



**MIKROPROPAGASI TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.)
VARIETAS NXI 1-3 MELALUI EMBRIOGENESIS SOMATIK**

SKRIPSI

Oleh

FIRDHA NARULITA ALFIAN

NIM 101510501013

PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI

FAKULTAS PERTANIAN

UNIVERSITAS JEMBER

2015



**MIKROPROPAGASI TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.)
VARIETAS NXI 1-3 MELALUI EMBRIOGENESIS SOMATIK**

SKRIPSI

diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk menyelesaikan
Program Sarjana pada Program Studi Agroteknologi
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh:
FIRDHA NARULITA ALFIAN
NIM 101510501013

**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. Ayahanda Alfian dan Ibunda Sri Winarni, terima kasih atas semua doa, pengorbanan, cinta, kasih sayang, dan nasehat sepanjang masa yang tak mungkin terbalaskan dengan apapun, serta kedua adikku Hasna Amalia Alfian dan M. Haidar Razan Alfian yang senantiasa memberikan canda tawa, semangat dan motivasi, semoga Allah senantiasa melindungi dan meridhoi kalian.
2. Seluruh keluarga besar serta sahabat-sahabat yang selalu menemani, membantu, memberi nasehat, saling mendoakan, dan saling berjuang dalam suka dan duka.
3. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”
(QS. Al-Inshirah: 5)*)

“Jika kalian berbuat baik, sesungguhnya kalian berbuat baik
bagi diri kalian sendiri”
(QS. Al-Isra: 7)*)



*¹) Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. *Al Qur'an dan Terjemahan*. Syaamil Cipta Media. Bandung.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Firdha Narulita Alfian

NIM : 101510501013

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Mikropropagasi Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Varietas NXI 1-3 Melalui Embriogenesis Somatik”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun serta bukan jiplakan. 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, 05 Mei 2015

Yang menyatakan,

Firdha Narulita Alfian
NIM. 101510501013

SKRIPSI

**MIKROPROPAGASI TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.)
VARIETAS NXI 1-3 MELALUI EMBRIOGENESIS SOMATIK**

Oleh

**FIRDHA NARULITA ALFIAN
NIM 101510501013**

Pembimbing :

Pembimbing Utama : Ir. Didik Pudji Restanto, MS., PhD

NIP.196504261994031001

Pembimbing Anggota : Ir. Sigit Soeparjono, MS., PhD

NIP. 196005061987021001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Mikropropagasi Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Varietas NXI 1-3 Melalui Embriogenesis Somatik**” telah diuji dan disahkan pada :

Hari : Selasa
Tanggal : 05 Mei 2015
Tempat : Fakultas Pertanian

Dosen Pembimbing Utama,

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

Dosen Pembimbing Anggota,

Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D.
NIP. 196005061987021001

Dosen Penguji,

Ir. Kacung Hariyono, MS., Ph.D.
NIP. 196408141995121001

Mengesahkan
Dekan,

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

RINGKASAN

Mikropropagasi Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) varietas NXI 1-3 Melalui Embriogenesis Somatik; Firdha Narulita Alfian; 101510501013; 2015; 55 Halaman; Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian; Universitas Jember.

Metode embriogenesis somatik sangat dipertimbangkan untuk perbanyak tanaman secara in-vitro karena keuntungannya seperti laju pertumbuhan yang tinggi, berpotensi untuk meningkatkan hasil perbanyak menggunakan bioreactor, dan untuk memproduksi benih sintetik. Perkembangan embrio somatik sebagian besar dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh (ZPT), sumber eksplan, sumber nitrogen dan karbon. Auksin mempunyai peran penting untuk menginduksi kalus dimana 2,4-D merupakan auksin yang paling banyak digunakan dalam perbanyak tanaman secara in-vitro. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menemukan metode mikropropagasi yang cepat untuk tebu varietas unggul NXI 1-3 melalui embriogenesis somatik.

Percobaan dilakukan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, CDAST Universitas Jember dari September 2014 hingga Februari 2015. Gulungan daun diisolasi dari tanaman tebu yang sehat dan berumur 6 bulan yang berasal dari lapang kemudian ditumbuhkan pada media MS (IK1, IK2, IK3) yang mengandung 2,4-D (0,3, dan 4 ppm) dengan Casein Hydrolisate (300 ppm) untuk menginduksi kalus embriogenik. Kalus embriogenik kemudian diproliferasikan di media MS (PK1, PK2, PK3) yang mengandung 2,4-D (0, 1.5, 2 ppm) dengan Casein Hydrolisate (300 ppm) dan L-Proline (560 ppm), kemudian diregenerasikan pada media MS (RK1, RK2, RK3, RK4, RK5) dengan atau tanpa Casein Hydrolisate (300 ppm) dan L-Glutamine (100 ppm). Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor (perbedaan level zat pengatur tumbuh) dilanjutkan dengan uji berjarak Duncan (DMRT) level 5% pada tahap induksi kalus dan kontras orthogonal pada tahap regenerasi kalus.

Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa media IK1 (kontrol) tanpa adanya penambahan ZPT sangat berbeda nyata terhadap media dengan penambahan ZPT (media IK2 dan IK3) pada parameter waktu induksi kalus dan presentase kalus yang terbentuk. Penambahan auksin dalam percobaan ini yaitu 4 ppm 2,4-D (media IK3), memberikan hasil terbaik diikuti dengan pemberian 3 ppm 2,4-D (media IK2).

Embrio somatik terbentuk pada tahap proliferasi kalus. Inkubasi kalus embriogenik pada perlakuan media proliferasi kalus setelah 2 minggu menunjukkan kemunculan tahapan-tahapan embrio somatik hanya pada media PK2 dan PK3. Sedangkan media PK1 menghasilkan kalus yang kecokelatan. Sementara itu, hasil uji kontras orthogonal menunjukkan bahwa penambahan asam amino L-Glutamin dan Casein Hydrolisate memberikan respon yang lebih baik untuk regenerasi planlet.

Kata kunci : Embriogenesis Somatik, Tebu, Varietas NXI 1-3

SUMMARY

Micropropagation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) variety NXI 1-3 through Somatic Embryogenesis; Firdha Narulita Alfian; 101510501013; 2015; 55 Pages; Agrotechnology Study Program; Faculty of Agriculture; University of Jember.

Somatic embryogenesis is considered for in-vitro plant propagation because of its advantages those are a high multiplication rate, potentially scale-up propagation using bioreactors, and produce synthetic seeds. Somatic embryos development is mostly stimulated by plant growth regulator (PGR), source of explants, and source of nitrogen and carbon. Auxin plays an important role to induce the embryogenic callus whics is 2,4-D is the most common synthetic auxin used in in-vitro plant propagation. The purpose of this experiment is to find a method for rapid micropropagation of commercial sugarcane variety NXI 1-3 through Somatic Embryogenesis (SE).

The experiment was conducted at the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology Division of CDAST, University of Jember from September 2014 to February 2015. Leaf rolls isolated from 6 months healthy field cultivated sugarcane then cultured on MS medium (IK1, IK2, IK3) containing 2,4-D (0, 3, and 4 ppm) with Casein Hydrolisate (300 ppm) to induce embryogenic callus. The resulted embryogenic callus was proliferated in MS medium (PK1, PK2, PK3) containing 2,4-D (0, 1.5, 2 ppm) with Casein Hydrolisate (300 ppm) and L-Proline (560 ppm), then regenerated in MS medium (RK1, RK2, RK3, RK4, RK5) containing BAP (0, 0.25, and 0.5 ppm) with or without Casein Hydrolisate (300 ppm) and L-Glutamine (100 ppm). Experiment using Completely Randomized Design (different level of plant growth regulator) followed by Duncan's multiple range test (DMRT) level 5% for callus induction stage and orthogonal contrast test for callus regeneration stage.

The result showed that IK1 media (control) without any addition of PGR significantly different to the media treatment with the addition of PGR (IK2 and IK3 media) on the parameters of callus induction time and the percentage of callus formed. The addition of high auxin, in this trial which is 4 ppm 2,4-D (IK3 media), yielded the best result for callus induction time and the percentage of callus formed.

Somatic embryos were formed in proliferation stage. Incubation of embryogenic callus in proliferation media treatment after about 2 weeks showed the existence of somatic embryos stages from only on PK2 and PK3 media. Whereas, PK1 media produced the browning callus. Meanwhile, orthogonal contrast test results showed that the addition of amino acid of L-Glutamine and Casein Hydrolisate provided a better response to plantlet regeneration.

Key words : *Somatic Embryogenesis, sugarcane, NXI 1-3*

PRAKATA

Puji syukur penulis kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan ridhonya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi yang berjudul “Mikropropagasi Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Varietas NXI 1-3 Melalui Embriogenesis Somatik” sebagai syarat untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pertanian.

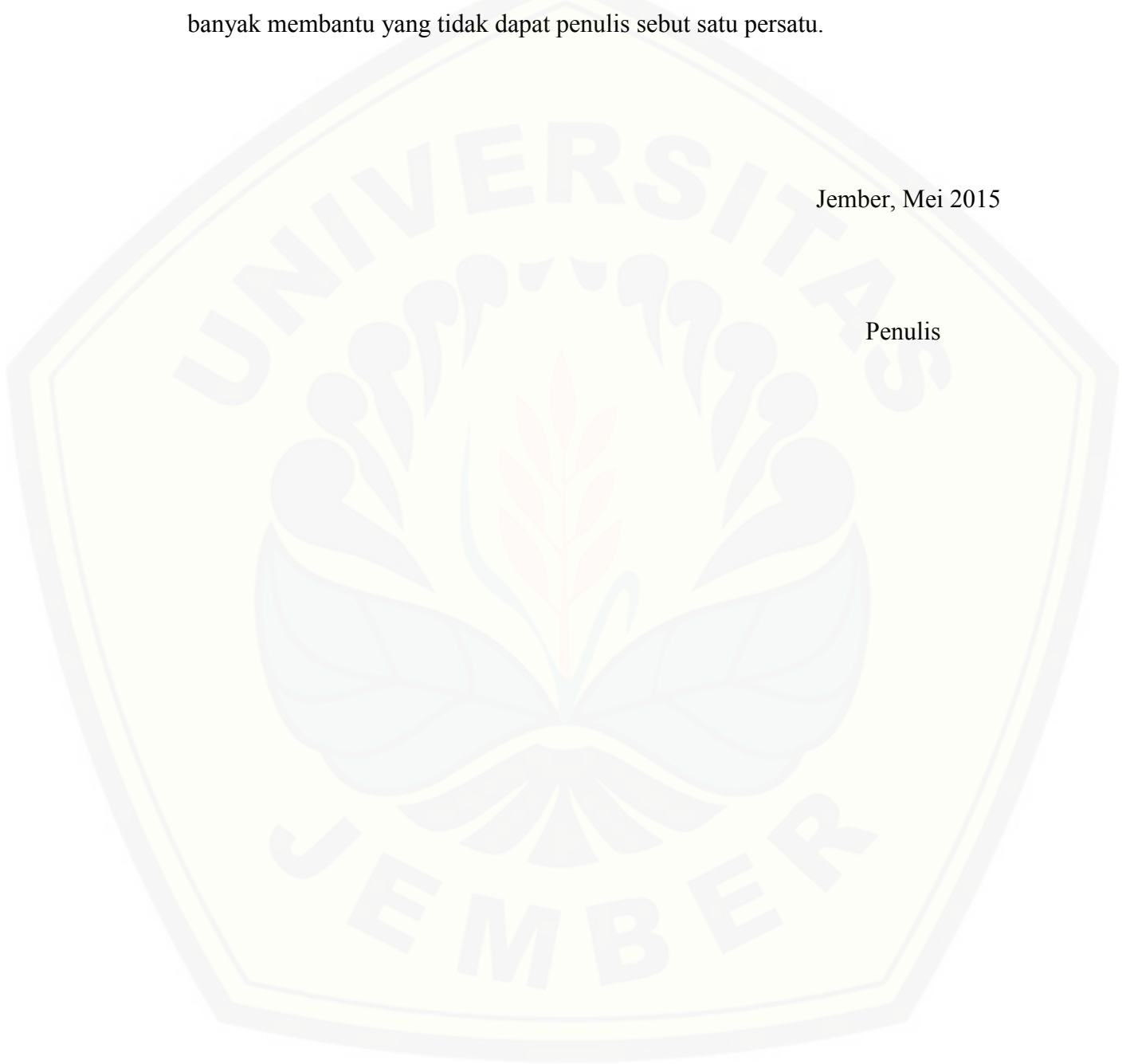
Penyelesaian karya tulis (skripsi) ini tak lepas dari dukungan dan motivasi semua pihak dan penulis mengucapkan terima kasih yang mendalam terutama kepada :

1. Dr. Ir. Jani Januar, MT selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember,
2. Ir. Hari Purnomo, MSi., PhD., DIC selaku Kepala Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
3. Ir. Didik Pudji Restanto, MS., PhD selaku Dosen Pembimbing Utama, Ir. Sigit Soeparjono, MS., PhD selaku Dosen Pembimbing Anggota, dan Ir. Kacung Hariyono, MS., PhD sebagai dosen penguji yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, ilmu, pengalaman, dukungan penuh, serta masukan dalam penyelesaian skripsi ini.
4. Ir. Hartadi, MS selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan pengarahan dan arahan penulis selama masa perkuliahan.
5. Ibunda Sri Winarni dan Ayahanda Alfian yang penulis hormati, serta adinda Hasna Amalia Alfian dan M. Haidar Razan Alfian yang penulis sayangi. Terima kasih tiada tara penulis ucapan atas dukungan moril maupun materi yang diberikan dari awal sampai akhir.
6. Prof. Bambang Sugiharto selaku Kepala Laboratorium CDAST beserta seluruh staff dan rekan kerja sesama peneliti yang telah memberikan kesempatan dan tempat belajar sekaligus penelitian di laboratorium untuk menyelesaikan skripsi ini.

7. Ibu Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP selaku ketua peneliti proyek Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi “Produksi Benih Sintetik Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Bebas Virus Melalui Somatik Embriogenesis” Tahun 2014.
8. Teman-teman, rekan kerja, staff ahli, serta pihak-pihak lainnya yang begitu banyak membantu yang tidak dapat penulis sebut satu persatu.

