsentrasi Natrium alginat dan CaCl_2 yang tepat untuk menghasilkan pertumbuhan benih sintetik yang baik.

1.3 Tujuan Percobaan

1. Mengetahui produksi dan pertumbuhan benih sintetik yang terbaik melalui pemberian konsentrasi Natrium alginat dan CaCl_2 yang berbeda.
2. Mengetahui pemberian konsentrasi tunggal Natrium alginat atau CaCl_2 yang paling baik dalam produksi dan pertumbuhan benih sintetik.

1.4 Manfaat Percobaan

1. Hasil percobaan ini dapat dijadikan sebagai protokol dalam pembuatan benih sintetik dengan sumber embrio yang berbeda.
2. Hasil percobaan merupakan inovasi baru dalam pembuatan benih sintetik yang mempunyai pertumbuhan baik dan dapat dilakukan percobaan lanjutan mengenai penyimpanan benih dalam jangka panjang.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bibit Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*)

Tanaman tebu merupakan salah satu tumbuhan monokotil dan termasuk dalam famili *Gramineae* (rumput-rumputan). Tanaman tebu berasal dari daerah tropis basah sebagai tanaman liar. Musim tanam tanaman tebu memerlukan waktu 11 sampai 12 bulan waktu tanam (Dahlan, 2011).

Bibit tebu berasal dari dua sumber yaitu konvensional dan kultur jaringan. Bibit konvensional biasanya diambil dari bagian tanaman seperti pucuk, bagal mata 3, bagal mata 1, rayungan, topstek, budsett, planlet, *bud chip* tebu pada bibit umur 6-7 bulan. Sedangkan bibit hasil kultur jaringan dapat menghasilkan bibit yang siap dipindahkan ke lapang pada umur 2-3 bulan. Bibit yang berasal dari kultur jaringan mempunyai kualitas yang lebih terjamin dan karakteristik varietas yang ditanam sesuai dengan sifat genetiknya. Misalnya tebu yang memiliki karakter potensi kandungan gula tinggi bisa menghasilkan rendemen yang tinggi (Toharisman, 2013).

Penyediaan bibit unggul salah satunya melalui kultur jaringan. Aplikasi perbanyakan tanaman secara kultur jaringan dinilai menguntungkan karena jumlah propagula yang dihasilkan tidak terbatas dan dapat diperoleh dalam waktu yang singkat. Metode kultur jaringan dipercaya dapat menjadi tujuan mikropropagasi tanaman (Purmaningsih, 2002). Bibit hasil kultur jaringan dapat memberikan kontribusi untuk mendapatkan tanaman yang bebas dari virus. Pada tanaman yang telah terinfeksi virus dapat dihasilkan tanaman yang bebas virus melalui kultur sel pada tunas ujung (meristem). Tunas ujung atau meristem merupakan daerah yang tidak terinfeksi virus (Yusnita, 2003).

2.2 Somatik Embriogenesis

Somatik embriogenesis merupakan proses pembentukan embrio dari sel somatik yang ditumbuhkan dalam kondisi *in vitro* dan diberikan hormon yang dapat menunjang pertumbuhan eksplan menjadi tanaman yang lengkap (Yuwono, 2008). Sel embriogenik berkembang dari sel somatik yaitu dari sel-sel tubuh

seperti batang, daun dan bagian lain yang berkembang menjadi embrio namun tanpa melalui fase penyatuan gamet. Embrio somatik mempunyai struktur yang bipolar yaitu mempunyai dua calon meristem yang terdiri dari meristem akar dan meristem tunas (Figueroa *et al.*, 2006).

Tahapan perkembangan somatik embriogenesis diantaranya globular, elongasi, skutelar dan koleoptilar (Figueroa *et al.*, 2006). Teknik embriogenesis dalam kultur jaringan dapat membantu dalam konservasi tanaman, terutama dalam penyediaan bibit dan perbanyakan genotip yang cepat (Percy *et al.*, 2000). Metode somatik embriogenesis juga dapat dijadikan bahan tanam yang ideal untuk disimpan dalam waktu relatif lama dan diregenerasikan menjadi bibit somatik (Purmaningsih, 2002).

Kalus embriogenik memiliki tipe kalus yang dapat memproduksi somatik embrio setelah diberi perlakuan pada kondisi kultur. Kalus embriogenik memiliki ciri berwarna putih kekuningan, berstruktur remah dan kering. Sedangkan kalus non embriogenik mempunyai ciri struktur yang kompak, basah dan berwarna bening kecoklatan (Husein *et al.*, 2006). Kalus yang terbentuk dari jalur somatik embriogenesis selanjutnya akan membentuk unit yang menyerupai embrio (*embryoid*) kemudian melewati tahap pendewasaan dan perkecambahan (Sukmadjaja dan Mulyana, 2011).

2.3 Benih Sintetik

Benih sintetik merupakan embrio somatik yang terbungkus dalam kapsul, sehingga sifatnya mirip dengan benih zigotik. Kapsul pelindung tersebut berperan sebagai endosperm yang mengandung nutrisi, energi (karbon) dan zat pengatur tumbuh. Eksplan yang digunakan untuk membentuk benih sintetik dapat berupa embrio somatik, tunas terminal, tunas aksilar, nodus dan jaringan meristem. Tujuan produksi benih sintetik yaitu dapat digunakan untuk perbanyakan tanaman yang dikembangkan secara vegetatif dan tanaman yang tidak dapat memproduksi biji. Benih sintetik yang diproduksi melalui cara kultur jaringan akan dihasilkan benih yang relatif bebas dari hama dan penyakit (Roostika *et al.*, 2012).

Produksi benih sintetik dilakukan dengan cara membuat endosperm buatan untuk mengganti kulit benih sintetik yang akan dibuat sebagai cadangan makanan benih. Keuntungan penggunaan benih sintetik yaitu dapat digunakan untuk perkembangbiakan dalam skala besar, sangat cocok untuk penanaman monokultur dalam skala besar, sebagai konservasi plasma nutfah dan dapat menyelamatkan plasma nutfah yang terancam punah. Keuntungan lain adalah penanganan benih mudah selama penyimpanan, memudahkan transportasi karena ukuran benih yang sangat kecil, benih sintetik mempunyai cadangan makanan seperti benih pada umumnya dan produksi benih seragam (Ravi dan Anand, 2012).

Tahun 1984 Redenbaugh mengembangkan tehnik untuk menyelimuti atau mengkapsulasi dari embrio somatik alfalfa melalui kondisi *in vitro*. Pada percobaan Redenbaugh embrio somatik dari alfalfa dicampur dengan 2% (berat/volume) Natrium alginat dan dijatuhkan menggunakan pipet kaca kedalam 100 mM larutan CaCl_2 . Reaksi ionik akan terjadi dan ion Na akan terganti oleh ion Ca membentuk Ca-alginat. Proses ini membutuhkan waktu berkisar 30 menit. Besarnya kapsul dapat dikontrol dengan menggunakan diameter ujung pipet yang digunakan. Proses pengkerasan Ca-alginat dapat dipengaruhi oleh konsentrasi Natrium alginat dan ion Ca^{2+} dan waktu yang tersedia untuk menunggu benih sintetik menjadi keras (Bhojwani dan Razdan, 1996).

Enkapsulasi tanaman wortel menggunakan sodium (natrium) alginat ditambahkan maltosa, 6-BA, NAA, karbon aktif kemudian disterilkan menggunakan autoklaf. Bahan tanam kemudian dimasukan kedalam Na alginat dan bahan tanam diambil menggunakan pipet dan dicelupkan dalam kalsium klorida ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Na (natrium) alginat tersebut akan terganti dengan ion Ca dari kalsium klorida sehingga alginat yang berisi bahan tanam (eksplan) tersebut akan mengeras karena ion kalsium ikut menyusun struktur kapsul benih. Setelah benih menjadi keras didalam larutan kalsium klorida, benih tersebut disterilkan menggunakan aquades dan dikeringkan diatas kertas blotter yang steril (Zhang, 2011).

2.4 Faktor yang Mempengaruhi Produksi dan Pertumbuhan Benih Sintetik

2.4.1 Sumber Eksplan

Eksplan yang digunakan untuk pembuatan benih sintetik dapat berasal dari meristem apikal tunas dan akar, tunas axillary dan embrio somatik. Salah satu persyaratan eksplan yang baik untuk digunakan dalam teknologi produksi benih sintetik yaitu berasal dari embrio somatik (Ravi dan Anand, 2012). Eksplan yang berasal dari embrio somatik dapat membentuk calon akar (radikal) dan calon tunas (plumul) yang mampu berkembang menjadi akar dan tunas secara bersama (Reddy *et al.*, 2012).

Manfaat penggunaan eksplan meristem apikal yaitu memungkinkan untuk mengontrol eksplan bebas virus, tanaman secara genetik seragam dan pada tanaman laju perbanyakan lebih tinggi. Kemampuan regenerasi jaringan tanaman tergantung dari umur fisiologis, karakter dan kualitas selnya. Jaringan yang lebih muda umumnya mempunyai kemampuan berdiferensiasi dan tumbuh lebih baik (Rosmayati, 1993).

Eksplan yang digunakan untuk kultur harus dilakukan pemilihan bahan eksplan yang baik seperti eksplan yang masih muda karena semakin tua organ tanaman yang digunakan sebagai eksplan maka proses pembelahan dan regenerasi sel cenderung menurun. Sedangkan jaringan yang masih muda lebih baik digunakan karena pada umumnya jaringan yang masih muda dapat berpoliferasi dengan baik daripada jaringan yang berkayu atau jaringan tua (Rosullah *et al.*, 2013). Inisiasi hasil kultur yang bebas kontaminan dan sumber eksplan menentukan keberhasilan perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan eksplan yaitu jenis tanaman, bagian tanaman yang akan digunakan, morfologi permukaan, kondisi tanaman dan waktu pengambilan eksplan (Marlina, 2009).

2.4.2 Perkecambahan Benih Sintetik

Pertumbuhan benih hasil enkapsulasi dapat ditunjukkan oleh respon inisiasi akar dan tunas. Beberapa benih sintetik menunjukkan pemunculan akar dan tunas secara bersama setelah 10-12 hari dari permukaan benih sintetik saat

pertumbuhan vegetatif. Benih yang sudah tumbuh kemudian dilakukan sukultur di media baru, sehingga planlet berkembang baik dan tumbuh menjadi tunas dan akar (Sarmah *et al.*, 2010).

Perkecambahan benih sintetik dapat diketahui ketika eksplan yang dienkapsulasi muncul dan memecahkan gel. Perkecambahan benih sintetik dimulai 2 hari setelah dikulturkan dalam medium. Hasil percobaan menunjukkan bahwa umumnya tingkat perkecambahan benih sintetik yaitu 73% dan 100% dengan durasi waktu 6-20 hari dan tingkat perkecambahan terendah yaitu 40-46,6% karena terjadi kontaminasi jamur (Asmah *et al.*, 2011).

2.4.3 Bahan Pembuatan Benih Sintetik

Bahan pelindung benih sintetik harus mampu mengendalikan pertumbuhan dan perkecambahan benih. Endosperm buatan benih sintetik harus mengandung satu atau beberapa senyawa seperti nutrisi, zat pengatur tumbuh, anti patogen, herbisida, dan biokontrol. Komposisi bahan pelindung benih harus menyediakan makanan untuk pertumbuhan enkapsulasi embrio dan mampu melindungi benih dari kerusakan. Umumnya benih sintetik mempunyai tekstur keras karena berfungsi sebagai pelindung benih (Cartes *et al.*, 2009).

Benih sintetik yang dienkapsulasi harus mengandung nutrisi dan zat pengatur tumbuh untuk memberikan persediaan benih sintetik, sehingga dapat meningkatkan efisiensi kelangsungan hidup dan perkecambahan benih sintetik. Kualitas benih sintetik tergantung pada kualitas, jumlah pasokan zat pengatur tumbuh dan nutrisi selama ditumbuhkan dalam lingkungan fisik yang optimal (Reddy *et al.*, 2012).

Bahan pengental yang telah diuji untuk digunakan dalam produksi benih sintetik diantaranya polyox, polyco 2133, agar, agarose, alginate, carboxy methylcellulose, carrageenan, guar gum, gelrite, tragacanth gum, sodium pectate ethylcellulose, nitrocellulose dan polyacrylamide. Bahan Natrium alginat merupakan bahan yang paling cocok untuk enkapsulasi dari embrio somatik. Natrium alginat merupakan salah satu hydrogel yang paling cocok dan sering digunakan sebagai acuan untuk pembuatan benih sintetik karena daya

toksitasnya rendah, biaya rendah, tidak terlalu lengket, cepat menggumpal dan mempunyai sifat bio-kompatibilitas (Reddy *et al.*, 2012).