Jember, Mei 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 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Deskripsi Tanaman Tebu	6
2.2 Kondisi Pertanaman Tebu di Indonesia	7
2.3 Embriogenesis Somatik	10
2.4 Faktor yang Berperan dalam Embriogenesis Somatik	11
2.5 Tanaman Tebu Varietas NXI 1-3	12
2.6 Hipotesis	13
BAB 3. METODE PENELITIAN	14
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	14
3.2 Bahan dan Peralatan	14
3.3 Rancangan Percobaan	14

3.3.1 Percobaan seri 1 tahap Induksi Kalus (media IK)	15
3.3.2 Percobaan seri 2 tahap Proliferasi Kalus (media PK)	15
3.3.3 Percobaan seri 3 tahap Regenerasi Kalus (media RK)	15
3.4 Pelaksanaan Penelitian	16
3.4.1 Pembuatan media dan pengkombinasian ZPT	16
3.4.2 Persiapan eksplan	16
3.4.3 Penanaman pada media induksi kalus	17
3.4.4 Penanaman pada media proliferasi kalus	17
3.4.5 Penanaman pada media regenerasi kalus	18
3.5 Parameter Pengamatan	18
3.5.1 Tahap induksi kalus	18
3.5.2 Tahap proliferasi kalus	19
3.5.3 Tahap regenerasi kalus	20
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1 Hasil	21
4.1.1 Tahap Induksi Kalus	21
4.1.2 Tahap Proliferasi Kalus	26
4.1.3 Tahap Regenerasi Kalus	30
4.2 Pembahasan	32
4.2.1 Tahap Induksi Kalus	32
4.2.2 Tahap Proliferasi Kalus	35
4.2.3 Tahap Regenerasi Kalus	37
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Hal
1.1	Laju pertumbuhan untuk luas lahan dan produksi tanaman perkebunan di Indonesia pada tahun 2013-2014.....	2
4.1	Hasil analisis ragam pada parameter waktu terbentuknya kalus dan presentase terbentuknya kalus.....	21
4.2	Hasil analisis ragam pada parameter waktu terbentuknya tunas, jumlah tunas, tinggi tunas, dan waktu munculnya akar.....	30
4.3	Hasil uji kontras orthogonal pada perlakuan media terhadap parameter waktu terbentuknya tunas, jumlah tunas, tinggi tunas, dan waktu munculnya akar.....	31

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Hal
4.1	Grafik rata-rata waktu terbentuknya kalus.....	22
4.2	Grafik Presentase terbentuknya kalus selama 6 minggu masa induksi kalus.....	22
4.3	Grafik presentase terbentuknya kalus pada 6 MST.....	23
4.4	Perkembangan induksi kalus pada media IK1.....	24
4.5	Perkembangan induksi kalus pada media IK2.....	25
4.6	Perkembangan induksi kalus pada media IK3.....	26
4.7	Perbedaan kalus embriogenik dan non embriogenik, serta tahapan perkembangannya dilihat secara mikroskopis.....	27
4.8	Perkembangan kalus pada media PK1 (kontrol).....	28
4.9	Perkembangan embrio somatik pada media PK2.....	28
4.10	Perkembangan embrio somatik pada media PK3.....	29
4.11	Hasil pengamatan histologis kalus embriogenik menggunakan mikroskop.....	29
4.12	Grafik rata-rata hasil perlakuan RK1, RK2, RK3, RK4, dan RK5 terhadap parameter penamatan waktu terbentuknya tunas, jumlah tunas, tinggi tunas, dan waktu munculnya akar.....	32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
1	Stok Media MS.....	44
2	Parameter Waktu Terbentuknya Kalus.....	45
3	Parameter Presentase Terbentuknya Kalus.....	46
4	Parameter Waktu Terbentuknya Tunas.....	48
5	Parameter Jumlah Tunas.....	50
6	Parameter Tinggi Tunas.....	52
7	Parameter Waktu Terbentuknya Akar.....	54

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan salah satu tanaman perkebunan penting di Indonesia. Tebu dikatakan sebagai tanaman penting karena dapat mendatangkan keuntungan bagi aspek ekonomi yaitu sebagai sumber devisa negara, juga dapat menyerap banyak tenaga kerja dalam proses budidayanya sehingga dapat menjadi sumber pendapatan masyarakat. Gula merupakan produk utama yang dihasilkan dari tanaman tebu tersebut dan telah menjadi kebutuhan pokok dan sumber kalori bagi masyarakat serta penting peranannya dalam bidang industri dalam negeri. Saat ini hal tersebut masih menjadi masalah karena kebutuhan gula yang terus meningkat tidak diimbangi dengan produksi dalam negeri yang memadai. Dinamika harga gula yang tidak menentu secara langsung mempengaruhi laju inflasi dalam negeri (Departemen Perindustrian, 2009).

Pada tahun 2008 produksi gula dunia mencapai 166,3 juta ton dimana produksi gula di Indonesia hanya mencapai 2,67 juta ton gula putih dan 1,26 juta ton untuk gula rafinasi. Indonesia mengimpor gula pada tahun 2008 sebesar 2,3 juta ton setara raw sugar, yang terdiri dari gula putih, gula rafinasi, dan gula mentah. Asal negara-negara impor adalah Brazil, Thailand, Uni Eropa, Korea, Malaysia, Australia, dan Afrika Selatan. Produksi gula nasional pada tahun 2013 telah mencapai 2,551 juta ton, sementara konsumsi gula pada tahun yang sama mencapai 5,51 juta ton. Stok gula dunia diprediksi akan semakin berkurang sehingga harga cenderung tetap pada nilai yang tinggi. Indonesia akan turut merasakan pengaruh kelangkaan gula dunia dimana Indonesia merupakan salah satu negara pengimpor gula terbesar di dunia. Luas areal dan produksi gula tebu di Indonesia pada tahun 2013-2014 dapat dilihat pada Tabel 1.1 berikut.

Tabel 1.1. Laju Pertumbuhan untuk luas lahan dan produksi tebu di Indonesia pada tahun 2013-2014 (ton)

No	Uraian / Item	Tahun / Year		Laju Pertumbuhan / Growth 2014 over 2013 (%)
		2013	2014	
I. Luas Areal / Immature Area (Ha)				
1	Kopi / Coffee	1.241.836	1.246.809	0.40
2	Kakao / Cocoa	1.740.612	1.719.087	-
3	Tebu / Sugar Cane	469.228	476.735	1.60
4	Tembakau / Tobacco	192.809	195.260	1.27
Produksi / Production (Ton)				
1	Kopi / Coffee	675.915	685.089	1.36
2	Kakao / Cocoa	720.862	709.331	-
3	Tebu / Sugar Cane	2.551.024	2.632.424	3.19
4	Tembakau / Tobacco	164.448	166.262	1.10

Keterangan: -) data tidak tersedia

Sumber : Direktorat Jenderal Perkebunan, 2015

Semakin majunya ilmu pengetahuan dan teknologi saat ini memungkinkan untuk menambah kemajuan pula dalam metode budidaya tanaman tebu. Metode kultur jaringan merupakan metode budidaya tanaman yang banyak digunakan saat ini. Metode perbanyakan ini bekerja dalam tingkat sel maupun jaringan. Yaitu dengan cara memperbanyak atau menumbuhkan sel dengan kondisi lingkungan yang aseptik dan terkontrol. Metode ini semakin berkembang sejak diketahuinya teori bahwa tanaman memiliki totipotensi sel, yaitu kemampuan setiap sel tanaman untuk dapat tumbuh dan berkembang menjadi satu tanaman baru yang utuh dalam kondisi lingkungan yang mendukung. Metode kultur jaringan dipercaya dapat menghasilkan tanaman baru termasuk dalam bentuk bibit dalam waktu yang relatif cepat, mampu berproduksi dalam skala besar, menghasilkan tanaman yang terbebas dari hama dan penyakit, serta mampu mengembangkan tanaman dengan sifat baru. Salah satu metode kultur jaringan yang saat ini banyak digunakan yaitu dengan menginduksi embriogenesis somatik (SE) untuk memperoleh bibit tebu yang terbebas dari penyakit dengan jumlah tinggi dan dalam waktu yang relatif cepat.

Embriogenesis somatik merupakan perkembangan sel-sel somatik (yaitu sel-sel tubuh seperti batang, daun, dan lainnya baik haploid maupun diploid)

menjadi tumbuhan dengan membentuk embrio namun tanpa melalui fase menyatunya gamet. Kejadian embriogenesis somatik pada dasarnya sama dengan embriogenesis zigotik. Sel yang dijadikan sebagai eksplan akan dipacu untuk berdiferensiasi menjadi embrio yang memiliki 2 meristem sekaligus, yaitu meristem tunas dan meristem akar. Embrio yang telah memiliki dua macam meristem sekaligus ini tentunya akan lebih memudahkan tanaman untuk beregenerasi. Pada tanaman tebu, teknik embriogenesis somatik sendiri mempunyai 2 tujuan utama. Yaitu pengembangan metode yang lebih efisien untuk memperbanyak tanaman serta kultur sel yang berdasarkan sistem regenerasi yang berguna dalam transformasi genetik. Embriogenesis somatik yang menuntun pada pembentukan embrio somatik dapat digunakan untuk memproduksi tanaman dalam jumlah besar. Pengaplikasian teknik embriogenesis somatik diantaranya yaitu untuk transformasi genetik, mutagenesis, dan benih sintetik (Suprasanna *et al.*, 2005).

Banyak faktor yang mempengaruhi terjadinya embriogenesis yaitu antara lain auksin eksogen, sumber eksplan, komposisi nitrogen yang ditambahkan dalam media dan karbohidrat atau sukrosa (Percy *et al.*, 2000). Ali dan Iqbal (2012) melaporkan bahwa induksi embriogenesis somatik dapat diperoleh dengan menggunakan eksplan berupa gulungan daun muda dari tanaman tebu (young leaf roll). Naz, *et al.* (2008) juga melaporkan dari hasil penelitiannya bahwa presentase tinggi dihasilkannya embriogenesis somatik pada tanaman tebu adalah dengan menggunakan jaringan daun muda sebagai eksplan. Teknik embriogenesis somatik ini sangat ditentukan pula keberhasilannya oleh perlakuan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang diberikan pada tanaman selama kultur. ZPT yang sama belum tentu memberikan hasil yang sama jika diujikan pada bagian tubuh tanaman yang berbeda yang digunakan sebagai eksplan. Pemberian jenis ZPT yang tepat pada jenis eksplan dari bagian tubuh tanaman tebu yang tepat dapat menghasilkan embriogenesis somatik tebu yang diinginkan. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) merupakan salah satu jenis ZPT yang termasuk dalam jenis auksin dan telah banyak digunakan dalam kegiatan kultur in-vitro untuk tujuan pengkalusan.

1.2 Perumusan Masalah

Ketergantungan terhadap impor gula dapat teratasi dengan menyediakan bahan tanam tebu berupa bibit yang mempunyai kualitas baik dalam jumlah yang mencukupi. Budidaya secara konvensional belum mampu sepenuhnya menyediakan bibit yang sehat dan terbebas dari penyakit. Sehingga metode kultur jaringan dengan teknik embriogenesis somatik diharapkan mampu memenuhi kebutuhan bibit tebu yang sehat untuk keperluan massal. Oleh karena hal itu diperlukan penelitian yang mampu mengidentifikasi perlakuan hormon yang paling tepat untuk menginduksi embrio somatik pada tanaman tebu yang paling baik kualitasnya serta membutuhkan waktu paling singkat sehingga produksi massal dapat terpenuhi.

1.3 Tujuan dan Manfaat

1.3.1 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk

1. Mengetahui respon dari eksplan varietas tebu NXI 1-3 terhadap induksi dan regenerasi kalus.
2. Mengetahui perkembangan embrio somatik tebu varietas NXI 1-3.
3. Mengetahui kombinasi ZPT dan asam amino yang terbaik dalam menghasilkan planlet tebu varietas NXI 1-3 melalui embriogenesis somatik.

1.3.2 Manfaat

1. Penelitian ini dapat memberikan informasi bagi peneliti lain tentang protocol mikropropagasi tanaman tebu varietas NXI 1-3 melalui embriogenesis somatik dengan menggunakan ZPT 2,4-D dan BAP serta kombinasinya dengan asam amino dengan konsentrasi yang tepat.
2. Hasil penelitian ini selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai acuan dalam mikropropagasi tanaman tebu varietas NXI 1-3 secara *in vitro* yang dapat dikembangkan lebih lanjut untuk mikropropagasi skala besar dengan bioreaktor

sehingga dapat digunakan untuk meningkatkan hasil pertanaman tebu di masyarakat.

3. Penelitian ini dapat menambah pengetahuan dan wawasan baru bagi peneliti untuk dapat mengembangkan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (IPTEK) dalam bidang kultur jaringan.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tanaman Tebu

Tanaman tebu dalam dunia tumbuh-tumbuhan memiliki sistematika sebagai berikut :

Kelas	: <i>Angiospermae</i>
Subkelas	: <i>Monocotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Glumaceae</i>
Famili	: <i>Graminae</i>
Genus	: <i>Saccharum</i>
Spesies	: <i>Saccharum officinarum</i>

Tanaman tebu memiliki batang yang berdiri lurus dan beruas-ruas yang dibatasi dengan buku-buku dimana terdapat mata tunas pada setiap bukunya. Batang tebu merupakan bagian yang memiliki nilai ekonomis paling tinggi dari tanaman ini. Karena pada batang tebu terdapat nira yang mengandung gula yaitu berupa sukrosa yang akan dipanen pada saat tebu masak optimal. Masa masak fisiologis tanaman tebu berkisar antara umur 12 – 14 bulan setelah tanam (Supriyadi, 1992). Daun tebu tidak memiliki tangkai namun memiliki pelepah dan berbentuk lurus hingga meruncing pada ujungnya. Pelepah daun tumbuh pada setiap pangkal buku batang. Tanaman tebu memiliki akar serabut dan mempunyai diameter relatif sama antara bagian ujung dan pangkalnya. Akar tebu menjalar hingga 0,5-1 meter pada tanah yang subur dan gembur (Winarni, 1993).

Tanaman Tebu tumbuh di daerah tropis dan sub tropis yaitu antara 19° LU – 35° LS. Kondisi tanah yang tidak terlalu kering dan tidak terlalu basah dengan drainase yang baik merupakan kondisi tanah yang baik bagi pertanaman tebu. Drainase sekitar 1 meter dapat member akar kesempatan untuk menyerap air serta unsur hara pada lapisan tanah yang lebih dalam sehingga masih ada cadangan pada saat musim kemarau. Selain itu pada saat datang musim hujan, kelebihan air akan dapat disalurkan sehingga tidak sampai terjadi penggenangan yang dapat membuat tanah jenuh dan kekurangan oksigen. Suhu ideal bagi tanaman tebu yaitu antara 24° C – 34° C dengan perbedaan suhu antara siang dan malam tidak

lebih dari 10° C. pembentukan sukrosa terjadi pada siang hari dan optimal pada suhu 30° C. Sukrosa yang terbentuk akan disimpan pada batang mulai dari ruas terbawah pada malam hari yang paling optimal berlangsung pada suhu 15° C. tanaman tebu membutuhkan penyinaran 12-14 jam. Tanaman tebu tergolong sebagai tanaman C4 yang proses asimilasi karbonnya lebih optimal apabila daun menerima cahaya matahari penuh (Supriyadi, 1992).

2.2 Kondisi Pertanaman Tebu di Indonesia

Tanaman tebu (*S. officinarum* L.) merupakan salah satu tanaman perkebunan penting di Indonesia. Pembudidayaan tanaman tebu terutama dilakukan di Pulau Jawa. Tebu dikatakan sebagai tanaman penting karena dapat mendatangkan keuntungan bagi aspek ekonomi negara ini yaitu sebagai devisa Negara, juga dapat menyerap banyak tenaga kerja dalam proses budidayanya sehingga dapat menjadi sumber pendapatan masyarakat. Kartikaningsih (2009) menyebutkan bahwa industri gula berbasis tebu menjadi sumber pendapatan bagi kurang lebih 900 ribu petani dengan jumlah tenaga kerja yang ikut terlibat di dalamnya mencapai 1,3 juta orang. Gula merupakan produk utama yang dihasilkan dari tanaman tebu tersebut dan telah menjadi kebutuhan pokok dan sumber kalori bagi masyarakat serta penting peranannya dalam bidang industri di negara ini. Namun saat ini hal tersebut masih menjadi masalah karena kebutuhan gula yang terus meningkat tidak diimbangi dengan produksi dalam negeri yang memadai.

Secara umum, perusahaan tanaman tebu terbagi menjadi dua macam. yaitu pabrik gula (PG) swasta mengelola kebun tebu dengan menggunakan manajemen perusahaan perkebunan (estate) dimana PG sekaligus memiliki lahan HGU (Hak Guna Usaha) untuk pertanaman tebunya, seperti Indo Lampung dan Gula Putih Mataram. Sedangkan PG milik BUMN, terutama yang berlokasi di Jawa, sebagian besar tanaman tebu dikelola oleh rakyat. PG di Jawa umumnya melakukan hubungan kemitraan dengan petani tebu. Secara umum, PG lebih berkonsentrasi pada pengolahan, sedangkan petani sebagai pemasok bahan baku tebu. Dengan sistem bagi hasil, petani memperoleh sekitar 66% dari produksi gula

petani, sedangkan PG sekitar 34%. (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2007).

Menurut Kepala Badan Litbang Pertanian swasembada gula adalah mampu memenuhi kebutuhan konsumsi gula nasional melalui produksi gula yang bersumber dari areal tebu rakyat (252.166 ha) dan areal tebu swasta (198.131 ha). Produksi gula nasional pada tahun 2011 mencapai 2.288.591 ton Gula Kristal Putih (GKP). Sedangkan produksi gula pada tahun 2012 mencapai 2.316.069 ton. Berdasarkan roadmap swasembada gula, estimasi kebutuhan gula nasional pada tahun 2014 adalah sebesar 2.956.000 ton GKP (Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, 2012). Data yang diperoleh dari Direktorat Jenderal Perkebunan (2015) menyebutkan bahwa pada tahun 2013 produksi gula tebu meningkat menjadi 2.551.024 ton, begitu pula produksi pada tahun 2014 yang mencapai 2.632.424 ton. Meskipun masih belum memenuhi estimasi kebutuhan yang diperkirakan sebelumnya, namun dari data tersebut menunjukkan adanya peningkatan produksi gula tebu. Sehingga potensi produksi berikutnya dapat dioptimalkan dengan cara menambah pasokan bibit yang sehat dan berkualitas serta penanaman varietas unggul di lapang.

Kementerian Pertanian RI tengah mengadakan program bongkar ratoon (penggantian bibit tebu). Penyediaan bibit untuk kegiatan bongkar ratoon tersebut sangat diperlukan. P3GI (Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia) merupakan pemasok utama dalam pengadaan bibit tebu hasil kultur jaringan. Namun Kementerian Pertanian juga memberikan kesempatan pada baik perguruan tinggi, lembaga litbang lain, bahkan pabrik gula sendiri untuk dapat menghasilkan bibit tebu hasil kultur jaringan yang sehat dan berkualitas. Pengadaan bibit tersebut adalah upaya untuk mencapai swasembada gula dengan bongkar ratoon 500000-600000 ha yang memerlukan dukungan bibit berkualitas baik (Riset Perkebunan Nusantara, 2012).

Menurut Mulyono (2011) bibit tebu unggul harus memenuhi syarat-syarat: (a) bibit tersedia pada waktu dibutuhkan, (b) bibit tersedia dalam jumlah yang cukup sesuai dengan kebutuhan petani, (c) bibit tersedia menurut kualitas yang unggul sesuai dengan lokasi daerah setempat, (d) harga bibit terjangkau oleh daya

beli petani dan (e) akses petani untuk memperoleh bibit adalah mudah. Sehingga kebutuhan bibit tebu unggul dapat dipenuhi dan akhirnya diharapkan akan meningkatkan produktivitas dan kualitas tebu, kemudian pada gilirannya akan mendukung upaya swasembada gula nasional. Namun dengan menggunakan metode konvensional saja tidak cukup. Dimana metode tersebut memiliki kelemahan diantaranya laju perbanyakan yang rendah, memakan waktu lebih banyak, serta berpotensi terinfeksi patogen yang dapat menyebabkan penyakit (Malabadi *et al.*, 2011).

Kebutuhan bibit untuk dapat mewujudkan cita-cita swasembada gula nasional tersebut dapat dipenuhi dengan suatu teknologi yaitu dengan metode kultur jaringan. Metode ini digunakan salah satunya dengan tujuan untuk mikropropagasi. Kultur jaringan merupakan cara perbanyakan tanaman secara vegetative dengan cara mengisolasi meristem dari suatu tanaman dan menumbuhkannya pada media aseptik hingga mampu beregenerasi menjadi tanaman sempurna (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2011). Saat ini metode kultur jaringan telah banyak digunakan dalam kegiatan berbudidaya terutama bagi tanaman perkebunan. Produksi tanaman perkebunan yang dikehendaki adalah yang mempunyai kualitas baik yaitu sehat atau tahan dari cekaman baik cekaman lingkungan maupun hama dan penyakit, serta mempunyai produktivitas yang tinggi. Metode kultur jaringan juga merupakan metode yang digunakan untuk tujuan memperoleh bibit massal karena perbanyakan tanaman dengan metode ini membutuhkan waktu yang relatif lebih cepat dibandingkan perbanyakan dengan cara konvensional, terutama untuk tanaman tebu. Metode kultur jaringan dengan teknik embriogenesis somatik dipercaya dapat menjadi cara untuk tujuan mikropropagasi terutama untuk tanaman yang sulit untuk menghasilkan biji. Metode embriogenesis somatik telah banyak dilaporkan keberhasilannya pada beberapa tanaman seperti tebu (Silva *et al.*, 2014), padi (Khaleeda dan Al-Forkan, 2006), dan kelapa sawit (Ageel dan Elmeer, 2011).

2.3 Embriogenesis Somatik

Embriogenesis somatik merupakan perkembangan sel-sel somatik (yaitu sel-sel tubuh seperti batang, daun, dan lainnya baik haploid maupun diploid) menjadi tumbuhan dengan membentuk embrio namun tanpa melalui fase menyatunya gamet. Embrio somatik dapat dicirikan dari strukturnya yang bipolar, yaitu mempunyai dua calon meristem, yaitu meristem akar dan meristem tunas (Desai *et al.*, 2004). Perkembangan embriogenesis somatik telah terbagi menjadi dua tahap utama, yaitu diferensiasi sel somatik menjadi sel kompeten embriogenik kemudian berproliferasi sebagai sel embriogenik. Fase utama kedua yaitu sel embriogenik tersebut menunjukkan kompetensi embriogeniknya dan berdiferensiasi menjadi embrio somatik (Jimenez, 2001).

Perbanyakan melalui embrio somatik lebih menguntungkan daripada pembentukan tunas adventif yang mempunyai struktur unipolar. Embriogenesis somatik memungkinkan terbentuknya propagulan dalam jumlah yang lebih besar sehingga sangat cocok digunakan untuk tujuan mikropropagasi. Teknik embriogenesis somatik dalam metode kultur jaringan dapat membantu dalam konservasi tanaman, terutama dalam penyediaan bibit dan perbanyakan genotip yang cepat (Percy *et al.*, 2000).

Williams dan Maheswaran (1986) menyebutkan bahwa embriogenesis somatik dapat diinduksi secara langsung (tanpa melalui fase pengkalusan) dan secara tidak langsung (melalui fase pengkalusan). Biasanya hanya sejumlah kecil embrio somatik yang berhasil didapatkan melalui embriogenesis somatik secara langsung. Namun berbeda dengan embriogenesis somatik secara tidak langsung, hasil embrio somatik tinggi telah dilaporkan pada embriogenesis somatik secara tidak langsung. Keberhasilan embriogenesis somatik tidak langsung dapat tercapai dengan terbentuknya kalus embriogenik. Sel-sel kalus yang bersifat embriogenik yaitu kalus yang dapat berkembang menjadi embrio somatik setelah kalus tersebut ditransfer ke dalam medium yang sesuai (Rusdianto dan Indrianto, 2012). Kalus embriogenik dicirikan dengan struktur kalus kering, berwarna putih susu atau krem dan berstruktur remah, sedangkan kalus non embriogenik dicirikan dengan struktur kalus kompak, basah, berwarna bening kecokelatan.

Pembentukan embrio somatik ini sangat dipengaruhi oleh jenis hormon atau zat pengatur tumbuh yang diberikan. Zat pengatur tumbuh yang diberikan tersebut dapat memacu bahkan menghambat pertumbuhan eksplan untuk bisa membentuk embrio somatik. Sugito (2006) menjelaskan bahwa komposisi media dan pemilihan zat pengatur tumbuh yang sesuai selain mendorong terbentuknya kalus juga mendorong terbentuknya embriogenesis. Namun konsentrasi optimal dari zat pengatur tumbuh dalam upaya pembentukan embrio somatik akan berbeda-beda hasilnya dan sifatnya spesifik untuk setiap genotip tanaman. Pemakaian zat pengatur tumbuh didasari oleh fungsi atau peranan dan kestabilan hormon (Wamaitha, *et al.*, 2010).

2.4 Faktor yang Berperan dalam Embriogenesis Somatik

Pada tahapan induksi kalus embriogenik diperlukan media yang mengandung auksin yang mempunyai daya aktivitas kuat atau konsentrasinya tinggi. Seperti diungkapkan Purnamaningsih (2002) bahwa dari berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa 2,4-D merupakan auksin yang efektif untuk induksi kalus embriogenik. Auksin meningkatkan kuantitas sel-sel embriogenik dengan cara memacu pembelahan sel untuk membentuk massa proembriogenik, serta untuk mencegah inisiasi pertumbuhan yang teratur pada sel-sel tersebut (Ibrahim *et al.*, 2010). Sedangkan pada tahap pendewasaan digunakan auksin dengan konsentrasi yang lebih rendah atau tidak sama sekali. Selain zat pengatur tumbuh, faktor lain yang juga mempengaruhi yaitu jenis eksplan, sumber nitrogen, dan gula. Eksplan yang berumur relative muda dan bersifat meristematik umumnya akan memberikan kebarhasilan yang lebih tinggi dalam membentuk embrio somatik. Pada penelitian Ho dan Vasil (1983) menunjukkan bahwa eksplan dari spindle leaf (yang berupa *leaf sheath* dan *midrib*) lebih cocok untuk induksi kalus dan menghasilkan lebih banyak kalus embriogenik dibandingkan dengan eksplan dari helaian daun (*leaf blade*).

Sumber nitrogen yang beberapa kali digunakan dalam upaya induksi kalus yaitu *casein hydrolysate*. Senyawa *casein hydrolysate* ini dapat menjadi sumber kalsium, fosfat, beberapa mikro elemen, vitamin, dan yang paling terpenting, yaitu

campuran dari lebih dari 18 asam amino (Ageel dan Elmeer, 2011). Penambahan asam amino dapat merangsang terjadinya komunikasi di antara sel dan jaringan pada organ multiselular. Nitrogen yang berasal dari asam amino diasimilasikan dengan cepat menjadi karbon sekeleton selama metabolisme dan digunakan untuk sintesis protein (Purnamaningsih, 2002).

Penelitian mengenai pengaruh jenis gula yang berbeda terhadap hasil embriogenesis somatik pada kultur suspensi telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Gula berfungsi sebagai selain sumber karbon juga berguna untuk mempertahankan tekanan osmotik pada media. Pada penelitian tersebut dari 4 jenis gula yaitu glukosa, fruktosa, sukrosa, dan maltosa, terlihat bahwa penambahan sukrosa dalam media pengkalusan dapat menghasilkan jumlah embrio somatik terbanyak dibandingkan dengan sumber gula lainnya (Purnamaningsih, 2002).

2.5 Tanaman Tebu Varietas NXI 1-3

Tanaman tebu (*S. officinarum* L.) terus mengalami perkembangan baik dengan cara perbanyakkan maupun perbanyakkan mutu varietas yang dihasilkan. Pengembangan varietas terus dilakukan untuk meningkatkan mutu dan dalam upaya untuk memenuhi produksi dalam negeri. Sejak tahun 2012 PTPN XI telah melepas varietas baru dengan nama varietas VMC 86-550 atau lebih dikenal dengan nama NXI 1-3. Varietas ini berasal dari Victoria Milling (philipina) dari Polycross pada populasi P 56 226 Philippina hasil pertukaran varietas pada CFC/ISO/20 Project dan introduksi dari CIRAD Perancis melalui PTPN XI (Persero). Sejak tahun 2010 telah dilakukan uji adaptasi yang dibandingkan dengan varietas kontrol yaitu varietas BL dan dilakukan di beberapa wilayah Indonesia (Litbang Induk PTPN, 2012). Keunggulan tanaman tebu varietas NXI 1-3 antara lain memiliki produktivitas yang tinggi, mempunyai daya tahan kepras, dan mampu beradaptasi terhadap lingkungan dengan mudah, masih dapat berproduksi baik meski ditanam pada lahan tegalan sekalipun (Rasullah *et al.*, 2013; Remita *et al.*, 2013).

2.6 Hipotesis

1. Terdapat respon dari eksplan varietas tebu NXI 1-3 terhadap induksi kalus dan regenerasi kalus.
2. Terdapat perkembangan embrio somatik tebu varietas NXI 1-3.
3. Terdapat kombinasi ZPT dan asam amino yang terbaik dalam menghasilkan planlet tebu varietas NXI 1-3 melalui embriogenesis somatik.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi CDAST (Center for Development of Advanced Sciences and Technology) Universitas Jember pada bulan September 2014 – Februari 2015.

3.2 Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan antara lain adalah *spindel leaf* tanaman tebu varietas NXI 1-3 sebagai eksplan. Eksplan diambil dari lahan lahan pertanian PG. Asembagus PTPN XI Situbondo yang berumur kurang lebih 6 bulan. Media yang digunakan adalah media kultur jaringan yang biasa digunakan untuk media pertumbuhan tanaman tebu yaitu media MS (Murashige dan Skoog, seperti tertera pada lampiran) dengan beberapa zat pengatur tumbuh seperti 2,4-D (2,4-Diclorophenolic acid) dan BAP (Benzil Amino Purin), serta asam amino pelengkap seperti Casein Hydrolysate, L-Proline, L-Glutamine, dan unsoluble Polivinil Pirrolidon. Serta alkohol 96% untuk bahan sterilisasi.

Alat yang digunakan adalah peralatan standar kultur jaringan seperti Laminar Air Flow cabinet, autoklaf, pH meter, stirrer, mikropipet, pinset, pisau scalpel, bunsen dan spirtus, aluminium foil, kertas saring, botol kultur, glass petridish, disposable petridish, beaker glass, gelas ukur, kaca pembesar, kamera, serta mikroskop stereo.