Bahan nutrisi untuk menyelimuti embrio harus mempunyai syarat yaitu bahan tidak merusak embrio, bahan harus mencukupi untuk melindungi embrio dan cukup untuk berkecambahnya benih, tetapi harus tahan terhadap keadaan selama perjalanan, pembuatan, penyimpanan, dan masa penanaman, bahan nutrisi tidak hanya berisi nutrisi tetapi juga zat pengatur tumbuh (ZPT) dan bahan-bahan lain yang penting dalam perkecambahan benih, benih sintetis yang terbentuk harus tahan terhadap proses-proses penanaman menggunakan mesin yang keras di lahan (Bhojwani dan Razda, 1996).

pH benih sintetis berubah pada saat ditumbuhkan dalam media *in vitro*. Setelah 60 hari ditanam dalam kondisi *in vitro*, pH menurun dari 5,72 menjadi 4,52 dan dari 5,76 menjadi 4,53. pH yang terlalu asam dapat menyebabkan eksplan yang digunakan sebagai bahan sintetis tidak dapat tumbuh. Hal ini menjadi sebuah masukan untuk dapat membuat benih sintetis untuk tetap viabel. Penambahan buffer (penyangga) pH seperti KH_2PO_4 atau CaCO_3 pada sodium alginat dapat mencegah tunas mati karena pH yang terlalu rendah menghalangi pertumbuhan tunas bagi benih sintetis yang akan berkecambah (Zhang, 2011).

2.4.4 Bahan Alginat dan CaCl_2

Enkapsulasi pada beberapa konsentrasi alginat dan beberapa konsentrasi $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dapat memberikan frekuensi perkecambahan yang tinggi. Hasil percobaan menunjukkan bahwa enkapsulasi dengan konsentrasi tinggi Natrium alginat (3-5%) akan menghasilkan benih sintetis yang seragam dan bentuk benih yang cukup kuat. Natrium alginat digunakan sebagai bahan enkapsulasi karena mudah larut dalam air pada temperatur ruang dan mempunyai kemampuan untuk membentuk gel yang larut dengan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Asmah *et al.*, 2011).

Kapsul gel dapat berfungsi sebagai penyimpan nutrisi yang dapat membantu kelangsungan hidup dan kecepatan pertumbuhan eksplan. Enkapsulasi benih menggunakan 3% Natrium alginat dan 100 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ merupakan konsentrasi optimal untuk produksi dan pertumbuhan benih sintetis. Selain itu hasil

percobaan juga menunjukkan bahwa benih terbentuk pada konsentrasi Natrium alginat (4-5%), serta mampu memunculkan tunas dan akar. Konsentrasi bahan CaCl_2 juga mempengaruhi frekwensi perubahan enkapsulasi eksplan (Asmah *et al.*, 2011).

Pengerasan kapsul yang terbentuk tergantung waktu perendaman dalam larutan CaCl_2 . Percobaan tersebut menyebutkan pada kaspul yang direndam dalam CaCl_2 dengan waktu 30 menit menghasilkan embrio tetap hidup dalam kaspul dengan presentase 99%. Waktu perendaman dalam CaCl_2 mempengaruhi pembentukan kapsul dalam melapisi embrio (Cartes *et al.*, 2009).

Pembuatan benih sintetik dengan konsentrasi Natrium alginat 3% dan CaCl_2 75 mM menghasilkan keragaan ukuran yang seragam, padat dan berekor. Sedangkan menurut percobaan Asmah *et al.* (2011) menunjukkan bahwa dengan konsentrasi sodium alginat 5% dan CaCl_2 75-100 mM menghasilkan keragaan benih sintetik yang bulat dan keras. Pengaruh keragaan benih yang terbentuk dipengaruhi oleh konsentrasi Natrium alginat dan CaCl_2 yang digunakan.

2.5 Hipotesis

1. Terdapat pengaruh interaksi Natrium alginat dan CaCl_2 yang terbaik terhadap produksi dan pertumbuhan benih sintetik tebu hasil somatik embriogenesis.
2. Terdapat pengaruh tunggal Natrium alginat atau CaCl_2 yang terbaik terhadap produksi dan pertumbuhan benih sintetik tebu hasil somatik embriogenesis.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Percobaan dilaksanakan pada bulan Januari 2015 – Juli 2015 di Laboratorium *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan tanam yang digunakan adalah bagian *spendel leaf* tanaman tebu lapang varietas NXI 1-3. *Spendel leaf* diinduksi dengan cara somatik embriogenesis hingga menghasilkan koleoptil pada tahap proliferasi, bagian koleoptil akan dijadikan sebagai embrio benih sintetik. Bahan pembuatan media induksi yaitu media Murashige-Skoog (MS), 2,5 g/l pytagel, 30 g/l sukrosa, 4 mg/l 2,4 D dan 300 mg/l casein hidrolisate. Bahan pembuatan media proliferasi yaitu media Murashige-Skoog (MS), 2,5 g/l pytagel, 30 g/l sukrosa, 2 mg/l 2,4 D dan 560 mg/l prolin. Bahan pembuatan benih sintetik menggunakan media MS, Natrium alginat, 1,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, CaCl₂ dan akuades. Bahan untuk media pertumbuhan benih sintetik menggunakan media MS, 2,5 g/l pytagel dan 30 g/l sukrosa.

Alat yang digunakan adalah *Laminar Airflow cabinet* (LAF), pipet Pasteur *disposable*, kertas saring, autoklav, pH meter, botol kultur, mikropipet, gelas ukur, beaker glass, pinset, scalpel, cawan petri, bunsen, korek api, tissue, handspayer, plastik wrap, kertas label.

3.3 Rancangan Percobaan

Percobaan disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan dua faktor. Faktor pertama adalah Natrium alginat yang terdiri dari 3 taraf konsentrasi dan faktor kedua adalah CaCl₂ yang terdiri dari 3 taraf konsentrasi. Setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga terdapat (3x3x3 =27) rancangan percobaan.

Faktor yang diteliti yaitu;

- | | |
|--------------------|--------------------|
| 1. Natrium alginat | 2. CaCl_2 |
| N1 = 3% | C1 = 75 mM |
| N2 = 4% | C2 = 100 mM |
| N3 = 5% | C3 = 125 mM |

Kombinasi dua faktor untuk pengujian produksi dan pertumbuhan benih sintetik diantaranya;

Tabel 3.1 Kombinasi dua faktor percobaan

Kode	Kombinasi percobaan
N1C1	MS + Natrium alginat 3% + CaCl_2 75 mM
N1C2	MS + Natrium alginat 3% + CaCl_2 100mM
N1C3	MS + Natrium alginat 3% + CaCl_2 125 mM
N2C1	MS + Natrium alginat 4% + CaCl_2 75 mM
N2C2	MS + Natrium alginat 4% + CaCl_2 100 mM
N2C3	MS + Natrium alginat 4% + CaCl_2 125 mM
N3C1	MS + Natrium alginat 5% + CaCl_2 75 mM
N3C2	MS + Natrium alginat 5% + CaCl_2 100 mM
N3C3	MS + Natrium alginat 5% + CaCl_2 125 mM

Denah rancangan terdiri dari 27 percobaan yang disajikan dalam tabel berikut;

Tabel 3.2 Denah rancangan percobaan faktorial

N1C1	N1C2	N1C3	N2C1	N2C2	N2C3	N3C1	N3C2	N3C3
N2C3	N2C3	N2C2	N2C2	N3C3	N3C2	N1C1	N2C2	N1C3
N3C1	N1C3	N3C2	N3C3	N2C1	N1C2	N2C1	N1C1	N1C2

Model linier untuk rancangan faktorial dua faktor dengan rancangan lingkungan RAL sebagai berikut:

$$Y_{ijk} : \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

i : 1,2,3 (faktor Natrium alginat)

j : 1,2,3 (faktor CaCl_2)

k : 1,2,3 (ulangan)

Y_{ijk} : Nilai pengamatan pertumbuhan benih sintetik pada ulangan ke- k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij (faktor Natrium alginat taraf ke- i dan faktor CaCl_2 taraf ke- j).

μ : Rata-rata pengamatan pertumbuhan benih sintetik/ nilai tengah

α_i : Pengaruh konsentrasi Natrium alginat pada taraf ke- i

β_j : Pengaruh konsentrasi CaCl_2 pada taraf ke- j

$(\alpha\beta)_{ij}$: Pengaruh interaksi konsentrasi Natrium alginat pada taraf ke- i dan konsentrasi CaCl_2 pada taraf ke- j .

ϵ_{ijk} : Pengaruh galat percobaan ke- k yang memperoleh kombinasi perlakuan ij . (Herdiyantoro, 2013).

Analisis disusun berdasarkan tabel Anova (*analysis of varian*) sebagai berikut:

Tabel 3.3 Anova faktorial RAL

SK	db	JK	KT	F-hit	F-table (5%)
Perlakuan	$ab-1 = 8$	JKP	JKP/8	KTP/KTG	
Faktor A (Natrium alginat)	$a-1 = 2$	JK(A)	JK(A)/2	KT(A)/KTG	
Faktor B (CaCl_2)	$b-1 = 2$	JK(B)	JK(B)/2	KT(B)/ KTG	
Interaksi AB	$(a-1)(b-1) = 4$	JK(AB)	JK(AB)/4	KT(AB)/ KTG	
Galat	$ab(r-1) = 18$	JK(G)	JK(G)/18	-	

Keterangan:

F-hit > 5% : Berbeda nyata

F-hit < 5% : Tidak berbeda nyata

Apabila terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan 5% (Herdiyantoro, 2013).

3.4 Pelaksanaan Percobaan

Percobaan dilakukan berdasarkan beberapa tahap, diantaranya perbanyakan somatik embriogenesis, produksi benih sintetik dan pertumbuhan benih sintetik.

3.4.1 Perbanyakan Somatik Embriogenesis

Perbanyakan somatik embriogenesis dilakukan dengan pembuatan media, persiapan eksplan dan penanaman pada media induksi dan proliferasi.

a. Pembuatan Media Induksi dan Proliferasi Somatik Embriogenesis

Media induksi somatik embriogenesis dibuat dengan cara melarutkan media stok MS dengan kode (A, B, C, D, E, F, sukrosa dan vitamin), 30 g/l sukrosa dan zat pengatur tumbuh 4 mg/l 2,4 D dan 300 mg/l casein hidrolisat. Sedangkan media proliferasi dibuat dengan melarutkan media MS, 30 g/l sukrosa, 2 mg/l 2,4 D, dan 560 mg/l prolin. Setelah stok dan ZPT sudah tercampur maka ditambahkan aquades sesuai dengan takaran yang dikehendaki dan dilakukan pengadukan dengan alat *stirer* sekaligus dilakukan pengecekan pH. PH media diatur sesuai dengan anjuran batas pH yaitu 5,8 – 6,2. Selanjutnya dilakukan penambahan 2,5 g/l pytagel. Media dipanaskan hingga mendidih dan dituangkan kedalam botol kultur dengan takaran setiap botol 25 ml.

b. Persiapan Eksplan

Eksplan diambil dari pucukan tanaman tebu varietas NXI 1-3 yaitu pada bagian *spendel leaf*. Pucukan yang digunakan yaitu umur 5-6 bulan dengan alasan pada umur tersebut jaringan mudah untuk berkembang dan berdiferensiasi karena jaringan tergolong masih muda. Selanjutnya pucukan dibersihkan daun bagian luarnya hingga tersisa gulungan daun bagian dalam dengan panjang sekitar 25-30 cm. Sebelum dilakukan penanaman dalam laminar, *spendel leaf* disemprot dengan alkohol.

c. Penanaman di Media Induksi dan Proliferasi Somatik Embriogenesis

Penanaman dilakukan dengan cara membersihkan *spendel leaf* hingga gulungan daun ke 4-5. Kemudian gulungan daun dipotong dengan cara

menyisakan 1-2 cm dari bagian pangkal. Selanjutnya *spendel leaf* dipotong kecil-kecil dengan tebal $\pm 0,5$ cm sebanyak 14 potongan. Potongan *spendel leaf* ditanam dalam media induksi selama 6 minggu di ruang gelap dengan suhu 23-25°C dengan dilakukan subkultur setiap 3 minggu sekali. Setelah terbentuk kalus embrionik selanjutnya dipindahkan ke media proliferasi selama 3 minggu di ruang gelap dan 3 minggu di ruang terang sampai terbentuk koleoptil. Fase koleoptil ini yang akan digunakan sebagai embrio dalam pembuatan benih sintetik.