3.3 Rancangan Percobaan

Pada percobaan ini dibedakan menjadi 3 tahapan berbeda, yaitu tahap induksi kalus (percobaan seri 1), proliferasi kalus (percobaan seri 2), dan regenerasi tunas (percobaan seri 3). Percobaan satu faktor dilaksanakan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Faktor yang diteliti meliputi:

3.3.1 Percobaan seri 1 tahap Induksi Kalus (media IK)

Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor tunggal yaitu media dan 6 kali ulangan. Analisis data menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji DMRT 5% apabila berbeda nyata. Pada tahapan induksi kalus ini bertujuan untuk mendapatkan kalus embriogenik sehingga pada tahap ini digunakan media sebagai berikut:

1. 0 ppm (media IK1)
2. 3 ppm 2,4-D + 300 ppm CH (Media IK2)
3. 4 ppm 2,4-D + 300 ppm CH (Media IK3)

3.3.2 Percobaan seri 2 tahap Proliferasi Kalus (media PK)

Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor tunggal yaitu media dan 4 kali ulangan. Kalus embriogenik yang berhasil didapatkan dari percobaan seri 1 akan diproliferasikan. Pada tahapan proliferasi kalus ini bertujuan untuk mendapatkan embrio somatik sehingga pada tahap ini digunakan media sebagai berikut :

1. 0 ppm (Media PK1)
2. 1,5 ppm 2,4-D + 560 ppm L-Proline + 300 ppm CH (Media PK2)
3. 2 ppm 2,4-D + 560 ppm L-Proline + 300 ppm CH (Media PK3)

3.3.3 Percobaan seri 3 tahap Regenerasi Kalus (media RK)

Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor tunggal yaitu media dan 2 kali ulangan. Analisis data menggunakan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Kontras Orthogonal 5% apabila berbeda nyata. Pada tahapan regenerasi tunas ini bertujuan untuk mendapatkan planlet hasil perbanyakan melalui embrio somatik sehingga digunakan media sebagai berikut:

1. 0 ppm (Media RK1)
2. 0,25 ppm BAP (Media RK2)
3. 0,5 ppm BAP (Media RK3)
4. 0,25 ppm BAP + 300 ppm CH + 100 ppm L-Glutamine (Media RK4)
5. 0,5 ppm BAP + 300 ppm CH + 100 ppm L-Glutamine (Media RK5)

3.4 Pelaksanaan Percobaan

3.4.1. Pembuatan media dan pengkombinasian ZPT

Pada kegiatan ini yang dilakukan adalah membuat media dasar MS menggunakan larutan stok yang telah disiapkan kemudian menambahkan zat pengatur tumbuh sesuai kombinasi dan konsentrasi yang telah dirancang. Pembuatan media dilakukan maksimal 1 minggu sebelum akan dilakukannya kegiatan atau tahapan induksi kalus, proliferasi, maupun regenerasi. Selain itu media diberi tambahan sumber karbon yakni sukrosa sebanyak 30g/l lalu dilarutkan dengan aquadest sampai 1 liter ke dalam gelas ukur. Setelah itu larutan media dilarutkan dengan menggunakan stirrer dan diukur derajat keasamannya dengan menggunakan pH meter hingga nilai pH berkisar 6,2. Larutan media tersebut kemudian ditambahkan bubuk phytigel sebanyak 2,5g/l untuk memadatkan media. Larutan media yang telah diberi agar kemudian dipanaskan dalam microwave hingga mendidih dan menjadi larut sepenuhnya. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam botol kultur dan ditutup. Media yang sudah siap kemudian di autoclave pada suhu 121⁰C dan tekanan 17,5 psi selama 20 menit.

3.4.2 Persiapan eksplan

Tanaman tebu yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman tebu varietas NXI 1-3 yang berumur sekitar 5-6 bulan. Pemilihan umur tersebut karena pada rentang umur 5-6 bulan tersebut jaringan masih tergolong muda dan mudah untuk berkembang atau berdiferensiasi serta penting pula untuk memilih tanaman yang sehat, yaitu tanaman yang tidak terdapat gejala serangan hama maupun penyakit. Tanaman tebu yang akan digunakan sebagai eksplan tersebut diambil bagian pucuknya dari lapang. Pada saat mengambil pucukan dari lapang harus dilakukan pada saat cuaca cerah atau tidak hujan, karena air hujan dapat membawa kontaminan yang nantinya akan sulit dihilangkan setelah penanaman eksplan. Pucukan kemudian dibersihkan helaian daun bagian luarnya hingga hanya tersisa 4 sampai 5 gulungan daun dari bagian yang paling dalam (diameter sekitar 2-3 cm dan panjang sekitar 25-30 cm). Bagian tersebut yang kemudian

dibawa ke dalam laminar. Sebelumnya bagian tersebut dibersihkan dengan disemprot dengan alkohol.

3.4.3 Penanaman pada media induksi kalus

Penanaman dilakukan di dalam Laminar Air Flow (LAF) cabinet. Batang tanaman tebu dibersihkan dan dikelupas hingga sampai berdiameter kurang lebih 0,5 cm. Pada bagian ruas pertama dari pucuk, sekitar 1,5-2 cm dari bagian pangkal dipotong-potong kecil dengan tebal berkisar 2-3 mm hingga 10-15 potongan. Bagian yang sudah dipotong kemudian dilukai sedikit bagian tengahnya untuk merangsang pertumbuhan eksplan. Potongan *spindle leaf* yang sudah dipotong-potong ditanam pada petridish yang berisi media induksi kalus dengan tambahan perlakuan ZPT yang telah ditentukan. Petridish yang telah berisi eksplan tersebut kemudian diletakkan pada ruang gelap dengan suhu ruang berkisar antara 23-25°C selama kurang lebih 6 minggu. Subkultur dilakukan untuk memindahkan eksplan yang telah berkembang ke media baru dilakukan setiap 3 minggu sekali.

3.4.4 Penanaman pada media proliferasi kalus

Setelah 6 minggu berada pada media induksi kalus, kemudian kalus yang telah terbentuk disubkultur ke media proliferasi kalus dan pendewasaan. Kalus yang telah terbentuk tersebut dipacu untuk mengalami tahapan embrio yang berupa globular, skutelar, koleoptilar, dan kotiledon. Tahapan proliferasi ini dilakukan pada ruang gelap dengan suhu ruangan berkisar antara 23-25°C selama kurang lebih 3 minggu. Subkultur dilakukan untuk memindahkan eksplan yang telah berkembang ke media baru dilakukan setiap 3 minggu sekali. Apabila kurang dari jangka waktu subkultur tersebut telah nampak struktur menyerupai koleoptilar maka akan dipindah ke ruang terang dengan kondisi sama seperti pada tahap regenerasi kalus yaitu dengan lama penyinaran 16 jam dan kondisi gelap 8 jam pada suhu ruang antara 23-25°C.

3.4.5 Penanaman pada media regenerasi tunas

Eksplan yang telah membentuk kotiledon kemudian dipindah ke media regenerasi tunas. Tahapan regenerasi ini dilakukan pada kondisi terang dengan lama penyinaran 16 jam dan kondisi gelap 8 jam, dengan suhu ruangan berkisar antara 23-25°C.

3.5 Parameter Pengamatan

3.5.1 Tahap induksi kalus

1. Kecepatan waktu terbentuknya kalus

Eksplan yang ditanam diamati setiap harinya pada semua perlakuan dan setiap ulangan. Waktu pengamatan dimulai dari sejak eksplan ditanam dalam media induksi kalus hingga muncul kalus halus yang biasanya diawali dari bagian bawah eksplan yang bersentuhan langsung dengan media dan berlangsung hingga masa induksi kalus selesai yaitu 6 minggu atau 42 hari. Waktu munculnya kalus pada setiap ulangan kemudian dirata-rata untuk menjadi waktu terbentuknya kalus pada perlakuan tersebut. Satuan parameter pengamatan adalah hari.

2. Presentase kalus terbentuk

Presentase terbentuknya kalus dihitung dari jumlah kalus yang terbentuk pada eksplan yang dibandingkan dengan jumlah eksplan *spindle leaf* yang ditanam dan dikalikan 100%. Presentase terbentuknya kalus diamati setiap 2 minggu sekali selama 6 minggu masa induksi kalus yaitu pada umur 0 minggu, 2 minggu, 4 minggu, dan 6 minggu. Rumus yang digunakan untuk menghitung presentase kalus terbentuk adalah
$$\frac{\text{Jumlah kalus yang terbentuk dari eksplan}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

3. Pengamatan morfologis kalus (tekstur, warna, dan kepadatan kalus)

Pengamatan morfologis kalus meliputi kondisi kalus yang dapat dilihat secara morfologis. Hal ini meliputi tekstur atau remah tidaknya kalus, warna kalus, serta perkembangan yang terjadi pada kalus tersebut. Pengamatan dilakukan selama masa induksi kalus berlangsung yaitu selama 6 minggu (Tahir, *et al.*, 2011). Kalus yang telah berumur 6 minggu dan berjumlah cukup banyak dalam 1 *clumps* kemudian dipindahkan ke media proliferasi.

3.5.2 Tahap proliferasi kalus

1. Pengamatan morfologis kalus yang berproliferasi

Kalus hasil induksi yang terlihat bagus secara morfologis kemudian disubkultur ke media proliferasi dan diamati pula morfologinya. Pengamatan morfologis kalus meliputi kondisi kalus yang dapat dilihat secara morfologis. Hal ini meliputi tekstur atau remah tidaknya kalus, warna kalus, serta perkembangan yang terjadi pada kalus tersebut selama berada dalam tahap proliferasi kalus. Pengamatan dilakukan secara mikroskopis untuk melihat dengan jelas perubahan yang terjadi pada kalus secara morfologinya. Pengamatan dilakukan selama kurang lebih 6 minggu yaitu selama masa proliferasi kalus berlangsung. Pengamatan dilakukan dengan cara menempatkan kalus yang berada dalam disposable petridish di bawah mikroskop stereo.

2. Tahapan embriogenesis somatik

Pengamatan tahapan embriogenesis somatik sebenarnya juga merupakan pengamatan morfologi, namun pengamatan tahapan embriogenesis somatik lebih memfokuskan pengamatan pada tahapan-tahapan embriogenesis somatik yang didapat selama kurang lebih 6 minggu yaitu fase globular, skutelar, koleoptilar, dan kotiledon. Pengamatan dilakukan setiap 3 hari sekali secara mikroskopis dan makroskopis. Eksplan yang telah mencapai fase kotiledon kemudian disubkultur ke media regenerasi.

3. Uji histologis pada kalus embriogenik

Uji histologis pada kalus embriogenik dilakukan untuk memastikan kalus yang terbentuk dari hasil induksi dan proliferasi kalus merupakan jaringan yang bersifat embriogenik. Uji histologis hanya dilakukan 1 kali dan dipilih kalus dengan ciri morfologi kalus embriogenik. Uji histologis diawali dengan memfiksasi jaringan objek yang akan diamati dengan formalin (fixing), pelillinan objek yang akan diamati (embedding), pemotongan kalus dengan menggunakan microtome menjadi specimen (sectioning), pengeringan specimen (drying), dan pewarnaan specimen secara bertingkat (staining).

3.5.3 Tahap regenerasi kalus

1. waktu terbentuknya tunas

Pengamatan waktu terbentuknya tunas dihitung sejak eksplan kotiledon asal tahap proliferasi ditanam di media regenerasi. Eksplan yang ditanam akan dihitung menjadi 1 tunas apabila telah mencapai tinggi 1 cm dari bagian basal tanaman. Pengamatan selama tahap regenerasi kalus berlangsung selama 75 hari.

2. jumlah tunas yang terbentuk dari kalus

Jumlah tunas yang terbentuk dihitung pada saat tunas mencapai tinggi 1 cm kemudian dihitung lagi setiap kali subkultur yaitu 4 minggu sekali.

3. panjang tunas

Panjang tunas yang terbentuk dihitung pada saat tunas mencapai tinggi 1 cm kemudian dihitung lagi setiap kali subkultur yaitu 4 minggu sekali.

4. waktu munculnya akar

Waktu munculnya akar dihitung sejak munculnya akar pertama kali yang telah dapat dilihat atau dihitung, yaitu kurang lebih berukuran 1 cm. batas waktu pengamatan waktu munculnya akar berlangsung selama masa pengamatan yaitu 75 hari.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Tahap Induksi Kalus

Hasil analisis ragam pada tahapan induksi kalus menunjukkan bahwa terdapat perbedaan sangat nyata pada perlakuan faktor tunggal pemberian 2,4-D berbeda taraf terhadap parameter waktu terbentuknya kalus dan presentase terbentuknya kalus.

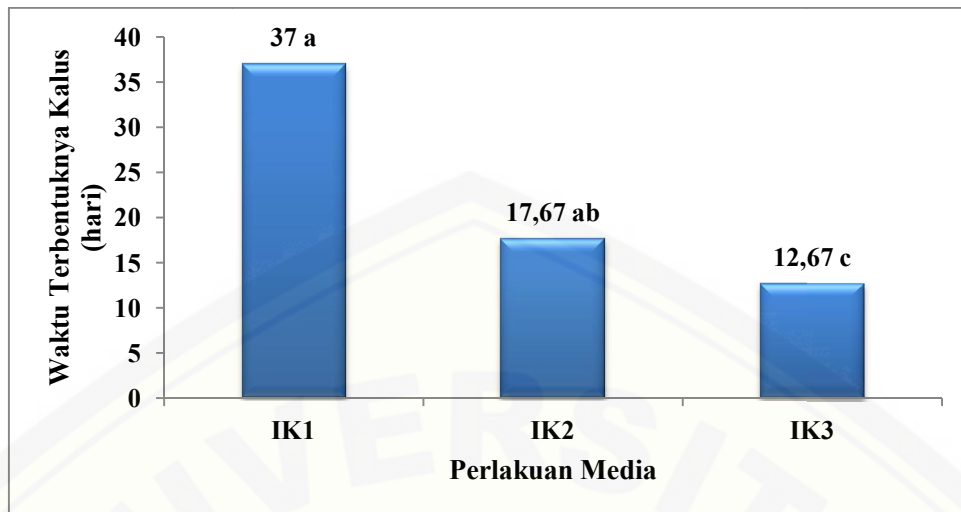
Tabel 4.1 Hasil analisis ragam pada parameter waktu terbentuknya kalus, dan presentase terbentuknya kalus.

Parameter	Nilai F-hitung
Waktu terbentuknya kalus	45,50 **
Presentase terbentuknya kalus	49,56 **

Keterangan ** = Berbeda sangat nyata

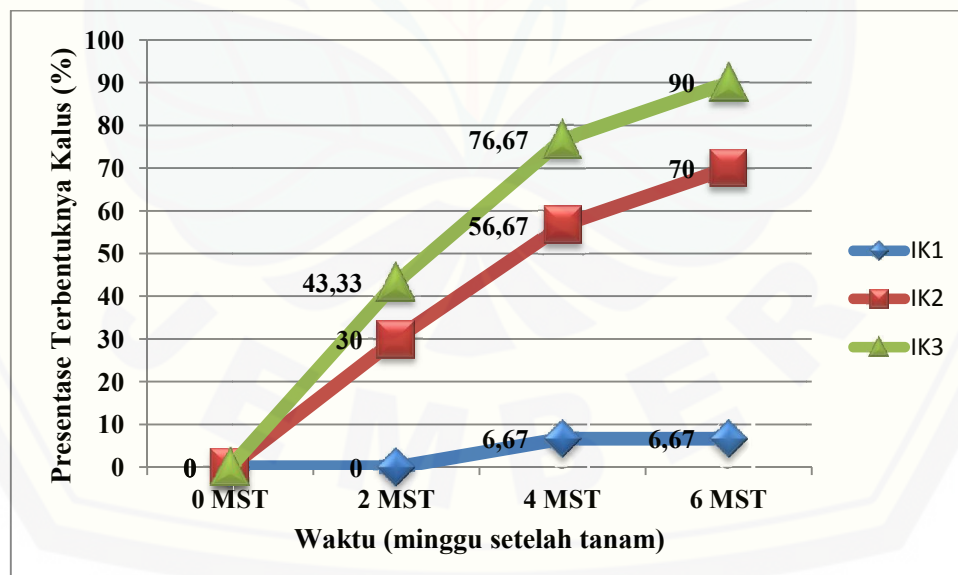
Hasil dari seluruh parameter pengamatan yang berbeda sangat nyata kemudian diuji lanjut dengan menggunakan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) taraf 5%. Pada parameter waktu terbentuknya kalus, nilai terbaik yaitu pada nilai rata-rata terendah karena menunjukkan waktu terbentuknya kalus yang paling cepat, sedangkan nilai yang lebih tinggi menunjukkan perkembangan yang lebih lambat dalam pembentukan kalus. Pada parameter presentase terbentuknya kalus nilai terbaik yaitu pada nilai rata-rata tertinggi karena menunjukkan jumlah kalus yang terbentuk lebih banyak.

Berdasarkan hasil uji lanjut diketahui bahwa perlakuan yang menghasilkan kalus dalam waktu tercepat adalah perlakuan media IK3 dengan rata-rata waktu 12,67 hari, kemudian dilanjutkan pada perlakuan media IK2 dengan rata-rata waktu pembentukan kalus 17,67 hari. Perlakuan media IK1 (kontrol) berbeda sangat nyata dengan kedua perlakuan lainnya dimana membutuhkan rata-rata waktu hingga 37 hari untuk menginduksi kalus. Hasil tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.1 berikut.



Gambar 4.1 Grafik rata-rata waktu terbentuknya kalus pada perlakuan media IK1 (kontrol), IK2 (MS + 3ppm 2,4-D + 300ppm CH), dan IK3 (MS + 4ppm 2,4-D + 300ppm CH)

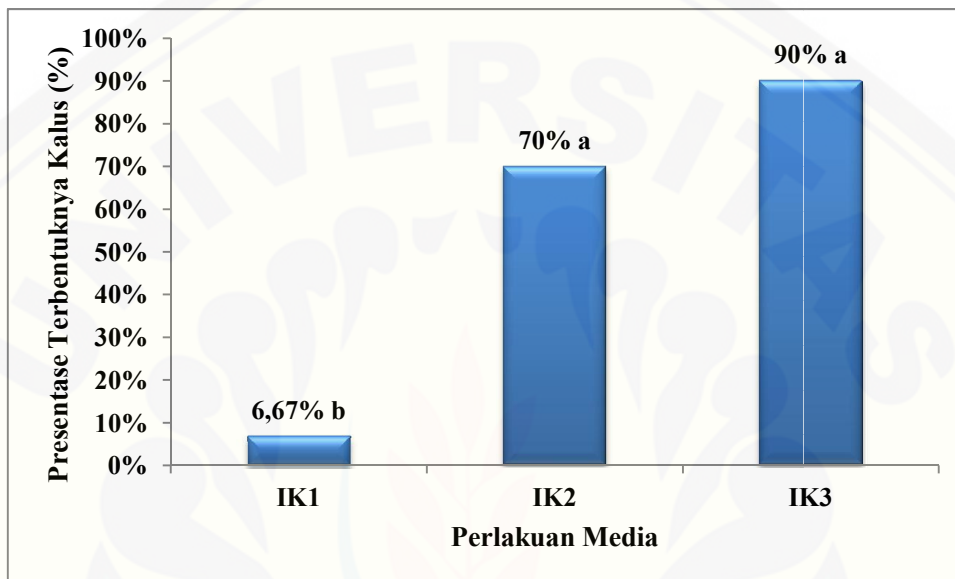
Presentase terbentuknya kalus diamati setiap 2 minggu sekali yaitu pada sesaat setelah tanam (0 MST), pada 2 minggu setelah tanam (2 MST), pada 4 minggu setelah tanam (4 MST), serta terakhir pada 6 minggu setelah tanam (6 MST). Grafik pertumbuhan presentase kalus dari 0 MST hingga 6 MST dapat dilihat pada Gambar 4.2 berikut.



Gambar 4.2 Grafik presentase terbentuknya kalus selama 6 minggu masa induksi kalus

Kalus yang terbentuk setelah 6 minggu masa induksi kalus yaitu sebesar 90% pada media IK3, disusul dengan media IK2 yaitu 70%, dan media IK3

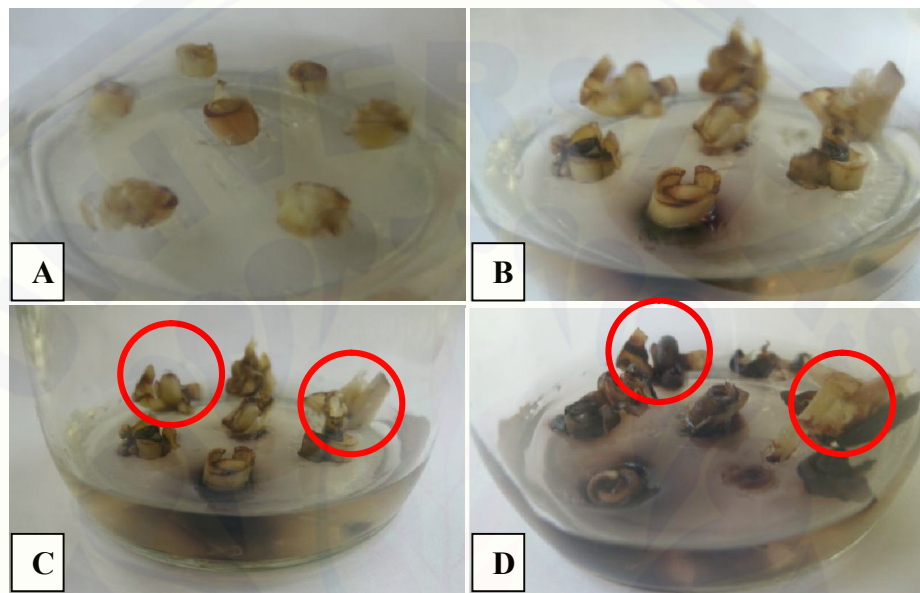
hingga akhir masa induksi hanya menghasilkan kalus sebanyak 6,67%. Perlakuan terbaik yaitu perlakuan media IK3 dengan presentase terbentuknya kalus tertinggi sebesar 90%. Namun setelah melalui uji DMRT 5% perlakuan media IK3 dan media IK2 memiliki notasi yang sama. Sehingga disimpulkan bahwa antara perlakuan keduanya tidak berbeda nyata. Hasil uji lanjut DMRT 5% pada presentase terbentuknya kalus dapat dilihat pada grafik Gambar 4.3 berikut.



Gambar 4.3 Grafik presentase terbentuknya kalus pada perlakuan media IK1 (kontrol), IK2 (MS + 3ppm 2,4-D + 300ppm CH), dan IK3 (MS + 4ppm 2,4-D + 300ppm CH) pada 6 MST

Selain melakukan analisis statistik, juga dilakukan pengamatan morfologi pada perkembangan kalus yang diinduksi. Pada Gambar 4.4 ditampilkan perkembangan kondisi kalus pada media IK1 yaitu media MS 0 tanpa penambahan Zat Pengatur Tumbuh yang digunakan sebagai perlakuan kontrol. Gambar 4.4 (A) merupakan eksplan yang baru saja ditanam sehingga pada gambar tersebut belum menunjukkan perubahan apapun. Eksplan yang digunakan merupakan eksplan yang masih muda sehingga potongan gulungan daun pada gambar nampak bersih dan lunak. Gambar 4.4 (B) menunjukkan bahwa pada beberapa eksplan telah membengkak atau merekah meskipun juga muncul daerah coklat atau tersebut biasa disebut peristiwa *browning*. Namun pada umur 2 minggu setelah tanam tersebut masih belum muncul kalus sama sekali. Gambar

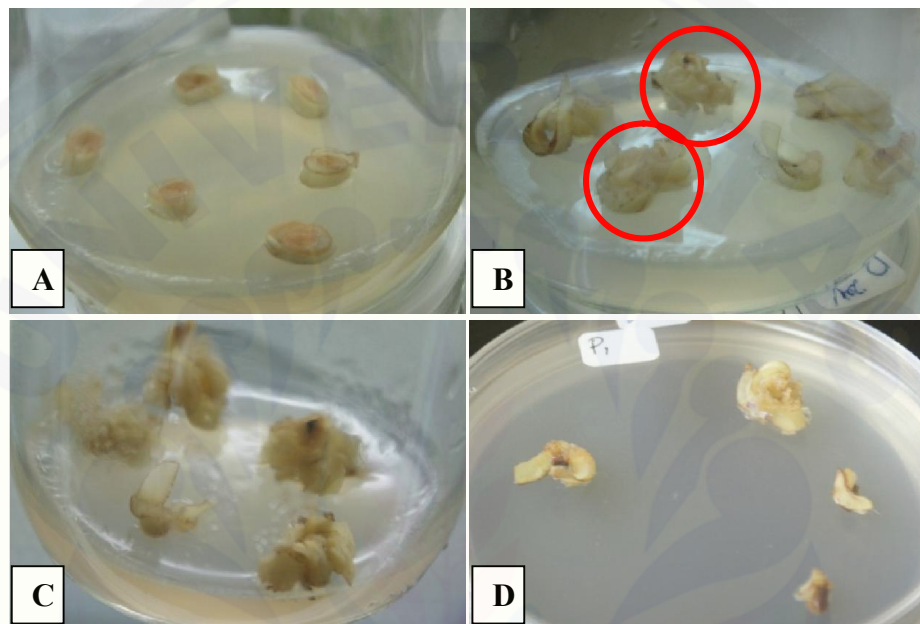
4.4 (C) menunjukkan telah munculnya kalus pada beberapa eksplan yang ditanam, namun kalus yang terbentuk merupakan kalus yang sangat kecil dan halus. Lingkaran merah menandakan kalus yang terbentuk. Gambar 4.4 (D) memperlihatkan daerah *browning* yang semakin meluas pada hampir semua eksplan. Kalus yang sebelumnya telah muncul pada umur 4 minggu setelah tanam tidak mengalami perkembangan atau dengan kata lain stagnan.



Gambar 4.4 Perkembangan induksi kalus pada media IK1 (kontrol) pada waktu kultur (A) 0 minggu, (B) 2 minggu, (C) 4 minggu, dan (D) 6 minggu

Pada Gambar 4.5 ditampilkan perkembangan kondisi kalus pada media IK2 yaitu media MS + 3ppm 2,4-D + 300ppm Casein Hidrolisat. Gambar 4.5 (A) merupakan gambar eksplan yang berupa potongan gulungan daun yang baru saja ditanam, sehingga tidak ada perubahan yang ditunjukkan. Gambar 4.5 (B) merupakan gambar eksplan setelah berada di media induksi kalus selama 2 minggu. Pada gambar telah nampak perbedaan dibandingkan dengan gambar eksplan yang baru saja ditanam. Bahkan seluruh eksplan telah membengkak atau pecah, namun baru beberapa eksplan yang menunjukkan tanda-tanda pengkalusan (ditunjukkan oleh lingkaran merah). Gambar 4.5 (C) merupakan gambar eksplan yang telah berada di media pengkalusan selama 4 minggu. Pada umur 4 minggu setelah tanam, hampir semua eksplan yang ditanam telah mengkalus. Saat eksplan berumur 3-4 minggu setelah tanam akan dilakukan subkultur. Gambar 4.5 (D)

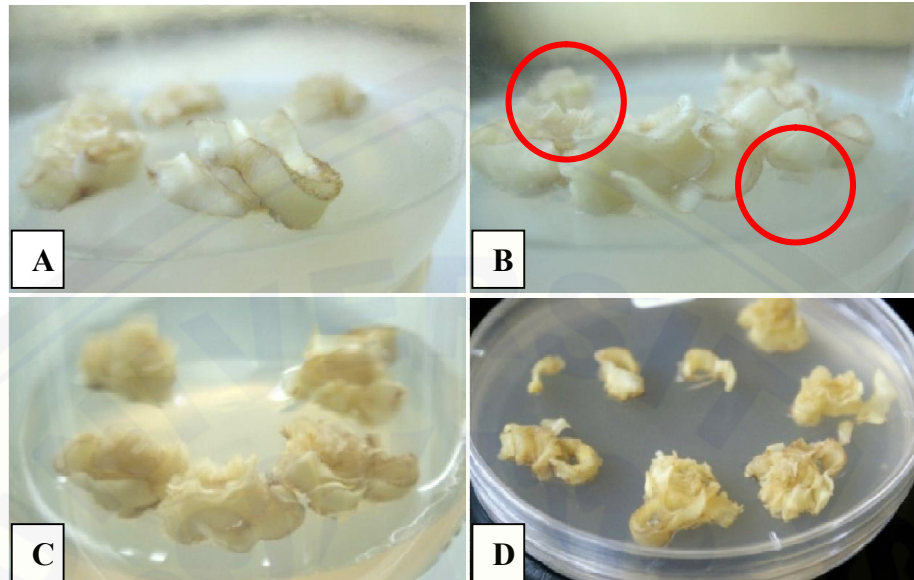
memperlihatkan eksplan berumur 6 minggu yang telah dipindah ke media baru dengan komposisi sama atau telah disubkultur. Kegiatan subkultur bertujuan agar tanaman tetap mendapatkan cukup nutrisi sehingga proses metabolisme di dalamnya tetap berlangsung dengan baik. Kalus pada umur 6 minggu setelah tanam telah cukup banyak jumlahnya dan dapat segera dimasukkan ke tahapan proliferasi kalus.



Gambar 4.5 Perkembangan induksi kalus pada media IK2 (MS + 3ppm 2,4-D + 300ppm CH) pada waktu kultur (A) 0 minggu, (B) 2 minggu, (C) 4 minggu, dan (D) 6 minggu

Pada Gambar 4.6 merupakan gambar perkembangan kondisi kalus pada media IK2 yaitu media MS + 4ppm 2,4-D + 300ppm Casein Hidrolisat. Gambar 4.6 (A) merupakan gambar eksplan pada 0 minggu setelah tanam atau tepatnya pada 7 hari setelah tanam. Eksplan telah banyak yang merekah namun belum ada yang menghasilkan kalus. Gambar 4.6 (B) menunjukkan bahwa telah terdapat kalus pada bagian dasar eksplan yang bersentuhan langsung dengan media. Gambar 4.6 (C) menunjukkan perkembangan yang lebih baik yaitu dilihat dari ukuran eksplan yang semakin membesar dan kalus yang terbentuk lebih banyak. Gambar 4.6 (D) merupakan gambar eksplan yang telah berumur 6 minggu dan siap dipindahkan ke tahap selanjutnya yaitu proliferasi kalus. Kalus yang

terbentuk selama masa induksi kalus pada media IK2 dan IK3 yaitu kalus yang berwarna putih bening, mengkilap, dan bersifat cukup remah.