3.4.2 Produksi Benih Sintetik

Proses produksi benih sintetik dibuat berdasarkan tahap persiapan embrio, pembuatan larutan Natrium alginat dan CaCl_2 , dan pembuatan benih sintetik.

a. Persiapan Embrio

Embrio yang digunakan untuk pembuatan benih sintetik berasal dari bagian koleptil dari perbanyakan somatik embriogenesis pada tahap proliferasi. Koleoptil didapatkan pada tahap proliferasi dengan urutan globular, skutelar elongasi dan koleoptilar. Koleoptil yang sudah terbentuk selanjutnya diambil dan dipisahkan dari bagian yang lain secara tunggal. Ukuran koleoptil yang digunakan dalam pembuatan benih sintetik $\pm 0,5$ cm.

b. Pembuatan larutan Natrium alginat dan CaCl_2

Pembuatan larutan Natrium alginat dilakukan dengan cara menyiapkan media MS yang mengandung Natrium alginat dengan konsentrasi 3%, 4% dan 5%, serta penambahan P dan akuades. Pembuatan konsentrasi Natrium alginat 3% yaitu; 3 gram/ 100 ml (3 gram dalam 100 ml akuades).

Selanjutnya menyiapkan larutan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 75 mM, 100 mM dan 125 mM. Pembuatan larutan CaCl_2 dari $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yaitu;

- Berat molekul (BM) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 147,02

- Berat molekul (BM) CaCl_2 = 110,10

$$\text{Rumus : (Gram = M x BM x Vol (liter))}$$

a. Membuat $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam media 100 ml:

$$\text{Gram} = 0,1 \text{ M} \times 147,02 \times 100/1000 \text{ ml}$$

$$= 1,47 \text{ gram}$$

b. Membuat konsentrasi CaCl_2 100 mM dalam $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

$$\text{CaCl}_2 = \frac{110,1}{147,02} \times 1,47 \text{ gr}$$

$$= 1,1 \text{ gram} / 100 \text{ ml} = 0,11 \text{ gr/ml (Rahayu, 2007).}$$

c. Pembuatan Benih Sintetik

Pembuatan benih sintetik dilakukan dengan cara aseptik dalam laminar, larutan Natrium alginat dan CaCl_2 disiapkan dalam masing-masing botol sesuai perlakuan. Bagian koleoptil dari embrio somatik dipotong dan ditaburkan kedalam larutan Natrium alginat. Eksplan diambil secara tunggal dengan cara menyedot menggunakan pipet *pasteur disposable*, kemudian diteteskan kedalam larutan CaCl_2 dan direndam selama 30 menit (dengan sesekali digoyang-goyang). Benih sintetik yang direndam dalam CaCl_2 dalam waktu 30 menit menghasilkan embrio tetap hidup dalam kapsul dengan presentase 99%. Waktu perendaman dalam CaCl_2 mempengaruhi pembentukan kapsul dalam melapisi embrio (Cartes *et al.*, 2009). Kapsul yang sudah terbentuk kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali, kemudian kapsul diambil dan diletakkan diatas kertas saring serta dikering anginkan.

3.4.3 Pertumbuhan Benih Sintetik

Proses pertumbuhan benih sintetik dimulai dari penanaman, pertumbuhan dan pemeliharaan benih sintetik.

a. Penanaman benih sintetik

Benih sintetik yang sudah terbentuk selanjutnya ditanam dalam media regenerasi dengan jumlah 5 benih per botol pada masing-masing perlakuan. Media regenerasi yang digunakan yaitu media MS, 30 g/l sukrosa dan 2,5 g/l pytagel. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada rak kultur pada suhu ruang 23-25°C.

b. Pertumbuhan dan Pemeliharaan Benih Sintetik

Benih yang telah berkecambah dalam media regenerasi dipelihara sampai menjadi planlet. Pemeliharaan kultur benih sintetik dilakukan dengan cara menjaga kondisi ruang kultur dalam keadaan steril dan bersih. Dilakukan penyemprotan alkohol 70% pada ruang diantara botol kultur untuk menghindari terjadinya kontaminasi dan apabila terjadi kontaminasi.

3.5 Variabel Pengamatan

Produksi dan pertumbuhan benih sintetik dapat dimati dengan beberapa variable pengamatan sebagai berikut:

1. Waktu berkecambah

Waktu berkecambah dihitung berdasarkan awal benih berkecambah dengan satuan hari. Pengamatan dilakukan ketika benih ditanam dalam media regenerasi, ketika benih berkecambah maka dihitung hari beberapa benih tersebut berkecambah pada setiap perlakuan. Pengamatan dilakukan setiap hari.

2. Jumlah benih berkecambah

Jumlah benih yang berkecambah dihitung berdasarkan total benih yang tumbuh dalam setiap botol sampai hari ke 14. Jumlah benih diamati sampai hari ke 14 dengan tujuan rata-rata perkecambahan benih terjadi sampai hari ke 14 dan sampai batas tertentu tidak terjadi penambahan jumlah benih yang berkecambah.

3. Presentase berkecambah (%)

Presentase berkecambah dihitung berdasarkan jumlah benih yang tumbuh dibagi total benih yang ditanam selanjutnya dikali 100%. Pengamatan presentase berkecambah dilakukan setiap hari sampai hari ke 14.

4. Tinggi tanaman

Tinggi tanaman diamati mulai tinggi tanaman 0,5 cm sampai tanaman berumur 4 minggu dan diamati setiap minggunya. Setiap benih dalam masing-

masing perlakuan dihitung tingginya dengan cara menghitung rata-rata kelima benih yang ditanam.

5. Jumlah tunas

Jumlah tunas dihitung dengan cara menghitung tunas yang dihasilkan dari 1 benih sintetik. Selanjutnya menghitung rata-rata 5 benih pada setiap perlakuan. Perhitungan jumlah tunas dilakukan mulai tinggi tunas 0,5 cm sampai umur tanaman 4 minggu dan diamati setiap minggu.

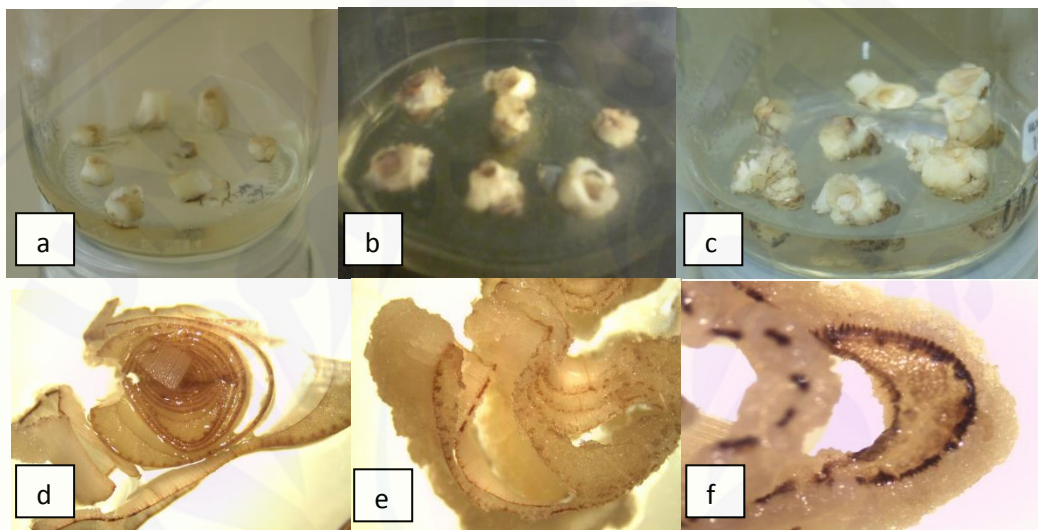
6. Jumlah planlet

Pembentukan planlet diamati setelah tunas memanjang sampai tinggi 2 cm dan akar muncul. Jumlah planlet diamati dengan cara menghitung planlet pada masing-masing perlakuan. Pengamatan dilakukan sampai 4 minggu.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Somatik Embriogenesis

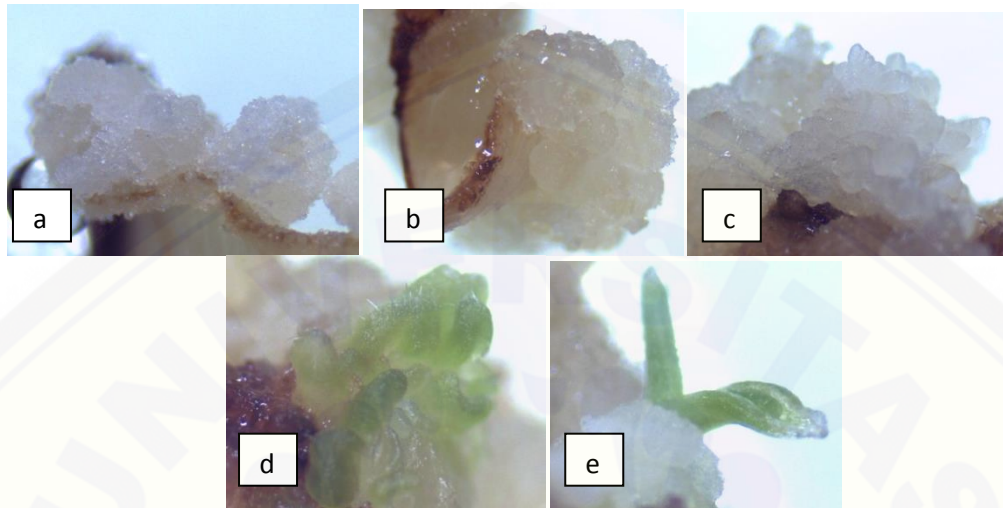
Percobaan ini diawali dengan perbanyakan melalui somatik embriogenesis yang terdiri dari tahap induksi dan proliferasi. Koleoptil hasil somatik embriogenesis digunakan sebagai embrio dalam produksi benih sintetis. Selanjutnya dilakukan pengujian terhadap pertumbuhan benih sintetis.



Gambar 4.1 Hasil induksi *spindel leaf* tebu pada umur (a) 7 hst makroskopis, (b) 14 hst makroskopis, (c) 28 hst makroskopis, (d) 7 hst mikroskopis, (e) 14 hst mikroskopis, dan (f) 28 hst mikroskopis.

Berdasarkan Gambar 4.1 menunjukkan tahapan induksi somatik embriogenesis yang dimulai dari induksi *spindel leaf* tebu, hari ke 7 setelah induksi tidak terjadi perubahan eksplan. Setelah 14 hari diinduksi terjadi perubahan eksplan menjadi lebih besar, terjadi pembelahan sel yang ditandai dengan *spindel leaf* pecah dan kalus mulai muncul. Selanjutnya pada 28 hari terjadi perubahan kalus menjadi besar, pada tahap ini kalus sudah membentuk fase pre-embryo mass. Fase pre-embryo mass merupakan fase awal dalam pembentukan kalus embriogenik. Fase pre-embryo mass dicirikan dengan struktur kalus yang halus dan berwarna putih keruh hingga bening. Selanjutnya kalus ini akan berkembang ketika dipindahkan dalam media proliferasi.

Perkembangan somatik embriogenesis dapat dilihat dari beberapa tahapan terbentuknya kalus embriogenik menjadi koleoptil, diantara tahapannya dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 4.2 Tahapan perkembangan somatik embriogenesis (a) fase pre embrio mass umur 4 mst, (b) fase globular umur 6 mst, (c) fase elongasi umur 7 mst, (d) fase skutelar umur 8 mst, (e) fase koleoptilar umur 9 mst.

Berdasarkan Gambar 4.2 diketahui bahwa tahap pembentukan kalus embriogenik pada media proliferasi dimulai dari fase pre-embrio mass pada umur 4 minggu dengan ciri-ciri struktur kalus yang halus dan berwarna putih keruh hingga bening. Fase globular pada umur 6 minggu dicirikan dengan terbentuknya tonjolan kecil pada permukaan kalus. Fase elongasi pada umur 7 minggu menunjukkan pemanjangan dari fase globular. Fase skutelar pada umur 8 minggu menunjukkan adanya spot-spot hijau pada permukaan kalus dan menyerupai bentuk daun. Fase koleoptilar pada umur 9 minggu menunjukkan bentuk daun yang semakin jelas dan berwarna hijau yang menunjukkan adanya klorofil, selanjutnya berkembang menjadi daun sempurna.