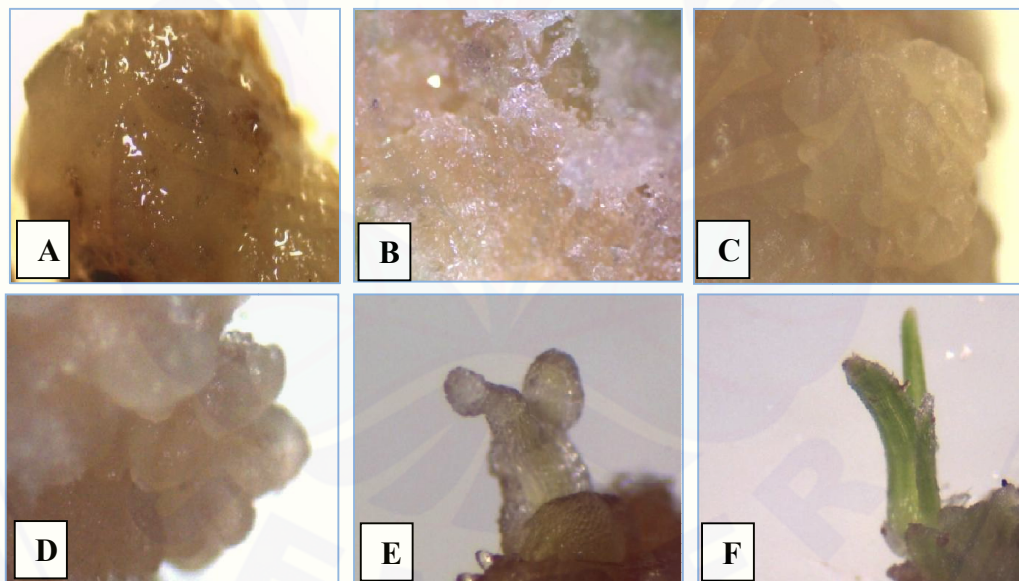
Gambar 4.6 Perkembangan induksi kalus pada media IK3 (MS + 4ppm 2,4-D + 300ppm CH) pada waktu kultur (A) 0 minggu, (B) 2 minggu, (C) 4 minggu, dan (D) 6 minggu

4.1.2 Tahap Proliferasi Kalus

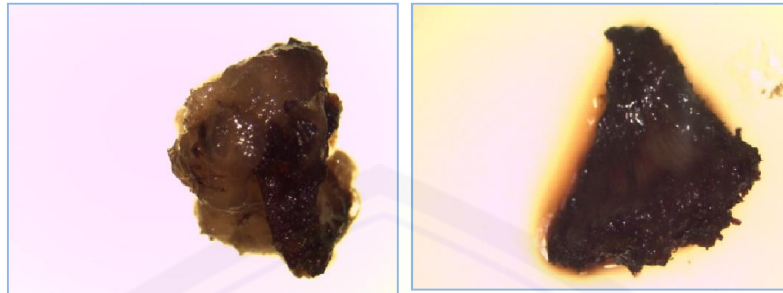
Tahapan proliferasi kalus merupakan tahapan yang paling penting dalam serangkaian tahapan mikropropagasi tanaman tebu melalui embriogenesis somatik. Kalus dari hasil induksi sebelumnya akan dipacu untuk dapat mengalami pematangan kemudian membentuk embrio somatik. Proliferasi kalus yang baik akan menghasilkan tunas dalam jumlah besar. Tahapan ini sangat dipengaruhi oleh media yang digunakan terutama pada konsentrasi auksin serta zat yang dapat memicu pembentukan embrio somatik.

Pada Gambar 4.7 memperlihatkan perbedaan struktur pada kalus embriogenik dan non embriogenik. Kalus non embriogenik dicirikan dengan strukturnya yang basah, tidak remah, serta berwarna kecokelatan seperti ditunjukkan pada Gambar 4.7 (A). Jenis kalus seperti ini akan sulit berkembang menjadi planlet. Kalus embriogenik sesuai tahapannya yaitu meliputi fase pre-embrio mass, globular, skutelar, koleoptilar, dan kotiledon. Pada Gambar 4.7 (B) merupakan gambar dari kalus embriogenik pada fase pre-embrio mass, yang

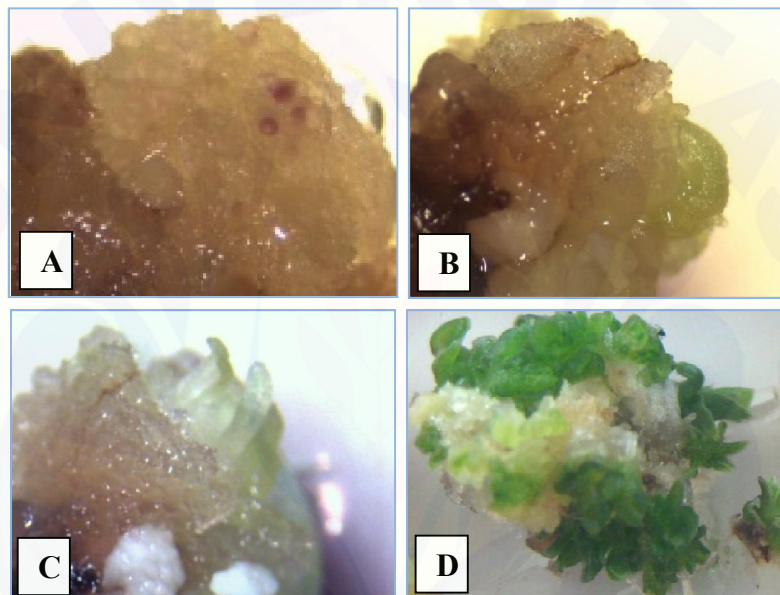
dicirikan dengan struktur kalus yang terbentuk lebih halus, memiliki warna putih keruh hingga bening, dan hampir merata pada seluruh bagian kalus. Fase pre-embrio mass terbentuk pada awal tahap proliferasi, bahkan ada beberapa kejadian fase pre-embrio mass telah terbentuk pada akhir tahap induksi kalus. Gambar 4.7 (C) merupakan fase globular yang ditandai dengan munculnya tonjolan-tonjolan kecil dan merata pada kumpulan kalus. Fase skutelar merupakan tahap lanjut dari fase globular, dimana pada fase ini tonjolan kecil tersebut berubah bentuk menyerupai bentuk hati seperti tampak pada Gambar 4.7 (D). Fase skutelar berkembang menjadi fase koleoptilar dimana semakin jelas terbentuk daun sempurna, dan telah berubah warna dari pucat menjadi kehijauan yaitu telah terbentuknya klorofil seperti terlihat pada Gambar 4.7 (E). Fase koleoptilar berkembang menjadi kotiledon yang telah memiliki bentuk daun sempurna, berwarna hijau terang, dan memiliki calon akar yang masih tertutup oleh jaringan kalus di bawahnya seperti ditunjukkan pada Gambar 4.7 (F).



Gambar 4.7 Perbedaan kalus embriogenik dan non embriogenik, serta tahapan perkembangannya dilihat secara mikroskopis (A) Kalus non embriogenik (B) Kalus embriogenik pada fase pre-embrio mass, (C) Kalus embriogenik pada fase globular, (D) Kalus embriogenik pada fase skutelar, (E) Kalus embriogenik pada fase koleoptilar, dan (F) Kotiledon



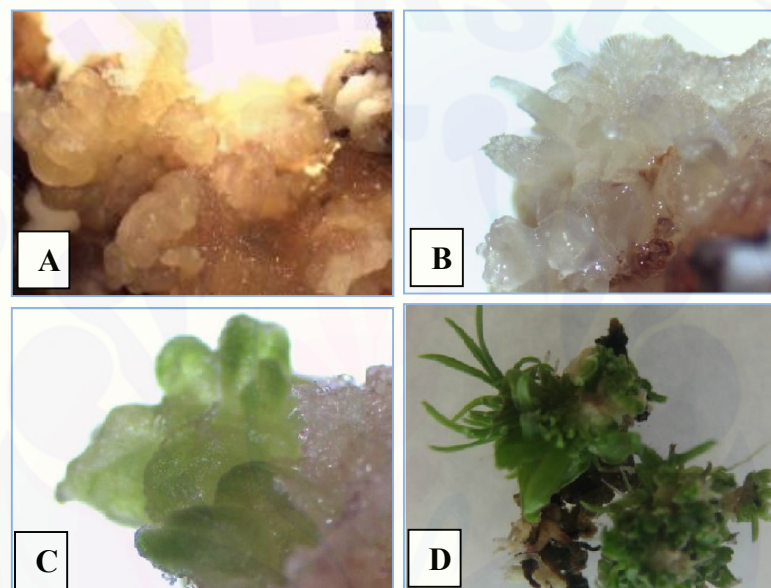
Gambar 4.8 Perkembangan kalus pada media PK1; Tidak ada perkembangan yang terjadi pada kalus hasil induksi yang disubkultur pada perlakuan media PK1 (kontrol)



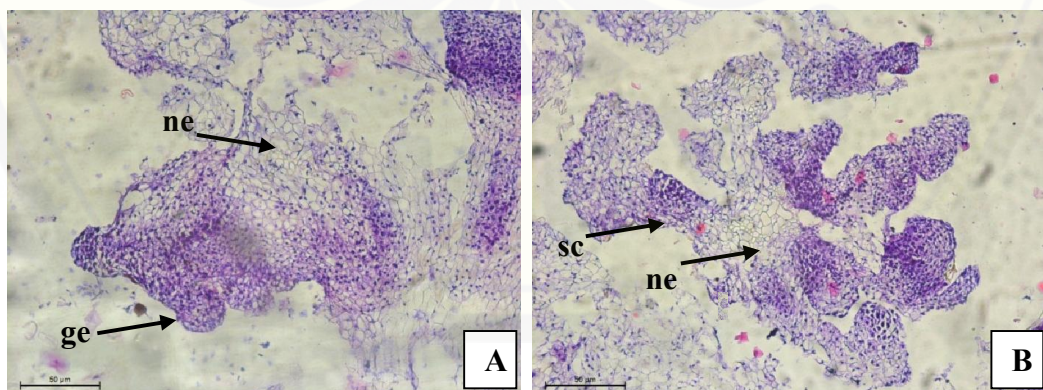
Gambar 4.9 Perkembangan embrio somatik pada perlakuan media PK2 (MS + 1,5ppm 2,4-D + 300ppm CH + 560ppm L-Prolin) dimana (A) Fase globular (6 MST), (B) Fase Skutelar (7 MST), (C) Fase Koleoptilar (8 MST), dan (D) Fase Kotiledon (12 MST)

Gambar 4.9 dan Gambar 4.10 menunjukkan perbedaan morfologis antara kedua perlakuan yaitu media PK2 dan media PK3. Sedangkan perlakuan media PK 1 (pada Gambar 4.8) tidak menunjukkan perkembangan kalus embriogenik menjadi embrio somatik dikarenakan peristiwa *browning* terjadi sangat tinggi pada perlakuan tersebut. Hasil yang didapatkan dari perlakuan media PK2 dan perlakuan media PK3 tidak jauh berbeda. Namun jika dilihat secara keseluruhan, peristiwa *browning* lebih banyak terjadi pada perlakuan media PK2 dibandingkan dengan perlakuan PK3 yang cenderung lebih berhasil dalam menghasilkan embrio

somatik. Beberapa kalus yang masuk pada media proliferasi telah membentuk fase globular yaitu pada 6 minggu setelah tanam. Fase skutelar terbentuk selama kurang lebih 1 minggu kemudian. Fase skutelar selanjutnya berubah menjadi fase koleoptilar selama kurang lebih 1 minggu. Pada perubahan menjadi fase kotiledon membutuhkan waktu sekitar 2 hingga 4 minggu. Namun hal ini tidak terjadi secara serempak. Karena terbentuknya fase pada kalus yang merupakan kumpulan dari banyak sel adalah tidak merata sehingga subkultur ke media regenerasi kalus harus dilakukan secara bertahap sesuai kondisi kalus yang ada.



Gambar 4.10 Perkembangan embrio somatik pada perlakuan media PK3 (MS + 2ppm 2,4-D + 300ppm CH + 560ppm L-Prolin) dimana (A) Fase globular (6 MST), (B) Fase Skutelar (7 MST), (C) Fase Koleoptilar (8 MST), dan (D) Fase Kotiledon (12 MST)



Gambar 4.11 Hasil pengamatan histologis kalus embriogenik menggunakan mikroskop pada (A) Fase globular dan (B) Fase skutelar (ge : globular embrio, ne : non embriogenik, sc : skutelar)

Gambar 4.11 menunjukkan hasil uji histologis kalus embriogenik dimana (A) diambil pada kalus yang memasuki fase globular dan (B) pada kalus yang memasuki tahap skutelar. Perbedaan warna menunjukkan kerapatan sel pada kalus. Dimana sel yang rapat atau memiliki ukuran yang kecil, sitoplasma padat, inti besar, vakuola kecil, dan mengandung butir pati merupakan ciri sel yang bersifat embriogenik atau meristematik (Purnamaningsih, 2002). Sedangkan kalus yang bersifat non embriogenik memiliki ciri ukuran sel yang lebih besar.

4.1.3 Tahap Regenerasi Kalus

Hasil analisis ragam pada tahapan regenerasi kalus juga menunjukkan bahwa terdapat perbedaan sangat nyata pada perlakuan pemberian berbagai macam zat pengatur tumbuh dengan atau tanpa asam amino terhadap parameter waktu terbentuknya tunas, jumlah tunas, serta tinggi tunas.

Tabel 4.2 Hasil analisis ragam pada parameter waktu terbentuknya tunas, jumlah tunas, tinggi tunas, dan waktu terbentuknya akar.

Parameter	Nilai F-hitung
Waktu terbentuknya tunas	213,73 **
Jumlah tunas	844,05 **
Tinggi tunas	16,98 **
Waktu terbentuknya akar	27,79 **

Keterangan: ** = Berbeda sangat nyata

Hasil dari seluruh parameter pengamatan yang berbeda sangat nyata kemudian diuji lanjut dengan menggunakan uji Kontras Ortogonal taraf 5%. Pada parameter waktu terbentuknya tunas dan akar, nilai terbaik yaitu pada nilai rata-rata terendah karena menunjukkan waktu terbentuknya tunas yang paling cepat, sedangkan nilai yang lebih tinggi menunjukkan perkembangan yang lebih lambat dalam pembentukan tunas. Pada parameter jumlah tunas dan tinggi tunas nilai

terbaik yaitu pada nilai rata-rata tertinggi karena menunjukkan jumlah tunas yang terbentuk lebih banyak serta sehat secara visual yang dilihat dari tinggi tunas.