4.2 Hasil

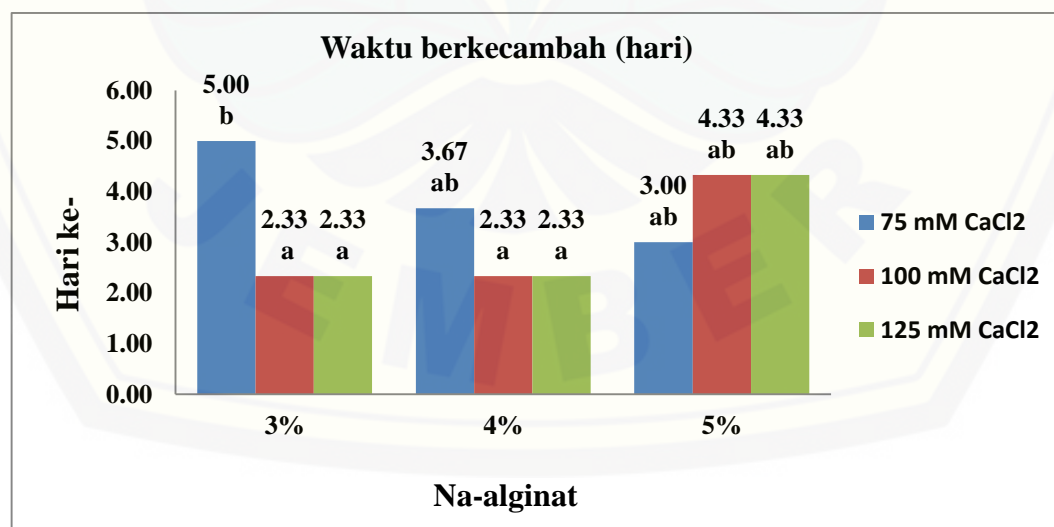
Hasil analisis ragam produksi dan pertumbuhan benih sintetik tebu menunjukkan interaksi antara pemberian Natrium alginat dan CaCl_2 memberi pengaruh yang nyata terhadap waktu berkecambah dan sangat nyata terhadap

jumlah dan presentase benih berkecambah, tetapi memberi pengaruh tidak berbeda nyata terhadap tinggi tanaman, jumlah tunas dan jumlah planlet. Pemberian Natrium alginat tunggal memberi pengaruh yang sangat nyata terhadap jumlah benih berkecambah, presentase berkecambah dan jumlah planlet. Selain itu memberi pengaruh yang nyata terhadap tinggi tanaman dan jumlah planlet, tetapi memberi pengaruh tidak berbeda nyata terhadap waktu berkecambah. Pemberian CaCl_2 tunggal memberi pengaruh tidak berbeda nyata terhadap semua parameter percobaan (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Hasil analisis ragam pada parameter waktu berkecambah, jumlah benih berkecambah, presentase berkecambah, tinggi tanaman, jumlah tunas dan jumlah planlet.

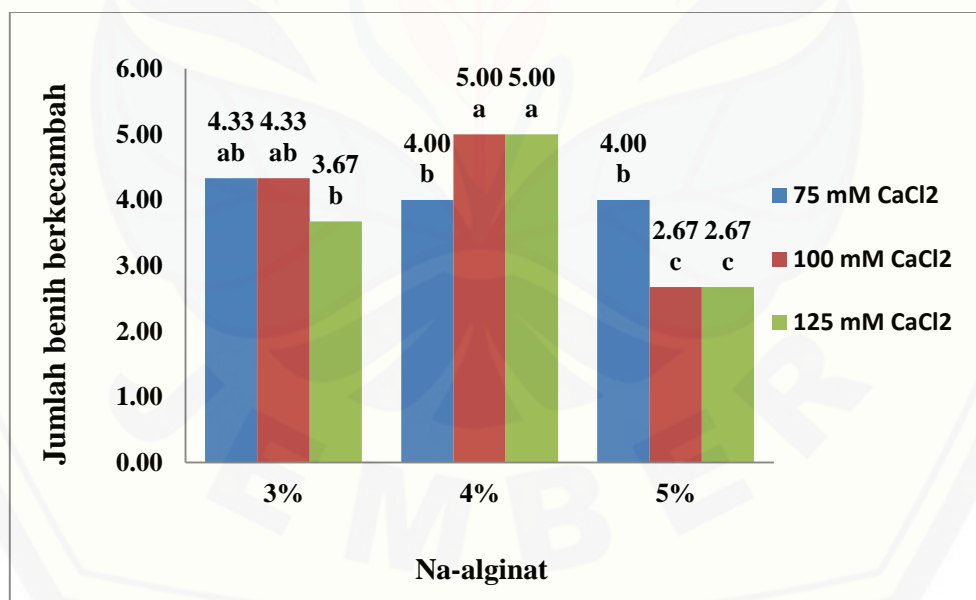
Parameter	Nilai Kuadrat Tengah			Eror
	Natrium alginat	CaCl_2	Interaksi Na-alginat dan CaCl_2	
Waktu berkecambah	2,81 ns	2,37 ns	4,15 *	1,20
Jumlah benih berkecambah	5,59 **	0,26 ns	1,48 **	0,16
Presentase berkecambah	2237,04 **	103,70 ns	592,59 **	64,81
Tinggi tanaman (cm)	3,78 *	0,38 ns	1,72 ns	0,92
Jumlah tunas	12,64 *	9,18 ns	2,74 ns	2,79
Tinggi planlet	20,89 *	3,43 ns	0,76 ns	1,10

Keterangan: (**) berbeda sangat nyata; (*) berbeda nyata; (ns) tidak berbeda nyata.

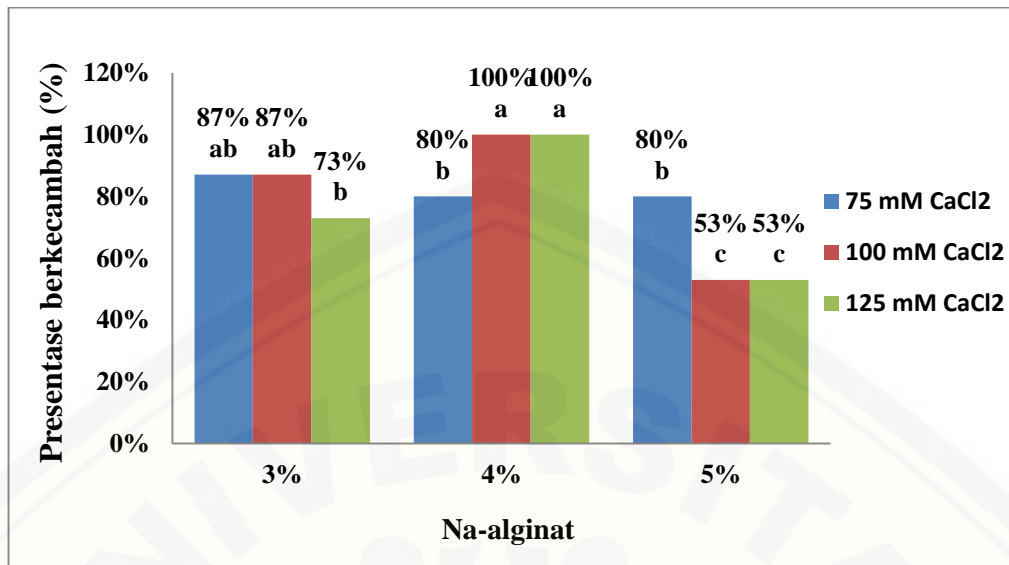


Gambar 4.3 Waktu perkecambahan benih sintetik tebu pada pemberian Na-alginat dan CaCl_2 yang berbeda.

Berdasarkan hasil uji lanjut pada parameter waktu berkecambah (Gambar 4.3) dapat diketahui bahwa nilai terbaik ditunjukkan pada rata-rata nilai terendah karena menunjukkan waktu perkecambahan benih yang paling cepat, sedangkan nilai yang tertinggi menunjukkan perkecambahan benih yang lambat. Waktu perkecambahan benih yang terbaik diperoleh dengan pemberian 3 - 4% Na-alginat + 100 - 125 mM CaCl₂ dengan rata-rata waktu 2,33 hari. Sedangkan pada pemberian 4-5% Na-alginat + 75 mM CaCl₂ dan 5% Na-alginat + 100 - 125 mM CaCl₂ menunjukkan rata-rata waktu berkecambah 3 sampai 4,33 hari. Waktu perkecambahan benih paling lama ditunjukkan pada penggunaan 3% Na-alginat + 75 mM CaCl₂ dengan rata-rata 5 hari. Hasil tersebut menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan waktu berkecambah 2,33 dan berbeda tidak nyata dengan waktu berkecambah 3 sampai 4,33 hari. Penggunaan kombinasi Natrium alginat dan CaCl₂ dengan konsentrasi paling rendah menunjukkan waktu perkecambahan benih paling lama diantara perlakuan lainnya. Hal tersebut karena kondisi benih yang terlalu lunak sehingga embrio lambat berkecambah dan matriks alginat gagal melapisi embrio, selanjutnya menghambat proses perkecambahan.

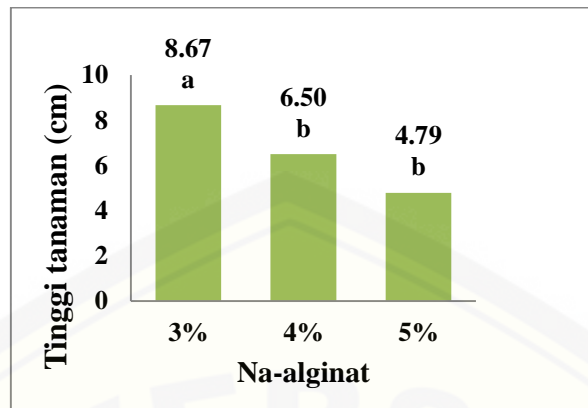


Gambar 4.4 Jumlah benih berkecambah pada pemberian Na-alginat dan CaCl₂ yang berbeda.



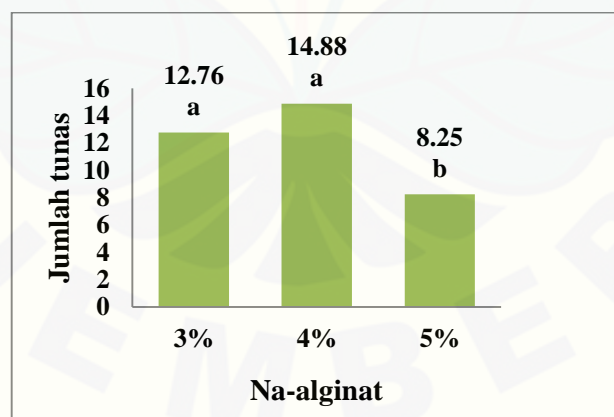
Gambar 4.5 Presentase perkecambahan benih sintetik tebu pada pemberian Na-alginat dan CaCl₂ yang berbeda.

Berdasarkan hasil jumlah benih berkecambah dan presentase perkecambahan (Gambar 4.4 dan 4.5) dengan pemberian 4% Na-alginat + 100 - 125 mM CaCl₂ menunjukkan nilai yang terbaik dengan rata-rata 5 benih yang berkecambah dan presentase perkecambahan sebesar 100%. Namun nilai tersebut tidak berbeda nyata dengan pemberian 3% Na-alginat + 75 dan 100 mM CaCl₂ dengan rata-rata 4,33 benih dan presentase 87%. Selanjutnya pemberian 3% Na-alginat + 125 mM CaCl₂, serta 4-5% Na-alginat + 75 mM CaCl₂ juga menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata yaitu dengan rata-rata 3,67 sampai 4 benih dan presentase berkecambah 73- 80%. Pemberian 5% Na-alginat + 100 - 125 mM CaCl₂ menunjukkan nilai yang paling rendah yaitu rata-rata 2,67 benih dan presentase perkecambahan 53%, hasil tersebut menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Penggunaan kombinasi Natrium alginat dan CaCl₂ dengan konsentrasi yang paling tinggi menunjukkan jumlah benih dan presentase berkecambah yang semakin rendah.



Gambar 4.6 Tinggi tanaman tebu pada konsentrasi Na-alginat yang berbeda

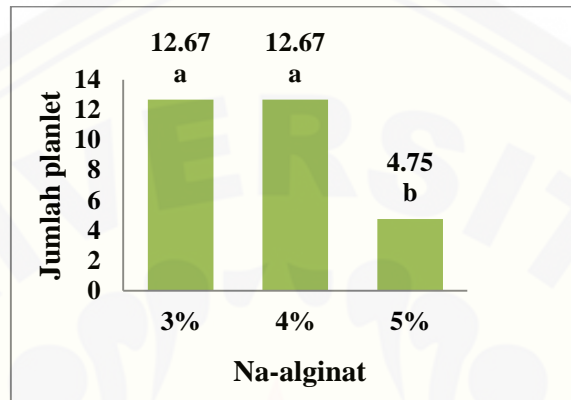
Pemberian kombinasi Na-alginat dan CaCl_2 dengan konsentrasi yang berbeda tidak memberikan interaksi yang nyata terhadap tinggi tanaman tebu, namun hanya berpengaruh nyata pada pemberian faktor tunggal Na-alginat. Gambar 4.6 menunjukkan bahwa perlakuan 3% Na-alginat menghasilkan tinggi tanaman terbaik dengan rata-rata 8,67 cm. Sedangkan pada pemberian 4-5% menunjukkan nilai rata-rata tinggi tanaman 6,50 dan 4,79 cm. Perlakuan 3% Na-alginat menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan perlakuan 4-5% Na-alginat. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi Na-alginat yang digunakan maka akan menghambat pertumbuhan tanaman, selanjutnya mempengaruhi tinggi tanaman yang semakin rendah.



Gambar 4.7 Jumlah tunas tanaman tebu pada konsentrasi Na-alginat yang berbeda

Berdasarkan Gambar 4.7 menunjukkan bahwa jumlah tunas tertinggi didapatkan pada pemberian 4% Na-alginat dengan rata-rata 14,88 tunas. Pemberian 3% Na-alginat mempunyai nilai yang berbeda tidak nyata yaitu rata-rata 12,76 tunas. Sedangkan pemberian 5% Na-alginat merupakan perlakuan yang

menghasilkan jumlah tunas paling rendah dengan rata-rata 8,25 tunas. Pemberian Natrium alginat paling tinggi menghasilkan jumlah tunas yang paling rendah. Hal tersebut dipengaruhi karena pemberian Natrium alginat yang terlalu tinggi akan menyebabkan kepadatan pada benih sehingga dapat menghambat munculnya tunas baru.



Gambar 4.8 Jumlah planlet tanaman tebu pada kosentrasi Na-alginat yang berbeda

Jumlah planlet terbaik didapatkan pada pemberian faktor tunggal 3-4% Na-alginat dengan rata-rata 12,67 planlet. Pemberian 3 - 4% Na-alginat menunjukkan nilai yang berbeda tidak nyata. Sedangkan pemberian 5% Na-alginat menunjukkan nilai yang berbeda nyata dengan jumlah rata-rata jumlah planlet 4,75 planlet. Jumlah planlet yang diamati berhubungan dengan jumlah tunas dan tinggi tanaman, sehingga hasil pemberian 5% Na-alginat terhadap tinggi tanaman, jumlah tunas dan jumlah planlet menunjukkan nilai yang sama yaitu didapatkan nilai yang paling rendah.

4.3 Pembahasan

Pertumbuhan benih sintetik dinilai dari kemampuan benih berkecambah dan tumbuh tinggi mencapai 80-100%. Benih dikatakan baik jika viabilitas benih tinggi, benih yang belum memiliki cadangan makanan yang cukup serta pembentukan embrio yang sempurna akan mempunyai viabilitas benih yang rendah. Cadangan makanan yang terkandung dalam jaringan digunakan sebagai sumber energi bagi embrio pada saat pertumbuhan (Sutopo, 2002). Hal ini sama dengan benih sintetik, jika benih sintetik tidak mempunyai cadangan makanan

yang cukup dan kondisi yang tidak mendukung maka viabilitas benih menjadi rendah atau kemampuan berkecambah benih rendah. Perkecambahan benih mempunyai hubungan erat dengan viabilitas benih dan jumlah benih yang berkecambah (Sadjad, 1993).

Benih sintetik diproduksi dari bagian koleoptil yang diperoleh dari somatik embriogenesis sebagai embrio benih. Somatik embriogenesis diawali dengan tahap induksi, induksi somatik embriogenesis merupakan tahap diferensiasi sel somatik menjadi sel kompeten embriogenik (Jimenez, 2001). Diferensiasi sel yang terjadi pada tahap induksi ditandai dengan inisiasi dan perbanyakan jumlah kalus. Gambar 4.1 menunjukkan tahapan perkembangan induksi kalus mulai minggu ke 1 sampai 5. Pemberian zat pengatur tumbuh pada media induksi menunjukkan adanya respon pembengkakan pada eksplan yang ditanam. Zat pengatur tumbuh yang diberikan pada media merupakan faktor yang dapat menyebabkan terjadinya pembelahan sel dan morfogenesis eksplan (Figuroa *et al.*, 2006).

Pembentukan kalus embriogenik dapat diperoleh setelah dipindahkan dalam media proliferasi. Sel embriogenik pada tahap proliferasi menunjukkan kompetensi embriogeniknya dan berdiferensiasi menjadi embrio somatik (Jimenez, 2001). Perkembangan kalus embriogenik membutuhkan waktu 9 minggu sampai membentuk koleoptil. Pada Gambar 4.2 menunjukkan perkembangan kalus embriogenik, hasil tersebut terlihat bahwa kalus embriogenik dicirikan berwarna putih kekuningan, berstruktur remah dan kering (Gandonou *et al.*, 2005). Morfologi dan perkembangan embrio somatik memiliki beberapa tahap yang berbeda yaitu fase globular, elongasi, skutelar dan koleoptilar untuk tanaman monokotil (Gill *et al.*, 2004). Bagian koleoptil ini yang akan digunakan dalam pembuatan benih sintetik.

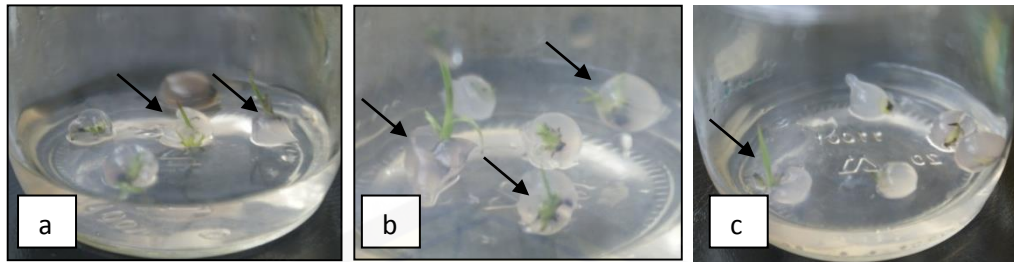
Hasil percobaan Reddy *et al.* (2012) bahwa embrio somatik dapat membentuk calon akar (radikal) dan calon tunas (plumul) yang mampu berkembang menjadi akar dan tunas secara bersama. Fase koleoptil dari hasil perbanyakan melalui somatik embriogenesis merupakan jaringan yang bersifat meristematik. Sifat meristematik berpotensi untuk mendukung perkembangan

jaringan tanaman menjadi tanaman yang lengkap. Hal tersebut akan berpengaruh baik terhadap produksi dan pertumbuhan benih sintetis.

Produksi dan pertumbuhan benih sintetis dipengaruhi oleh konsentrasi Natrium alginat dan CaCl_2 yang diberikan. Natrium alginat dan CaCl_2 merupakan bahan dalam pembuatan endoseperm benih sintetis. Natrium alginat berfungsi untuk menyimpan nutrisi yang dapat membantu kelangsungan hidup dan mempercepat pertumbuhan eksplan, namun penyerapan nutrisi juga dipengaruhi konsentrasi Natrium alginat yang digunakan. Sedangkan bahan CaCl_2 merupakan senyawa yang dapat mengeraskan gel, sehingga konsentrasinya juga berpengaruh pada pertumbuhan embrio (Asmah *et al.*, 2011). Selain itu zat pengatur tumbuh juga mempunyai peran dalam mendukung perkecambahan benih. BAP ditambahkan dalam media pembuatan benih sintetis berperan dalam meningkatkan perkecambahan benih. Hasil percobaan menyatakan konsentrasi BAP 1,5 mg/l yang terkandung dalam media enkapsulasi benih mampu meningkatkan perkecambahan benih mencapai 100% dalam waktu 5-8 hari pada kondisi terang (Asmah *et al.*, 2012).

Pengaruh pemberian konsentrasi Natrium alginat dan CaCl_2 yang berbeda akan menentukan produksi benih yang berbeda pula, selanjutnya akan mempengaruhi pertumbuhan benih. Produksi benih sintetis yang baik ditandai dengan kondisi benih yang keras atau kaku, bulat dan tekstur padat. Kondisi benih tersebut dapat menghasilkan presentase perkecambahan sebesar 94,9% (Sarmah *et al.*, 2010). Sedangkan percobaan Asmah *et al.* (2011) menyatakan bahwa produksi benih yang baik ditandai dengan bentuk benih yang bulat sehingga penyerapan nutrisi dapat lebih optimal. Penggunaan Natrium alginat dan CaCl_2 yang berbeda akan menentukan waktu pembentukan dan tingkat kekerasan benih (Asmah *et al.*, 2011). Sedangkan perbedaan ukuran benih tidak dipengaruhi oleh konsentrasi alginat dan CaCl_2 , tetapi dipengaruhi oleh diameter pipet *pasteur* yang digunakan (Nikhil dan Shukla, 2013).

Respon perkecambahan benih sintetis dapat berbeda karena dipengaruhi oleh pemberian konsentrasi Natrium alginat dan CaCl_2 yang berbeda, berikut gambar perkecambahan benih sintetis pada 4 hari setelah dikulturkan.



Gambar 4.9 Perkecambahan benih sintetik pada umur 4 hari; (a) konsentrasi 3% Na-alginat + 100 mM CaCl_2 , (b) 4% Na-alginat + 100 mM CaCl_2 dan (c) 5% Na-alginat + 100 mM CaCl_2 .

Perkecambahan benih sintetik ditandai dengan eksplan atau embrio yang dienkapsulasi muncul dan menembus kulit benih atau memecahkan gel (Machii, 1992). Gambar 4.9 menunjukkan perbedaan hasil perkecambahan benih sintetik pada umur yang sama pada hari ke 4. Pemberian konsentrasi 3-4% Na-alginat + 100 mM CaCl_2 menunjukkan perkecambahan yang lebih baik dibandingkan konsentrasi 5% Na-alginat + 100 mM CaCl_2 . Kemampuan perkecambahan benih dikatakan baik ditandai dengan kemampuan embrio menembus kulit benih. Pemberian konsentrasi 5% Na-alginat + 100 mM CaCl_2 menyebabkan embrio sulit menembus kulit karena terlalu keras sehingga perkecambahan benih terhambat. Perkecambahan benih yang baik selanjutnya akan mendukung pertumbuhan benih yang baik juga.

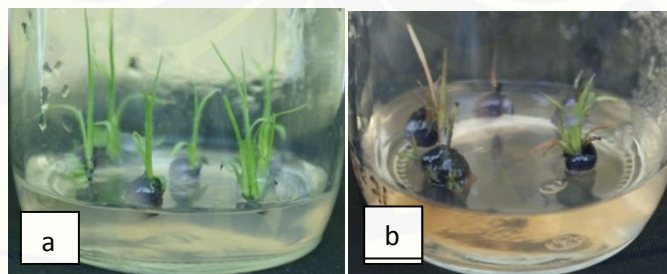
Perkecambahan benih sintetik dimulai pada rata-rata hari ke 2,33 sampai hari ke 5 setelah dikulturkan dalam media. Hasil percobaan menunjukkan bahwa pada rentang hari ke 7-10 dapat menghasilkan presentase benih berkecambah sebesar 80-100%. Hasil tersebut serupa dengan percobaan Asmah *et al.* (2011) bahwa perkecambahan benih sintetik pada *Acacia hybrid* dimulai pada hari ke 2 setelah dikulturkan dalam medium. Tingkat perkecambahan benih sintetik dengan durasi waktu 6-20 hari dapat menghasilkan presentase berkecambah 73 sampai 100 %. Namun hasil tersebut berbeda dari percobaan Sarmah *et al.* (2010) bahwa beberapa benih sintetik menunjukkan pemunculan akar dan tunas secara bersama setelah 10-12 hari dari permukaan benih sintetik saat pertumbuhan vegetatif.

Hasil pengamatan waktu berkecambah (Gambar 4.3) menunjukkan bahwa benih sintetik yang dibuat dengan konsentrasi Na-alginat dan CaCl_2 paling rendah

dan paling tinggi mempunyai nilai waktu perkecambahan benih paling lama dengan rata-rata waktu 4,33 sampai 5 hari. Kosentrasi 3% Na-alginat + 75 mM CaCl_2 dan 5% Na-alginat + 100, 125 mM CaCl_2 merupakan kosentrasi yang menghasilkan waktu perkecambahan paling lama. Penggunaan Natrium alginat dan CaCl_2 dengan kosentrasi yang rendah akan membentuk kapsul yang lunak, sedangkan dengan kosentrasi yang tinggi akan membentuk kapsul yang terlalu padat (keras). Kondisi kapsul yang terlalu lunak dan terlalu padat akan mempengaruhi daya hidup embrio dalam benih karena kondisi tersebut tidak mendukung pertumbuhan dan perkembangan embrio selanjutnya (Warnita dan Suliansyah, 2008).

Hasil percobaan menunjukkan bahwa pada kosentrasi 3% Na-alginat + 75 mM CaCl_2 menghasilkan waktu perkecambahan paling lama. Hal tersebut kemungkinan dipengaruhi oleh ukuran benih, tekstur benih dan kondisi embrio. Hasil percobaan Alatar dan Faisal (2012) menyatakan bahwa kosentrasi Natrium alginat dan CaCl_2 yang rendah tidak cocok, karena kemungkinan terjadi pengurangan gel setelah terkena suhu yang tinggi tinggi selama autoklaf. Namun kosentrasi tersebut masih dapat tumbuh dengan baik, sesuai hasil percobaan Alatar dan Faisal (2012) bahwa penggunaan 3% Natrium alginat dan 75 mM CaCl_2 pada *Rauvolfia tetraphylla* dapat berkecambah mencapai 70 persen.

Produksi benih sintetik menunjukkan pertumbuhan yang bervariasi. Perbedaan kosentrasi Natrium alginat dan CaCl_2 memperlihatkan jumlah dan presentase perkecambahan benih yang berbeda dilihat pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Pertumbuhan benih hari ke-14 pada kosentrasi (a) 4% Na-alginat + 100 mM CaCl_2 , dan (b) 5% Na-alginat + 125 mM CaCl_2 .

Jumlah dan presentase benih berkecambah (Gambar 4.10) pada kosentrasi 4% Na-alginat + 100 mM CaCl_2 menunjukkan pertumbuhan benih yang paling

baik. Pertumbuhan benih yang baik ditandai dengan jumlah dan presentasi benih yang berkecambah tinggi antara 73- 100%. Sedangkan pemberian 5% Natrium alginat + 125 mM CaCl_2 menunjukkan pertumbuhan terhambat, yang ditandai dengan jumlah dan presentase perkecambahan benih yang rendah 53%. Rendahnya jumlah dan presentase benih berkecambah disebabkan oleh kondisi benih berubah menjadi kecoklatan (*browning*), sehingga menghambat pertumbuhan benih.

Pemberian konsentrasi 4% Natrium alginat + 100 mM CaCl_2 menunjukkan pertumbuhan benih yang baik seperti yang dilaporkan Asmah *et al.* (2011) bahwa penggunaan Na-alginat antara 3-5% akan menghasilkan benih sintetik yang seragam, bentuk benih yang cukup kuat dan mempunyai pertumbuhan yang optimal jika penambahan konsentrasi bahan CaCl_2 juga sesuai. Karena konsentrasi CaCl_2 akan mempengaruhi frekuensi perubahan enkapsulasi eksplan. Hasil tersebut serupa dengan percobaan Jimenez dan Quiala (1998) bahwa perkecambahan benih dapat menjadi terhambat ketika konsentrasi Natrium alginat ditingkatkan, karena dengan penggunaan konsentrasi alginat yang tinggi dapat mematahkan ketahanan mekanik dan terjadi terkekurangan oksigen pada benih.

Jumlah dan presentase benih berkecambah paling rendah diperoleh pada pemberian konsentrasi yang tinggi yaitu 5% Natrium alginat + 125 mM CaCl_2 (Gambar 4.10). Penggunaan konsentrasi Natrium alginat yang tinggi akan menyebabkan kondisi kapsul yang terlalu padat, sehingga akan mempengaruhi daya hidup embrio karena kondisi tersebut tidak mendukung pertumbuhan dan perkembangan embrio selanjutnya (Warnita dan Suliansyah, 2008). Selain itu tingginya konsentrasi atau penggunaan CaCl_2 yang berlebihan dapat menyebabkan penyerapan dan penetrasi CaCl_2 yang berlebihan kedalam embrio benih. Selanjutnya akan terjadi hambatan pada pertumbuhan benih yang dapat berpengaruh pada penurunan respon perkecambahan dan perkembangan tanaman selanjutnya ketika dipindahkan di lapangan (Cartes *et al.*, 2009).

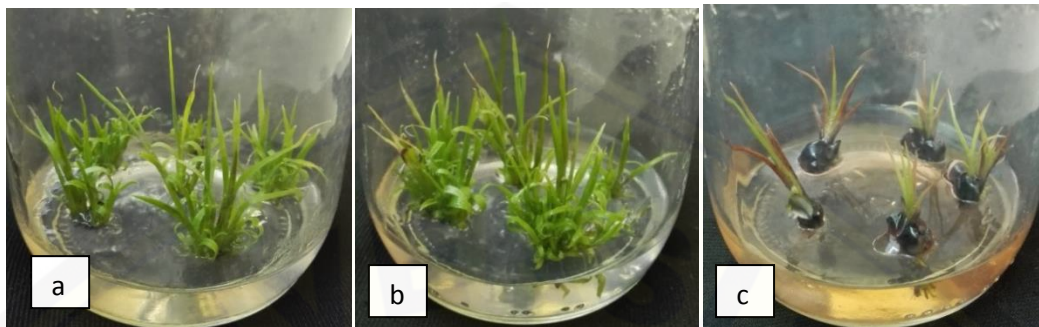
Penghambatan perkecambahan benih dapat berupa kehadiran inhibitor baik dalam benih maupun di permukaan benih, adanya larutan dengan nilai osmotik yang tinggi serta bahan yang menghambat lintasan metabolik atau

menghambat laju respirasi (Kuswanto, 1996). Hasil percobaan tersebut serupa bahwa konsentrasi larutan CaCl_2 yang terlalu tinggi akan menentukan nilai osmotik larutan yang tinggi sehingga embrio dapat menyerap CaCl_2 lebih banyak. Sedangkan konsentrasi Natrium alginat yang terlalu tinggi akan menyebabkan kondisi benih yang sangat keras. Kekerasan yang tinggi dalam benih akan menyebabkan lingkungan menjadi aerobik, dan selanjutnya dapat menghambat respirasi. Terhambatnya laju respirasi selanjutnya akan menghambat proses perkecambahan benih. Hasil penelitian Sarmah *et al.* (2010) menyatakan kekerasan benih sintetik tergantung pada ion Na^+ yang ditukar dengan ion Ca. Hal tersebut merupakan faktor internal yang berhubungan dengan perkembangan embrio dan merupakan faktor penting yang dapat mempengaruhi perkecambahan benih.

Rendahnya hasil jumlah dan presentase berkecambah pada perlakuan 5% Natrium alginat + 125 mM CaCl_2 disebabkan karena terjadi pencoklatan (*browning*) pada permukaan benih. Benih sintetik yang mengalami *browning* disebabkan karena fenol yang dihasilkan oleh tanaman akibat pemotongan jaringan teroksidasi dan menyebar ke seluruh permukaan benih. Embrio yang dienkapsulasi dengan konsentrasi Natrium alginat dan CaCl_2 yang tidak sesuai maka embrio tidak dapat bertahan dalam benih karena tidak dapat menyerap nutrisi dengan baik. Selanjutnya embrio akan mengeluarkan fenol dan fenol yang bersumber dari embrio akan menyebar ke permukaan benih, selanjutnya dapat mengakibatkan terjadinya *browning* pada benih.

Hasil penelitian Daisy (1994) menyebutkan bahwa *browning* disebabkan oleh senyawa fenol yang dihasilkan oleh eksplan yang mengalami oksidasi. Senyawa fenol akan teroksidasi membentuk quinon yang memiliki sifat racun terhadap sel-sel tanaman dan dapat menyebabkan kematian pada sel-sel tanaman. Oksidasi fenol menyebabkan pencoklatan medium dan kematian eksplan. Menurut Juma *et al.* (1994) penyebab utama pencoklatan karena terdapat luka akibat pemotongan pada jaringan. Luka tersebut memacu stress dan menyebabkan peningkatan aktifitas PAI (*Amonia lisase*) yang diikuti oleh produksi fenilpropanoid dan menyebabkan pencoklatan.

Pertumbuhan benih sintetik tanaman tebu menunjukkan respon yang berbeda jika dilihat dari pengaruh pemberian konsentrasi Natrium alginat yang digunakan seperti Gambar 4.11 berikut.



Gambar 4.11 Pertumbuhan tanaman tebu umur 48 hari pada konsentrasi (a) 3% Na-alginat, (b) 4% Na-alginat, (c) 5% Na-alginat.

Berdasarkan Gambar 4.11 menunjukkan pertumbuhan tanaman yang telah berumur 48 hari setelah dikulturkan. Hasil pengamatan parameter tinggi tanaman menunjukkan nilai yang berbeda nyata pada pemberian faktor tunggal Na-alginat. Tinggi tanaman terbaik didapatkan pada pemberian 3% Na-alginat, konsentrasi 3% merupakan konsentrasi yang optimal dalam mendukung pertumbuhan tanaman tebu, selanjutnya mempengaruhi tinggi tanaman tebu. Hasil percobaan tersebut sesuai dengan pendapat Sarmah *et al.* (2010) bahwa enkapsulasi dengan konsentrasi 3% Natrium alginat + 100 mM CaCl_2 merupakan konsentrasi optimal dalam menghasilkan benih sintetik yang mempunyai kemampuan tumbuh baik. Sedangkan tinggi tanaman yang rendah didapatkan pada pemberian 5% Na-alginat. Konsentrasi Natrium alginat yang tinggi (4-5%) dapat membentuk benih yang sangat keras dan dapat menekan munculnya tunas dan akar atau keduanya, sehingga dapat mengurangi frekuensi pertumbuhan. Selain itu pendapat Murthy *et al.* (2013) menyatakan bahwa penggunaan Natrium alginat dalam konsentrasi yang lebih tinggi 4-5% dapat menghasilkan benih yang terlalu keras dan menyebabkan terjadinya penundaan pertumbuhan sehingga mempengaruhi tinggi tanaman.

Pertumbuhan tanaman tebu hasil enkapsulasi benih sintetik sangat berbeda karena dipengaruhi oleh pemberian Natrium alginat. Hasil pengamatan jumlah tunas dan jumlah planlet didapatkan bahwa pada pemberian 3-4 % Natrium alginat menghasilkan rata-rata jumlah tunas dan planlet terbaik. Hal ini sesuai

dengan percobaan Bekheet (2006) bahwa penggunaan 3-4 % Natrium alginat untuk enkapsulasi benih pada *Allium sativum* dapat menghasilkan produksi jumlah tunas yang optimal. Kosentrasi 5% Na-alginat diketahui mempunyai pertumbuhan yang rendah jika dilihat dari jumlah tunas dan jumlah planlet. Selain itu pemberian 5% Na-alginat juga menunjukkan keterlambatan pertumbuhan akibat benih sintetik berubah menjadi kecoklatan (*browning*).

Terjadinya *browning* disebabkan karena embrio yang ada dalam benih tidak bertahan pada kosentrasi Natrium alginat yang terlalu tinggi, sehingga tanaman mengeluarkan fenol dan menyebabkan benih menjadi *browning*. Kondisi tersebut menyebabkan eksplan yang ada dalam benih tidak dapat menyerap nutrisi dengan baik. Selain itu embrio dalam benih tidak bertahan dan akhirnya menghambat pertumbuhan, selanjutnya mengurangi jumlah tunas dan planlet yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan pendapat Gill *et al.* (2004) bahwa terjadinya *browning* ditandai dengan adanya senyawa fenol, senyawa tersebut akan menyebabkan penyerapan nutrisi oleh eksplan menjadi terhambat sehingga mempengaruhi pertumbuhan tanaman.

Sehingga penggunaan 3-4% merupakan kosentrasi Natrium alginat yang optimal dalam mendukung pertumbuhan benih sintetik. Penggunaan Natrium alginat dengan kosentrasi dibawah 3% tidak cocok untuk enkapsulasi karena benih yang dihasilkan tidak jelas dan juga sulit untuk ditangani. Sementara jika kosentrasi Natrium alginat yang digunakan lebih tinggi maka akan membentuk benih yang isodiametrik dan sangat keras, sehingga menyebabkan keterlambatan yang cukup besar dalam regenerasinya (Faisal *et al.*, 2006). Pendapat tersebut sesuai dengan hasil percobaan bahwa dengan pemberian kosentrasi yang lebih tinggi (5%) menunjukkan keterlambatan pertumbuhan. Benih sintetik yang terbentuk dengan kosentrasi Natrium alginat yang tinggi yaitu 5% dapat menyebabkan kemampuan tunas dan akar untuk muncul lebih rendah (Daud *et al.*, 2008).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan data hasil penelitian dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Natrium alginat dan CaCl_2 berpengaruh nyata terhadap produksi dan pertumbuhan benih sitetik. Pemberian konsentrasi 4% Natrium alginat + 100 mM CaCl_2 menunjukkan produksi dan pertumbuhan benih sintetik yang paling baik.
2. Pemberian Natrium alginat tunggal berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan tanaman tebu. Produksi benih sintetik dengan konsentrasi 4% Natrium alginat menunjukkan pertumbuhan tanaman yang paling baik.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian terdapat beberapa saran yang dapat dijadikan bahan perbaikan, diantaranya sebagai berikut:

1. Pertumbuhan benih sintetik dapat lebih optimal jika tidak terjadi *browning* pada benih, sehingga diperlukan tambahan hormon yang dapat mengurangi terjadinya *browning* selama fase pertumbuhan benih.
2. Pencetakan benih dan pemilihan embrio harus mempunyai ukuran yang seragam sehingga pertumbuhan benih lebih seragam.

DAFTAR PUSTAKA

- Alatar, A. dan M. Faisal. 2012. Encapsulation of *Rauvolfia tetraphylla* Microshoots as Artificial Seeds and Evaluation of Genetic Fidelity Using RAPD and ISSR Markers. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(7): 1367-1374.
- Asmah, N., N. Hasnida, A. Noraliza, N. Zaimah dan N. Salmi. 2012. In Vitro Propagation of Acacia Hybrid Through-Encapsulated Shoots and Axillary Buds. *African Journal of Biotechnology*, 11(65): 12814-12817.
- Asmah, N., N. Hasnida, H.N. Zaimah, N.A. Noraliza dan N. Salmi. 2011. Synthetic Seed Technology For Encapsulation and Regrowth Of In Vitro-Derived Acacia Hyrid Shoot and Axillary Buds. *Biotechnology*, 10(40): 7820-7824.
- Bekheet S.A. 2006. A Synthetic Seed Method Through Encapsulation of In Vitro Proliferated Bulblets of Garlic (*Allium sativum* L.). *Arab J. biotech*, 9: 415-26.
- Bhojwani, S. S. dan M. K. Razdan. 1996. *Plant Tissue Culture : Theory and Practice, A Revised Edition*. Amsterdam: Elsevier science B. V.
- Cartes, P., H. Castellanos, D. Rios, K. Saez, S. Spierccolli dan M. Sanchez. 2009. Encapsulated Somatic Embryos and Zygotic Embryos For Obtaining Artificial Seeds Of Rauli-Beech (*Nothofagus Alpina*). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69(1): 112-119.
- Dahlan, D. 2011. *Budidaya Tanaman Industri*. Makassar: Universitas Hasanuddin.
- Daisy, H. 1994. *Teknik Kultur Jaringan: Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman Secara Vegetatif Modern*. Yogyakarta: Kanisus.
- Daud N., R.M. Taha dan N.A. Hasbullah. 2008. Artificial Seed Production From Encapsulated Micro Shoots Of *Saintpaulia ionantha* Wendl. *J. Appl. Sci*, 8(24): 4662-4667.
- Duriat, A.S. 1979. *Pengaruh Tobacco Mosaic Virus pada Beberapa Tanaman*. Masalah dan Pengendalian Penyakit Tanaman Pertanian Indonesia. PFI Bogor.
- Faisal M., N. Ahmad dan M. Anis. 2006. In Vitro Plant Regeneration From Alginate Encapsulated Microcuttings Of *Rauvolfia tetraphylla* L. *American-eurasian J. Agric. Environ. Sci*, 1: 1-6.

- Figuroa, F.R.Q., R.R. Herera, R.M.G. Avalos dan V.M.L. Vargas. 2006. Embryo Production Through Somatic Embryogenesis Can Be Used to Study Ceell Differentiation in Plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 86: 285-301.
- Gandonou, C., T. Errabi, J. Abrinii, M. Idaomari, F. Chibi dan N.S. Senhaji. 2005. Effect of Genotype on Callus Induction and Plant Regeneration from Leaf Explant of Surgance (*Saccharum* sp.). *Africa J. Biotechnol*, 4(11): 1250-1255.
- Gill N.K., R. Gill dan S.S. Gosal. 2004. Factors Enhancing Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration In Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Indian J. Biotechnol*, 3(4): 119-123.
- Gardner, F.P. 1991. *Fisiologi tanaman budidaya*. Jakarta : Universitas Indonesia (UI. Press).
- Herdiantoro, D. 2013. *Rancangan Faktorial, Rancangan Acak Lengkap dan Rancangan Acak Kelompok*. Jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian. Universitas Padjajaran.
- Husein, S., R. Ibrahim, dan A.L.P. Kiong. 2006. Somatic Embryogenesis: An Alternative Method for In Vitro Micropropagation. *Iranian Journal of Biotechnology*, 4(3): 156-161.
- Jimenez, E. dan E. Quiala. 1998. *Propagación Y Mejora Genetic De Plantas Por Biotecnología*. Instituto De Biotecnología De Las Plantas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Semilla artificial. Pérez.
- Jimenez, V.M. 2001. Regulation of In Vitro Somatic Embryogenesis with Emphasis on The Role of Endogenous Hormons. *R. Bras. Fisiol*, 13(2): 196-223.
- Juma, C., J.M. Magambo dan H. Monteith. 1994. Tissue Cultur for Coffee: The Case of Uganda. *Biotechnol. Dev. Mon*, 20:19-20.
- Kuswanto, H. 1996. *Dasar Dasar Teknologi, Produksi dan Sertifikasi Benih*. Yogyakarta: Andi Offset.
- Lizarraga, R. 1991. *Tissue Culture for Elimination of Pathogens*. Peru: International Potato Center.
- Machii, H. 1992. In Vitro Growth Of Encapsulated Adventitious Buds In Mulberry, *Morus Alba* L. *Jpn. J. Breed*, 42(2): 553-559.
- Mariska I. dan R. Suci. 2011. Pengadaan bibit tebu melalui kultur jaringan. *Litbang Pertanian Edisi 6 – 12 Juli 2011. No,3413 Tahun XLI*.

- Marlina, N. 2009. Teknik Perbanyakan Lili dengan Kultur Jaringan. *Teknik Pertanian*, 14(1): 6-8.
- Murthy, K.S.R., M.C Reddy dan R. Kondamudi. 2013. Synthetic Seeds - A Novel Approach For The Conservation of Endangered *C. spiralis* wt. and *C. pusilla*. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res*, 48(1): 39-42.
- Noviati, A. V. dan I. Roostika. 2004. Prospek Pengembangan Benih Sintetik di Indonesia. *AgoBio*, 6(2): 72-76.
- Nugrahani, P., Sukendah dan Makziah. 2011. *Regenerasi Eksplan Melalui Organogenesis dan Embriogenesis Somatik*. Surabaya: Universitas Pembangunan Nasional Veteran.
- Percy, R.E., K.Klimaszweska dan D.R Cry. 2000. *Evaluation of Somatic Embryogenesis for Clonal Propagation of Western White Pine*. Canada: NRC Research Press.
- Purmaningsih, R. 2002. Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Agrobio*, 5(2): 51-58.
- Putri, A. D., Sudiarsono dan T. Islami. 2013. Pengaruh Komposisi Media Tanam pada Teknik Bud Chip Tiga Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Produksi Tanaman*, 1(1): 16-23.
- Rahayu, I. 2007. *Praktis Belajar Kimia*. Jakarta: Grafindo Media Pratama.
- Ravi, D. dan P. Anand. 2012. Production and Applications of Artificial Seeds. *Biological Sciences*, 1(5): 74-78.
- Reddy, M.C., K.S.R Murthy, dan Pullaiah. 2012. Synthetic Seeds: A Review in Agriculture and Forestry. *Biotechnology*, 11(78): 14254-14275.
- Roostika, I., R. Purmaningsih, Y. Supriati, I. Mariska, N. Khumaida dan G.A. Wattimena. 2012. Pembentukan Benih Sintetik Tanaman Nenas. *Hortikultura*, 22(4): 316-326.
- Roostika, I. 2013. Perkembangan Aplikasi Teknik Kriopreservasi untuk Konservasi dan Mendukung Program Pemuliaan Tanaman. *Agro. Biogen*, 9(1): 39-48.
- Rosmayati. 1993. *Penggunaan BAP dan NAA Pada Kultur Mata Tunas Gladiolus hybridus Secara Kultur Jaringan*. Laporan Penelitian. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Sadjad, S. 1993. *Dari Benih Kepada Benih*. Jakarta: Grasindo.

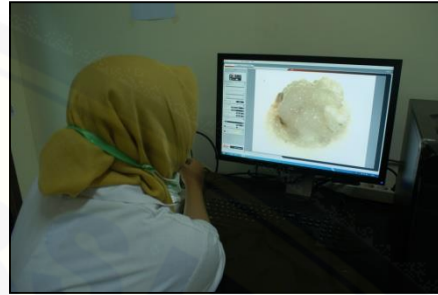
- Sarmah, D. K., M. Borthakur dan P.K Borua. 2010. Artificial Seed Production From Encapsulated PLBs Regenerated From Leaf Base Of Vanda Griffth. Ex. Lindl. –An Endangered Orchid. *Current Science*, 98(5): 686-690.
- Sukmadjaja, D. dan A. Mulayana. 2011. Regenerasi dan Pertumbuhan Beberapa Varietas Tebu (*Saccharum officinarum*) secara In Vitro. *AgroBiogen*, 7(2): 106-118.
- Sutopo, L. 2002. *Teknologi Benih*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Toharisman, A. 2013. *Bibit Tebu Asal Kultur Jaringan*. P3GI. Indonesian Sugar Research Institute.
- Warnita dan I. Suliansyah. 2008. Pertumbuhan dan Ketahanan Bibit Mikro Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Enkapsulasi pada Beberapa Kosentrasi Alginat. *Jerami*, 1(3): 139-143.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Yuwono, T. 2008. *Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta: Gadjja Masa University Press.
- Zhang, Y.F. 2011. Factors Affecting Germination and Propagators Of Artificial Seed Of *Dendrobium candidum*. *Advances In Biomedical Enginerring*, 1(2): 13-20.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi kegiatan penelitian



a. Kegiatan di laminar



b. Pengamatan mikroskop



c. Pembuatan media



d. Proses Autoklaf



e. Pengamatan di ruang kultur

Lampiran 2. Produksi benih sintetik



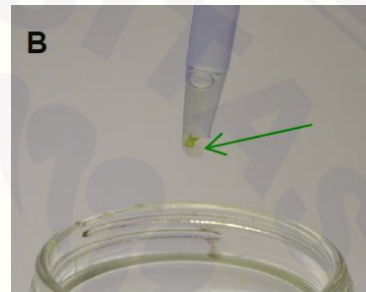
a. Bahan pembuatan benih sintetik



b. Koleoptil (sebagai embrio)



c. Memasukkan embrio dalam alginat



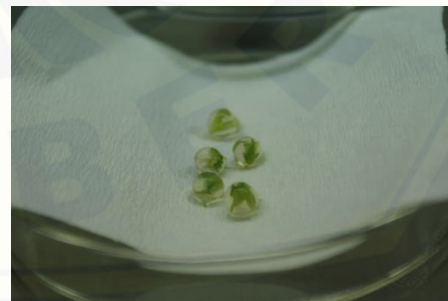
d. Pengambilan dengan pipet



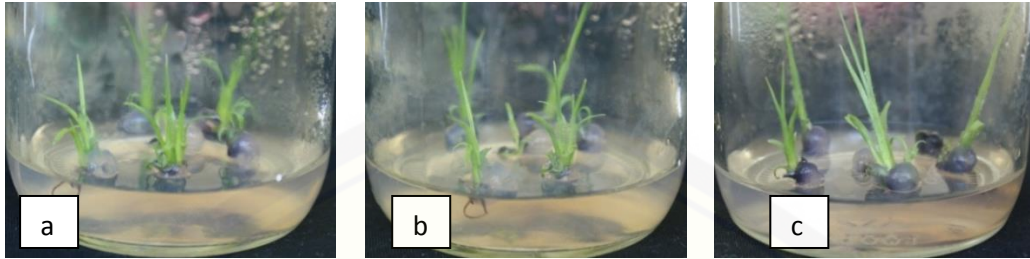
e. Pengerasan benih dalam CaCl_2



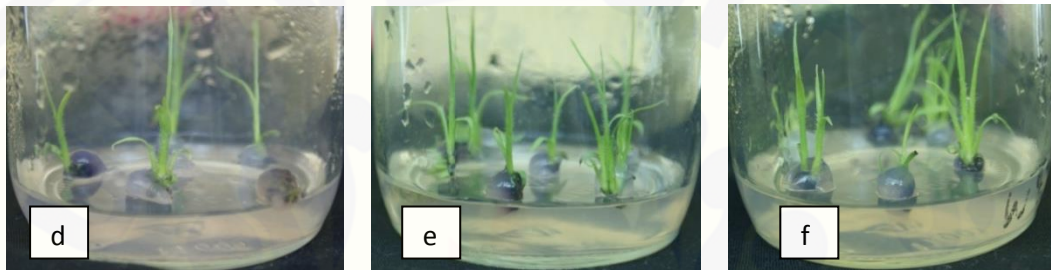
f. Pengeringan benih



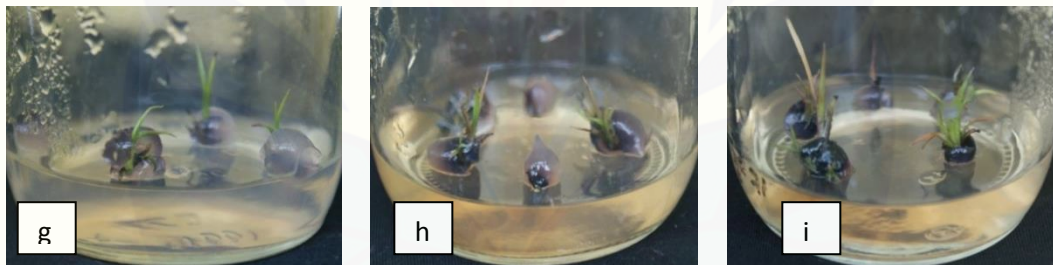
g. Benih sintetik

Lampiran 3. Pertumbuhan benih sintetik umur 14 hari

(a) 3% Na-alginat + 75 mM CaCl₂, (b) 3% Na-alginat + 100 mM CaCl₂, (c) 3% Na-alginat + 125 mM CaCl₂



(d) 4% Na-alginat + 75 mM CaCl₂, (e) 4% Na-alginat + 100 mM CaCl₂, (f) 4% Na-alginat + 125 mM CaCl₂



(g) 5% Na-alginat + 75 mM CaCl₂, (h) 5% Na-alginat + 100 mM CaCl₂, (i) 5% Na-alginat + 125 mM CaCl₂.

Lampiran 4. Data waktu perkecambahan benih**Parameter : Waktu berkecambah****Desain : RAL Faktorial 3x3**

Na-alginat (N) x CaCl ₂ (C)	Ul. 1	Ul.2	Ul.3	Total	Rata2
N1C1	7	5	3	15	5.00
N1C2	3	2	2	7	2.33
N1C3	3	2	2	7	2.33
N2C1	3	5	3	11	3.67
N2C2	3	2	2	7	2.33
N2C3	3	2	2	7	2.33
N3C1	3	3	3	9	3.00
N3C2	7	3	3	13	4.33
N3C3	7	3	3	13	4.33
Total	39	27	23	89	3.15

Sidik Ragam

SK	db	JK	KT	F-Hitung	F Tabel		
					5%	1%	
Rep	2	15.41	7.70	6.40		3.63	6.23
Perlakuan	8	26.96	3.37	2.80	*	2.59	3.89
Na-alginat (A)	2	5.63	2.81	2.34	ns	3.63	6.23
CaCl ₂ (B)	2	4.74	2.37	1.97	ns	3.63	6.23
A X B	4	16.59	4.15	3.45	*	3.01	4.77
Eror	16	19.26	1.20				
Total	26	61.63	2.37				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata, * Berbeda nyata, ns: Tidak berbeda nyata
CV : 33,28%

Uji jarak berganda Duncan

Perlakuan	Notasi	Jarak	DMRT 5%	UJD 5%
N1C1	b			
N3C2	ab	2	3.00	1.90
N3C3	ab	3	3.15	1.99
N2C1	ab	4	3.23	2.04
N3C1	ab	5	3.30	2.09
N2C3	a	6	3.34	2.11
N2C2	a	7	3.37	2.13
N1C3	a	8	3.39	2.14
N1C2	a	9	3.41	2.16

Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan 5%.

Lampiran 5. Data jumlah benih berkecambah**Parameter : Jumlah benih berkecambah****Desain : RAL Faktorial 3x3**

Perlakuan	Ul. 1	Ul.2	Ul.3	TOTAL	Rata2
N1C1	4	4	5	13	4.33
N1C2	4	4	5	13	4.33
N1C3	4	3	4	11	3.67
N2C1	4	4	4	12	4.00
N2C2	5	5	5	15	5.00
N2C3	5	5	5	15	5.00
N3C1	4	3	5	12	4.00
N3C2	3	2	3	8	2.67
N3C3	3	2	3	8	2.67
TOTAL	36	32	39	107	3.96

Sidik Ragam

SK	db	JK	KT	F-Hitung	F-tabel		
					5%	1%	
Rep	2	2.74	1.37	8.46	3.63	6.23	
Perlakuan	8	17.63	2.20	13.60	**	2.59	3.89
Na-alginat (A)	2	11.19	5.59	34.51	**	3.63	6.23
CaCl ₂ (B)	2	0.52	0.26	1.60	ns	3.63	6.23
A X B	4	5.93	1.48	9.14	**	3.01	4.77
Eror	16	2.59	0.16				
Total	26	22.96	0.88				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata, * Berbeda nyata, ns: Tidak berbeda nyata
CV : 10,16%

Uji Jarak Berganda Duncan

Perlakuan	Notasi	Jarak	DMRT 5%	UJD 5%
N2C2	a			
N2C3	a	2	3.00	0.69
N1C1	ab	3	3.15	0.73
N1C2	ab	4	3.23	0.94
N2C1	b	5	3.30	0.96
N3C1	b	6	3.34	0.97
N1C3	b	7	3.37	0.98
N3C2	c	8	3.39	0.98
N3C2	c	9	3.41	0.99

Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan 5%.

Lampiran 6. Data presentase perkecambahan benih**Parameter : Presentase perkecambahan benih****Desain : RAL Faktorial 3x3**

Perlakuan	Ul. 1	Ul.2	Ul.3	TOTAL	Rata2
N1C1	80	80	100	260	86.67
N1C2	80	80	100	260	86.67
N1C3	80	60	80	220	73.33
N2C1	80	80	80	240	80.00
N2C2	100	100	100	300	100.00
N2C3	100	100	100	300	100.00
N3C1	80	60	100	240	80.00
N3C2	60	40	60	160	53.33
N3C3	60	40	60	160	53.33
TOTAL	720	640	780	2140	79.26

Sidik Ragam

SK	db	JK	KT	F-Hitung		F-tabel	
						5%	1%
Rep	2	1096.30	548.15	8.46		3.63	6.23
Perlakuan	8	7051.85	881.48	13.60	**	2.59	3.89
Na-alginat (A)	2	4474.07	2237.04	34.51	**	3.63	6.23
CaCl ₂ (B)	2	207.41	103.70	1.60	ns	3.63	6.23
A X B	4	2370.37	592.59	9.14	**	3.01	4.77
Eror	16	1037.04	64.81				
Total	26	9185.19	353.28				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata, * Berbeda nyata, ns: Tidak berbeda nyata
CV : 10,16%

Uji Jarak Berganda Duncan

Perlakuan	Notasi	Jarak	DMRT 5%	UJD 5%
N2C2	a			
N2C3	a	2	3.00	13.94
N1C1	ab	3	3.15	14.64
N1C2	ab	4	3.23	18.48
N3C1	b	5	3.30	18.88
N2C1	b	6	3.34	19.10
N1C3	b	7	3.37	19.28
N3C2	c	8	3.39	19.39
N3C3	c	9	3.41	19.51

Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan 5%.

Lampiran 7. Data tinggi tanaman**Parameter : Tinggi tanaman****Desain : RAL Faktorial 3x3**

Perlakuan	Ul. 1	Ul.2	Ul.3	TOTAL	Rata2
N1C1	2.00	2.10	2.31	6.41	2.14
N1C2	2.10	7.10	2.50	11.7	3.90
N1C3	2.00	3.20	2.70	7.9	2.63
N2C1	1.90	2.30	3.20	7.4	2.47
N2C2	1.30	2.10	2.40	5.80	1.93
N2C3	2.10	1.90	2.30	6.3	2.10
N3C1	1.40	2.60	2.90	6.9	2.30
N3C2	0.70	1.40	1.73	3.83	1.28
N3C3	1.20	1.12	1.33	3.65	1.22
TOTAL	14.7	23.82	21.37	59.89	2.22

Sidik Ragam

SK	db	JK	KT	F-Hitung		F-tabel	
						5%	1%
Rep	2	4.95	2.48	2.69		3.63	6.23
Perlakuan	8	15.18	1.90	2.06	ns	2.59	3.89
Na-alginat (A)	2	7.55	3.78	4.10	*	3.63	6.23
CaCl ₂ (B)	2	0.77	0.38	0.42	ns	3.63	6.23
A X B	4	6.87	1.72	1.87	ns	3.01	4.77
Eror	16	14.72	0.92				
Total	26	34.85					

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata, * Berbeda nyata, ns: Tidak berbeda nyata
CV : 43,23%

Uji Jarak Berganda Duncan

Perlakuan	Notasi	Jarak	DMRT 5%	UJD 5%
3%	a			
4%	b	2	3.00	1.66
5%	b	3	3.15	1.74

Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan 5%.

Lampiran 8. Data jumlah tunas**Parameter : Jumlah tunas****Desain : RAL Faktorial 3x3**

Perlakuan	Ul. 1	Ul.2	Ul.3	TOTAL	Rata2
N1C1	1.75	9.60	3.60	14.95	4.98
N1C2	3.00	4.00	5.00	12.00	4.00
N1C3	3.00	5.00	3.33	11.33	3.78
N2C1	6.00	6.00	3.00	15.00	5.00
N2C2	3.00	7.30	6.00	16.30	5.43
N2C3	4.00	6.00	3.33	13.33	4.44
N3C1	2.50	6.00	7.00	15.50	5.17
N3C2	2.00	1.30	1.33	4.63	1.54
N3C3	1.00	2.00	1.33	4.33	1.44
TOTAL	26.25	47.2	33.92	107.37	3.98

Sidik Ragam

SK	db	JK	KT	F-Hitung		F-tabel	
						5%	1%
Rep	2	24.97	12.48	4.48		3.63	6.23
Perlakuan	8	54.59	6.82	2.45	ns	2.59	3.89
Na-alginat (A)	2	25.28	12.64	4.53	*	3.63	6.23
CaCl ₂ (B)	2	18.36	9.18	3.29	ns	3.63	6.23
A X B	4	10.95	2.74	0.98	ns	3.01	4.77
Eror	16	44.60	2.79				
Total	26	124.15					

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata, * Berbeda nyata, ns: Tidak berbeda nyata
CV : 31,32%

Uji Jarak Berganda Duncan

Perlakuan	Notasi	Jarak	DMRT 5%	UJD 5%
3%	a			
4%	a	2	3.00	2.89
5%	b	3	3.15	3.04

Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan 5%.

Lampiran 9. Data jumlah planlet**Parameter : Jumlah planlet****Desain : RAL Faktorial 3x3**

Perlakuan	Ul. 1	Ul.2	Ul.3	TOTAL	Rata2
N1C1	5.00	5.00	3.50	13.50	4.50
N1C2	4.50	2.50	5.00	12.00	4.00
N1C3	5.00	3.50	4.00	12.50	4.17
N2C1	6.00	6.00	3.00	15.00	5.00
N2C2	3.00	4.00	3.50	10.50	3.50
N2C3	3.00	5.00	4.50	12.50	4.17
N3C1	2.00	2.00	4.00	8.00	2.67
N3C2	1.50	1.50	1.25	4.25	1.42
N3C3	1.00	0.50	0.50	2.00	0.67
TOTAL	31	30	29.25	90.25	3.34

Sidik Ragam

SK	db	JK	KT	F-Hitung		F-tabel	
						5%	1%
Rep	2	0.17	0.09	0.08		3.63	6.23
Perlakuan	8	51.69	6.46	5.89	**	2.59	3.89
Na-alginat (A)	2	41.78	20.89	19.06	**	3.63	6.23
CaCl ₂ (B)	2	6.87	3.43	3.13	ns	3.63	6.23
A X B	4	3.04	0.76	0.69	ns	3.01	4.77
Eror	16	17.54	1.10				
Total	26	69.39					

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata, * Berbeda nyata, ns: Tidak berbeda nyata
CV : 41,98%

Uji Jarak Berganda Duncan

Perlakuan	Notasi	Jarak	DMRT 5%	UJD 5%
3%	a			
4%	a	2	3.00	1.82
5%	b	3	3.15	1.91

Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan 5%.