Tabel 4.3 Hasil uji kontras orthogonal pada perlakuan media terhadap parameter waktu terbentuknya tunas, jumlah tunas, tinggi tunas, dan waktu munculnya akar

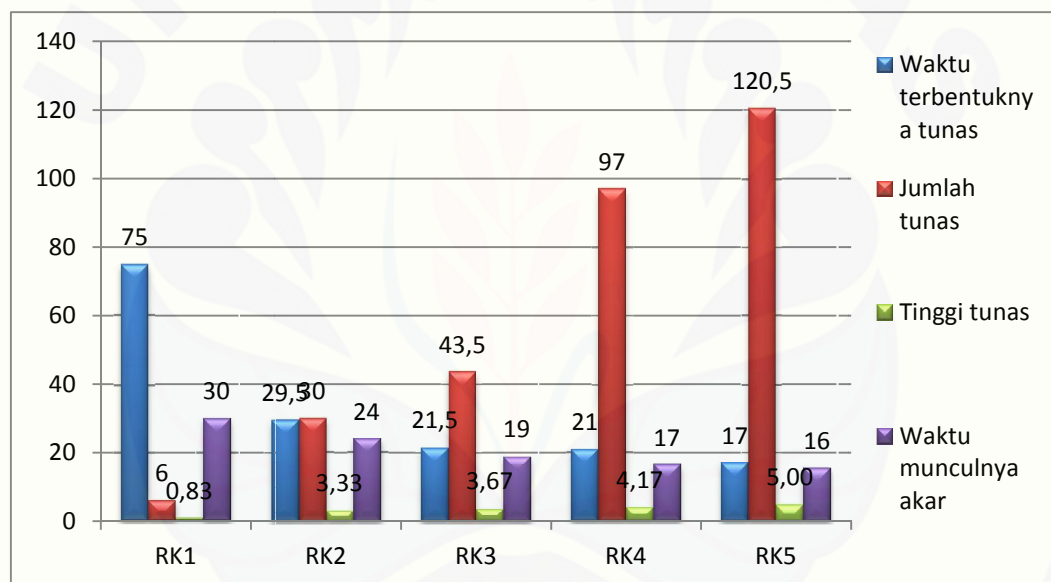
Kontras	Waktu Terbentuknya Tunas	Jumlah Tunas	Tinggi Tunas	Waktu Munculnya Akar
RK 1 >> RK2,RK3,RK4,RK5	824,46 **	1320,17 **	57,01 **	77,88 **
RK2, RK3 >> RK4, RK5	15,65 **	1920,00 **	8,12 **	3987,69 **
RK2 >> RK3	11,85 **	33,75 **	0,38 ns	70,10 **
RK4 >> RK5	2,97 ns	102,27 **	2,40 ns	212,40 **

Keterangan : (**) Berbeda sangat nyata, (ns) Berbeda tidak nyata

Tabel 4.3 merupakan tabel hasil uji kontras orthogonal pada perlakuan media RK1 (kontrol), media RK2 (MS + 0,25ppm BAP), media RK3 (MS + 0,5ppm BAP), media RK4 (MS + 0,25ppm BAP + 300ppm CH + 100ppm L-Glutamine), dan media RK5 (MS + 0,5ppm BAP + 300ppm CH + 100ppm L-Glutamine) terhadap parameter waktu terbentuknya tunas, jumlah tunas, tinggi tunas, serta waktu terbentuknya akar. Uji lanjut menggunakan kontras orthogonal yang pada penelitian ini membandingkan antara kontrol dengan kelompok perlakuan, antara kelompok perlakuan menggunakan asam amino dan tanpa asam amino, serta antar perlakuan menggunakan asam amino itu sendiri dan antar perlakuan tanpa asam amino itu sendiri. Berdasarkan uji lanjut yang telah dilakukan, pada parameter pengamatan waktu terbentuknya tunas, jumlah tunas, tinggi tunas dan waktu terbentuknya akar, kelompok kontrol yang dibandingkan dengan kelompok perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata. Hal tersebut menunjukkan bahwa kelompok perlakuan memiliki perbedaan hasil yang tinggi dibandingkan dengan perlakuan kelompok kontrol. Begitu pula hasil yang didapatkan pada kelompok perlakuan tanpa asam amino yang dibandingkan dengan kelompok perlakuan menggunakan asam amino semuanya menghasilkan

notasi berbeda sangat nyata pada parameter pengamatan baik waktu terbentuknya tunas, jumlah tunas, tinggi tunas maupun waktu terbentuknya akar.

Kelompok perlakuan tanpa penggunaan asam amino yang dibandingkan sendiri, menunjukkan hasil yang juga berbeda sangat nyata yang menunjukkan bahwa antara perlakuan RK2 dan RK3 memiliki perbedaan hasil yang cukup tinggi. Jika dilihat dari rata-rata hasil, maka perlakuan RK3 cenderung lebih tinggi hasilnya dibandingkan dengan perlakuan RK2. Pada kelompok dengan menggunakan asam amino yang dibandingkan yaitu RK4 >< RK5 menunjukkan hasil yang berbeda tidak nyata pada parameter pengamatan waktu terbentuknya tunas dan tinggi tunas. Pada parameter jumlah tunas dan waktu terbentuknya akar menghasilkan perbedaan yang sangat nyata.



Gambar 4.12 Grafik rata-rata hasil perlakuan media RK1, RK2, RK3, RK4, dan RK5 terhadap parameter pengamatan waktu terbentuknya tunas, jumlah tunas, tinggi tunas, dan waktu munculnya akar.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Tahap Induksi Kalus

Embriogenesis somatik dapat terjadi melalui dua cara, yaitu secara langsung maupun secara tidak langsung. Embryogenesis somatik secara tidak langsung akan melalui tahapan induksi kalus terlebih dahulu sebelum tanaman dapat berkembang menjadi planlet. Eksplan tebu varietas NXI 1-3 yang

ditumbuhkan dalam kultur in-vitro mengalami pembengkakan semenjak 7 hari setelah tanam. Kalus mulai terlihat jelas setelah memasuki waktu 11 – 15 hari setelah tanam pada perlakuan media IK3 (MS + 4ppm 2,4-D + 300ppm Casein Hydrolisat). Pada perlakuan media IK2 (MS + 3ppm 2,4-D + 300ppm Casein Hydrolisat) kalus mulai terlihat pada 16 – 20 hari setelah tanam. Sedangkan pada perlakuan media IK1 (Kontrol) menunjukkan waktu pembentukan kalus terlama yaitu 27 hari setelah tanam. Hingga batas waktu pengamatan waktu terbentuknya kalus berakhir yaitu 42 hari, sebagian besar eksplan pada media IK1 tidak berhasil membentuk kalus. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Ho dan Vasil (1983) yang menyatakan bahwa perkembangan pada induksi kalus yaitu pada umur 8 hari setelah tanam kalus mulai terbentuk. Namun baru pada 14 – 21 hari setelah tanam kalus lebih jelas terbentuk dan mulai berdiferensiasi untuk menjadi bersifat embriogenik (embryoids). Kalus umur 30 – 55 hari setelah tanam telah menjadi kalus yang embriogenik. Grafik waktu terbentuknya kalus akibat pengaruh pemberian media induksi dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Jahangir dan Nasir (2010) menyatakan bahwa dari penelitian yang telah dilakukannya, dari semua varietas yang diujikan menunjukkan hasil induksi kalus tanaman tebu yang maksimal pada media kultur MS dengan penambahan ZPT 2,4-D 3 ppm dan 4 ppm secara tunggal. Ramanand et al (2006) juga menyebutkan bahwa presentase induksi kalus tanaman tebu tertinggi diperoleh dari eksplan daun muda yang ditanam pada media 2,4-D 4 ppm selama 10-14 hari. Kalus pertama kali muncul pada bagian yang terpotong atau terluka. Bagian tersebut menyerap lebih banyak nutrisi yang mengarah pada pembelahan sel yang lebih cepat kemudian disusul dengan pembentukan kalus (Gill *et al.*, 2004).

Pelepah daun (*leaf sheath*) dan tulang daun (*midrib*) merupakan bagian yang paling cocok untuk menginduksi kalus. Gulungan daun terdalam (1-2 gulung) disebutkan bahwa kalus yang terbentuk mempunyai tekstur yang lebih halus dibandingkan dengan kalus yang terbentuk dari gulungan daun ke 4-5 yang lebih remah dan lebih cocok untuk menginduksi kalus embriogenik. Gulungan daun yang melebihi gulungan ke-6 tidak memproduksi kalus embriogenik melainkan akar. Sedangkan kerapatan dan jumlah kalus embriogenik yang terbentuk

tergantung dari umur daun dan jarak bagian daun yang digunakan sebagai eksplan dengan bagian basal. Jarak eksplan dari bagian basal sekitar 1-2 cm menghasilkan hampir 100% kalus embriogenik (Ho dan Vasil, 1983).

Sel somatik secara teori mempunyai sifat totipotensi sel. Namun demikian, stimulus kimia berupa zat pengatur tumbuhlah yang memicunya bersifat embriogenik pada kebanyakan kasus. Zat pengatur tumbuh dari golongan auksin berupa 2,4-D merupakan jenis auksin yang paling banyak digunakan untuk menginduksi kalus pada tanaman famili Gramineae (Lee *et al.* 2011) termasuk tanaman tebu. Peran penting 2,4-D lainnya yaitu bahwa auksin tersebut dapat mengaktifkan ekspresi dari gen Somatic Embryogenesis Receptor Kinase (SERK1) yang mendukung terjadinya embryogenesis somatik. Gill *et al.* (2004) menyatakan bahwa pada tanaman tebu, konsentrasi ZPT 2,4-D sebesar 3-4 ppm dapat menginduksi kalus. Auksin tinggi yang diberikan di awal memicu sel somatik untuk menginduksi gen yang memproduksi zat yang diperlukan untuk melengkapi fase globular dari serangkaian tahapan embryogenesis somatik. Selain itu, penggunaan Casein Hydrolysate sebesar 300 ppm juga dilaporkan memberi pengaruh terbaik pada induksi kalus padi sebesar 74% (Duangsee dan Bunnag, 2014).

Pengamatan morfologi menjadi salah satu faktor penting dalam penelitian ini. Morfologi kalus yang ada diamati untuk kemudian dilaporkan. Kalus yang bersifat embriogenik memiliki beberapa ciri tertentu diantaranya berwarna putih bening hingga bening kekuningan, tampak mengkilap (*glossy*), serta mempunyai struktur remah. Sedangkan kalus yang tidak bersifat embriogenik dicirikan dengan warnanya yang putih susu hingga kuning kecoklatan, tampak basah dan lembek, serta memiliki struktur kalus yang kompak sehingga sulit untuk berdiferensiasi (Alcantara, *et al.*, 2014). Adanya peristiwa browning akan menghambat penyerapan nutrisi oleh eksplan, hal tersebut menyebabkan penurunan proses pengkalusan. Pada saat tanaman terluka, seperti selama proses pemotongan gulungan daun, zat fenolik yang sebagian besar berada di vakuola, akan tercampur dengan isi dari plastida dan organel-organel lainnya oleh karena hal tersebut

warna gelap muncul. Peristiwa tersebut akan menghambat aktivitas enzim dan dapat menyebabkan kematian baik pada eksplan dan juga media (Gill *et al.*, 2004)

Transfer ke media proliferasi kalus dilakukan pada eksplan yang berumur minimal 6 minggu setelah tanam. Apabila dilihat dari morfologinya, Kalus yang terbentuk pada eksplan berumur 6 minggu setelah tanam lebih banyak jika dibandingkan dengan eksplan berumur 4 minggu setelah tanam yang masih ada beberapa bagian berupa daun. Selain itu, Haq dan Memon (2012) menyebutkan bahwa apabila kalus yang lebih muda dari 6 minggu setelah tanam dipindahkan ke media proliferasi, maka akan sedikit bahkan tidak ada kalus yang mampu beregenerasi menjadi tanaman. Hal serupa juga disebutkan oleh Roy *et al.* (2011) bahwa umur kalus merupakan faktor penting dalam menginduksi embrio somatik. Hanya kalus yang berumur 6-10 minggu setelah tanam yang dapat menginduksi embrio somatik.

4.2.2 Tahap Proliferasi Kalus

Kalus embriogenik berumur 6 minggu setelah tanam yang didapatkan dari hasil induksi kalus kemudian dipindah ke media proliferasi kalus. Proliferasi kalus merupakan tahapan yang sangat penting dan bertujuan untuk membiarkan kalus mengalami proses elongasi sel sekaligus mendapatkan embrio somatik. Pada tahap induksi kalus, media dengan auksin tinggi digunakan untuk menginduksi pembelahan sel sehingga muncul jaringan kalus tersebut. Sedangkan pada tahap proliferasi, auksin yang digunakan adalah lebih rendah hingga setengah dari konsentrasi auksin pada media induksi (Hussein, *et al.*, 2006). Kalus yang lolos ke tahap proliferasi merupakan kalus yang berasal dari media induksi IK2 dan IK3. Sedangkan media IK1 hanya sedikit sekali bahkan dapat dikatakan tidak menghasilkan kalus embriogenik. Keberadaan kalus embriogenik dan non embriogenik dapat saja terbentuk dalam 1 *clumps* kalus. Hal tersebut diduga dapat berkaitan dengan faktor internal dan karakteristik masing-masing jaringan (Figueroa, *et al.*, 2006). Beberapa penelitian lain juga menunjukkan kalus yang kompeten dan tidak kompeten menjadi embriogenik muncul dalam eksplan yang sama, yang mengindikasikan bahwa meskipun sel tersebut identik secara genetik

namun respon terhadap stimulus tertentu dapat berbeda, dengan sebagian kecil sel-sel menjadi responsif (Jimenez, 2001).

Embrio somatik biasanya muncul dari tahap globular yang langsung muncul pada kumpulan kalus. Fase-fase embrio somatik dapat diamati pada permukaan kalus embriogenik. Tahapan tersebut terjadi dalam waktu singkat dan kemampuannya menurun seiring lamanya durasi inkubasi pada media (Roy *et al.*, 2011). Embrio somatik yang pertama kali muncul mempunyai ciri-ciri berukuran kecil, dan berupa tonjolan berwarna lebih keruh yang dapat dilihat di permukaan kalus. Embrio kemudian melalui fase globular untuk menjadi fase skutelar dan koleoptilar. Hal yang bersamaan dengan perubahan morfologi tersebut, juga terjadi perubahan warna dari keruh kemudian menjadi transparan hingga tak tembus cahaya, serta dari berwarna pucat menjadi kehijauan. Pada embrio somatic tahap lanjut yang telah berwarna kehijauan biasanya digambarkan pula dengan primordia dan daun yang terbentuk sempurna (Khalil, 2002).

Zat pengatur tumbuh yang digunakan pada tahap proliferasi kalus berasal dari kelompok yang sama seperti pada tahap induksi kalus, yaitu 2,4-D dari golongan auksin. Namun konsentrasinya yang digunakan lebih rendah hingga mencapai setengah dari konsentrasi 2,4-D yang ada pada tahap induksi kalus. Disisi lain, pada tahap proliferasi kalus ditambahkan asam amino lainnya yang mendukung proses pembentukan embrio somatic, yaitu L-Proline. L-Proline memiliki peran penting dalam menjadi trigger untuk memunculkan embrio somatik, karena berfungsi sebagai zat desikasi. Penambahan L-Proline pada media kultur meningkatkan penurunan nitrogen dalam media sehingga sel mampu meningkatkan perkembangan embrio hingga perkecambahan embrio somatik yaitu menjadi fase kotiledon, hingga akhirnya menjadi planlet (Roy *et al.*, 2011). Moghaddam (2000) juga menyatakan bahwa dengan ditambahkan L-Proline ke dalam media kultur seperti menciptakan kondisi stress yang dibutuhkan yang mana akan menurunkan potensial air, meningkatkan akumulasi nutrisi di dalam sel, dan akhirnya meningkatkan pembentukan embrio. Kehadiran L-Proline diduga mampu menghambat peristiwa *browning* pada jaringan tanaman yang dikarenakan oksidasi senyawa fenolik yang dihasilkan dari aktivitas oksidasi fenol

dalam kultur sel (Takahashi dan Takamizo, 2013). Konsentrasi L-Proline sebesar 560 ppm dilaporkan mampu berperan sebagai *buffer* dalam media kultur dan hal tersebut akan menstabilkan perubahan pH yang terjadi pada media selama kultur berlangsung. Proline juga dapat meningkatkan embrio somatic pada tanaman tebu (Gill *et al.*, 2004). Hanya embrio yang telah dewasa (telah mencapai fase kotiledon) dengan morfologi normal dan memiliki cukup zat-zat yang dibutuhkan untuk melewati fase toleran desikasi yang dapat tumbuh menjadi planlet (Hussein, *et al.*, 2006).

4.2.3 Tahap Regenerasi Kalus

Kalus yang terbentuk dari tahapan embriogenesis somatik membentuk unit menyerupai embrio (*embryoids*) yang memiliki dua calon meristem atau dikatakan bipolar. *Embryoids* ini akan mengalami tahap pendewasaan dan perkecambahan pada tahap proliferasi (Gandonou, *et al.*, 2005). Kalus embriogenik dari tahap proliferasi yang telah berkembang menjadi kotiledon telah memiliki calon akar, sehingga dapat dipindahkan ke media regenerasi. Regenerasi kalus dimaksudkan agar kalus dapat berkembang membentuk tunas dan akar sempurna yaitu menjadi planlet. Embrio somatik dapat dicirikan dengan strukturnya yang bipolar yaitu memiliki dua calon meristem diantaranya meristem tunas dan akar. Hal tersebut menyebabkan perbanyakan melalui embriogenesis somatik lebih menguntungkan daripada pembentukan tunas adventif yang bersifat unipolar (Purnamaningsih, 2002).

Penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) dapat menjadi faktor penentu keberhasilan proses diferensiasi sel dan jaringan selama waktu kultur (Sukmadjaja dan Mulyana, 2011). Beberapa macam ZPT telah banyak digunakan dalam metode kultur jaringan tebu. Pada tahapan regenerasi ZPT yang digunakan adalah dari golongan sitokinin. BAP merupakan ZPT dari golongan sitokinin yang banyak digunakan dalam regenerasi tanaman tebu secara *in-vitro*. BAP dengan konsentersasi 0,5 ppm meregenerasi tunas hasil embryogenesis somatik dengan jumlah paling banyak (Gill *et al.*, 2004). Penambahan 0,5 ppm BAP juga memberikan hasil terbaik pada induksi tunas tebu (Alcantara, *et al.*, 2014).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah

1. Eksplan (*spindle leaf*) tanaman Tebu Varietas NXI 1-3 memberikan respon yang tinggi terhadap induksi kalus yaitu diatas 70% dengan hasil rata-rata regenerasi kalus mencapai 59 tunas.
2. Tahapan embrio somatik berhasil diperoleh selama tahap proliferasi kalus yaitu berupa fase globular, fase skutelar, fase koleoptilar, dan fase kotiledon.
3. Perlakuan terbaik pada tahap induksi kalus adalah perlakuan media dengan penggunaan MS + 4ppm 2,4-D + 300ppm CH, kemudian pada tahap proliferasi kalus adalah perlakuan media dengan penggunaan MS + 2ppm 2,4-D + 300ppm CH + 560ppm L-Proline, sedangkan pada tahap regeenerasi kalus, perlakuan media MS + 0,5ppm BAP + 300ppm CH + 100ppm L-Glutamin.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan yaitu dalam penelitian ini yaitu kalus hasil proliferasi dapat dioptimalkan pertumbuhannya dengan mensubkultur pada media cair untuk merangsang pertumbuhan *single cell* yang dapat mengoptimumkan pembentukan embrio somatik, serta aplikasi dengan menggunakan bioreaktor dapat mengoptimalkan hasil mikropropagasi melalui embriogenesis somatik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ageel, S. dan K. Elmeer. 2011. Effects of Casein Hydrolyses and Glutamine on Callus and Somatic Embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *New York Science Journal* 4 (7): 121-125.
- Alcantara, G.B.D., R. Dibax, R.A.D. Oliveira, J.C.B. Filho, dan E. Daros. 2014. Plant Regeneration and Histological Study of the Somatic Embryogenesis of Sugarcane (*Saccharum* spp.) Cultivars RB855156 and RB72454. *Acta Scientiarum Agronomy Maringa*, 36 (1): 63-72.
- Ali, S., M. S. Khan, dan J. Iqbal. 2012. In Vitro Direct Plant Regeneration From Cultured Young Leaf Segments of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 22 (4): 1107-1112.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2007. *Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Tebu Edisi Kedua*. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Departemen Perindustrian. 2009. *Roadmap Industri Gula*. Direktorat Jendral Industri Agro dan Kimia.
- Desai, N. S., P. Suprasanna, dan V. A. Bapat. 2004. Simple and Reproducible Protocol for Direct Embryogenesis somatik from Cultured Immature Inflorescence Segments of Sugarcane (*Saccharum* spp.). *Current Science*, 87 (6): 764-768.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2011. *Pedoman Teknis Pengelolaan Kebun Benih Tebu dengan Bahan Tanam Bagal Mikro G2*. Kementerian Pertanian.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2015. *Luas Areal, Produksi, dan Produktivitas Perkebunan di Indonesia*. <http://www.pertanian.go.id>. Diakses tanggal 28 Maret 2015.
- Duangsee, K. dan S. Bunnag. 2014. Influence of Nutrient Composition and Plant Growth Regulators on Callus Induction and Plant Regeneration in Glutinous Rice (*Oryza sativa* L.). *Pakistan Journal of Biological Science*, 17 (1): 98-103.
- 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 Cell Differentiation in Plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 86: 285-301.

- Gandonou, C., T. Errabii, J. Abrinii, M. Idaomari, F. Chibi, dan N.S. Senhaji. 2005. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). *African Journal of Biotechnology*, 4 (11): 1250-1255.
- Gill, N. K., R. Gill, dan S. S. Gosal. 2004. Factors Enhancing Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Suarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Indian Journal of Biotechnology*, 3: 119-123.
- Haq, I. dan S. Memon. 2012. Efficient Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivar CPF-237. *African Journal of Biotechnology*, 11 (15): 3704-3708.
- Ho, W. J. dan I. K. Vasil. 1983. Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. The Morphology and Physiology of Callus Formation and the Ontogeny of Somatic Embryos. *Protoplasma*, 18: 169-180.
- Hussein, 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.
- Ibrahim, M.S.D., O. Rostiana, N. Khumaida. 2010. Pengaruh Umur Eksplan Terhadap Keberhasilan Pembentukan Kalus Embriogenik Pada KULTUR Meristem Jahe (*Zingiber officinale* Rose). *Jurnal Littri*, 16 (1): 37-42.
- Jahangir, G. Z. dan I. A. Nasir. 2010. Various Hormonal Supplementations Activate Sugarcane Regeneration In Vitro. *Journal of Agricultural Science*, 2 (4): 231-237.
- Jimenez, V.M. 2001. Regulation of In Vitro Somatic Embryogenesis With Emphasis on The Role of Endogenous Hormones. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 13 (2): 196-223.
- Kartikaningsih, A. 2009. Analisis Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Motivasi Petani dalam Berusahatani Tebu (Studi Kasus: Petani di Wilayah Kerja PG Trangkil, dan Kabupaten Pati. *Skripsi*.
- Khaleeda, L. dan M. Al-Forkan. 2006. Stimulatory of Casein Hydrolysis and Peoline in In-Vitro Callus Induction and Plant Regeneration from Five Deepwater Rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnology*, 5 (3): 379-384.
- Khalil, S.M. 2002. Regeneration via Somatic Embryogenesis and Microprojectile-mediated Co-transformation of Sugarcane. *Arab Journal Biotechnology*, 5 (1): 19-32.

- Lee, K.W., O. Chinzorig, G.J. Choi, K.Y. Kim, H.C. Ji, H.S. Park, W.H. Kim, dan S.H. Lee. 2011. Factors Influencing Callus Induction and Plant Regeneration of Dahurian Wildrye Grass (*Elymus dahuricus* L.). *African Journal of Biotechnology*, 11 (4): 815-820.
- Litbang Induk PTPN. 2012. Deskripsi Varietas VMC 86-550. <http://litbanginduk.blogspot.com/2012/06/diskripsi-varietas-tebu>. Diakses tanggal 03 September 2013.
- Malabadi R.B., G.S. Mulgund, K. Nataraja, dan S.V. Kumar. 2011. Induction of Somatic Embryogenesis in Different Varieties of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Research in Plant Biology*, 1 (4): 39-48.
- Moghaddam, B. E., M. Mesbah, dan N. Yavari. 2000. The Effect of in Planta TIBA and Proline Treatent on Somatic Embryogenesis of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). *Euphytica*, 112: 151-156.
- Mulyono, D. 2011. Kebijakan Pengembangan Industri Bibit Tebu Unggul untuk Menunjang Program Swasembada Gula Nasional. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*, 13 (1): 60-64.
- Naz, S., A. Ali, dan A. Siddique. 2008. Embriogenesis somatik and Plantlet Formation in Different Varieties of Sugarcane (*Sacchrum Officinarum* L.) HSF-243 and HSF-245. *Sarhad J. Agriculture*, 24 (4): 593-598.
- Percy, R. E., K. Klimaszweska, dan D. R. Cyr. 2000. *Evaluation of Embriogenesis somatik for Clonal Propagation of Western White Pine*. NRC Research Press. Canada.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Buletin AgroBio* 5 (2): 51-58.
- Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. 2012. *Upaya Pencapaian Swasembada Gula Nasional 2014*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Kementerian Pertanian. www.perkebunan.litbang.deptan.go.id/?p=404. Diakses tanggal 03 September 2013.
- Ramanand, N. Kureel, N. Subhanand, M. Lal, dan S.B. Singh. 2006. Planlet Regeneration Through Leaf Callus Culture in Sugarcane. *Sugar Tech*, 8 (1): 85-87.
- Rasullah, F. F. F., T. Nurhidayati, dan Nurmalasari. 2013. Respon Pertumbuhan Tunas Kultur Meristem Apikal Tebu (*Saccharum officinarum*) Varietas NXI 1-3 secara *In-Vitro* pada Media MS dengan Penambahan Arginin dan Glutamin. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2 (2): 2337-3520.

- Remita, Y., T. Nurhidayati, dan Nurmalasari. 2013. Pengaruh Medium MS dengan Penambahan Arginin 100 ppm Terhadap Pertumbuhan Tunas Apikal Tebu (*Saccharum officinarum*) Varietas NXI. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2 (1): 2337-3520.
- Riset Perkebunan Nusantara. 2012. *P3GI Siap Pasok 100 Juta Bibit untuk Bongkar Ratoon*. Artikel Media Perkebunan Edisi 107. www.ipard.com/art_perkebun/klip_okt12_04.asp. Diakses tanggal 03 September 2014.
- Roy, M., M. Hossain, A. Biswas, M.K. Biswas, dan R. Islam. 2011. Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis from Leaf Sheath Derived Callus of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) var. Isd-16. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 21 (2): 143-149.
- Rusdianto dan A. Indrianto. 2012. Induksi Kalus Embriogenik pada Wortel (*Daucus carota* L.) Menggunakan 2,4-Dychlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Bionature*, 13 (2): 136-140.
- Silva, M.M.D.A., C. Ulisses, M.J.L.E Medeiros, M.M.C. Granja, L. Willadino, dan T. Camara, 2014. Antioxidant Enzymes Activity in Embryogenic And Non-Embryogenic Tissue in Sugarcane. *Acta Biologica Colombiana*, 19 (2): 203-210.
- Sugito, H. 2006. Penggunaan Thidiazuron, 2,4-D dan Giberellin dalam Pembentukan Embrio Somatik Pule Pandak (*Rauwolfia Serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz) Melalui Kultur In Vitro. *Tesis*.
- Sukmadjaja, D dan Mulyana, A. 2011. Regenerasi dan Pertumbuhan Beberapa Varietas Tebu (*Saccharum officinarum*L.) secara *In Vitro*. *AgroBiogen*. 7(2):106-118.
- Suprasanna, P., R.S. Choudhary, N.S. Desai, dan V.A. Bapat. 2005. Regulation of Somatic Embryogenesis by Plant Growth Regulators in Sugarcane. *Sugar Tech* 7 (4): 123-128.
- Supriyadi, A. 1992. *Rendemen Tebu Liku - Liku Permasalahannya*. Kanisius. Yogyakarta.
- Tahir, S.M., K. Victor., dan S. Abdulkadir. 2011. The Effect of 2, 4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2, 4-D) Concentration on Callus Induction in Sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*. 19 (2): 213-217.

- Takahashi, W. dan T. Takamizo. 2013. Plant Regeneration from Embryogenic Calli of the Wild Sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.) Clone 'Glagah Kloet'. *Bulletin NARO Inst Livest Grassl Sci*, 13: 23-32.
- Wamaitha, M. J., K. Suwa, K. Fukuda, and M. Mii. 2010. Thidiazuron-Induced Rapid Shoot Regeneration Via Embryo-Like Structure From Tip-Derived Callus Culture of Sugarcane. *Plant Biotechnology*, 27: 365-368.
- Williams, E. G. dan Maheswaran. 1986. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behavior of Cells as an Embryogenic Group. *Ann Botany*, 57: 443-462.
- Winarni, S. 1993. Pengaruh Keseimbangan Konsentrasi IAA dan Kinetin Terhadap Pertumbuhan Plantlet Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Melalui Kultur Kalus. *Skripsi*: 5-6.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media MS

Komposisi media MS yang rinci dapat dilihat sebagai berikut:

STOK	Pengambilan	Unsur Hara	Volume yang Diambil	Dilarutkan dalam Aquades
A	20 ml	NH ₄ NO ₃	82,5 g	1000 ml
B	20 ml	KNO ₃	95 g	1000 ml
C	10 ml	CaCl ₂ .2H ₂ O	22 g	250 ml
D	10 ml	H ₃ BO ₃ KH ₂ P0 ₄ CoCl ₂ .6H ₂ 0 Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O KI	0,31 g 8,50 g 0,0013 g 0,0125 g 0,0415 g	250 ml
E	5 ml	MgSO ₄ .7H ₂ 0 ZnSO ₄ .7H ₂ 0 CuSO ₄ .5H ₂ 0 MnSO ₄ .7H ₂ 0	18,5 g 0,43 g 0,0013 g 0,7525 g	250 ml
F	5 ml	Na ₂ EDTA FeSO ₄ .7H ₂ O	1,86 g 1,39 g	250 ml
Vitamin	5 ml	Myo-inositol	0,02 g	100 ml
Vitamin	5 ml	Pyridoxine-HCl Thiamin-HCl	0,008 g 0,08 g	100 ml
Carbon	30 g	Sucrose		
Agar	2,5 g	Phytigel		

Lampiran 2**Parameter : Waktu Terbentuknya Kalus (Tahapan Induksi Kalus)****Desain : Rancangan Acak Lengkap**

ULANGAN	IK1	IK2	IK3	JUMLAH	RERATA
1	42	19	11	72	24,00
2	27	16	13	56	18,67
3	42	18	12	72	24,00
4	42	20	14	76	25,33
5	27	16	11	54	18,00
6	42	17	15	74	24,67
JUMLAH	222	106	76	404	
RERATA	37,00	17,67	12,67		22,44

Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	Ftab		
					0,05	0,01	
Perlakuan	2	1981,78	990,89	45,5	**	3,68	6,36
Galat	15	326,67	21,78				
Total	17	2308,44					

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata
 * Berbeda nyata
 ns Berbeda tidak nyata
 cv 0,99 %

Hasil Uji Jarak Berganda Duncan

Perlakuan	Rata-Rata	Rank	SSR 5%	DMRT 5%	Notasi
IK3	12,67	1	3,01	5,75	a
IK2	17,67	2	3,16	6,04	a b
IK1	37,00	3			c

Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada Uji DMRT 5%

Lampiran 3

Parameter : Presentase Terbentuknya Kalus (Tahapan Induksi Kalus)

Desain : Rancangan Acak Lengkap

ULANGAN	IK1	IK2	IK3	JUMLAH	RERATA
1	0	80	80	160	53,33
2	20	60	100	180	60,00
3	0	80	60	140	46,67
4	0	80	100	180	60,00
5	20	40	100	160	53,33
6	0	80	100	180	60,00
JUMLAH	40	420	540	1000	
RERATA	6,67	70	90		55,56

Data Hasil Transformasi $\sqrt{(n+0,5)}$

ULANGAN	IK1	IK2	IK3	JUMLAH	RERATA
1	0,71	8,97	8,97	18,65	6,22
2	4,53	7,78	10,02	22,33	7,44
3	0,71	8,97	7,78	17,46	5,82
4	0,71	8,97	10,02	19,70	6,57
5	4,53	6,36	10,02	20,92	6,97
6	0,71	8,97	10,02	19,70	6,57
JUMLAH	11,88	50,03	56,85	118,76	
RERATA	1,98	8,34	9,48		

Sidik Ragam

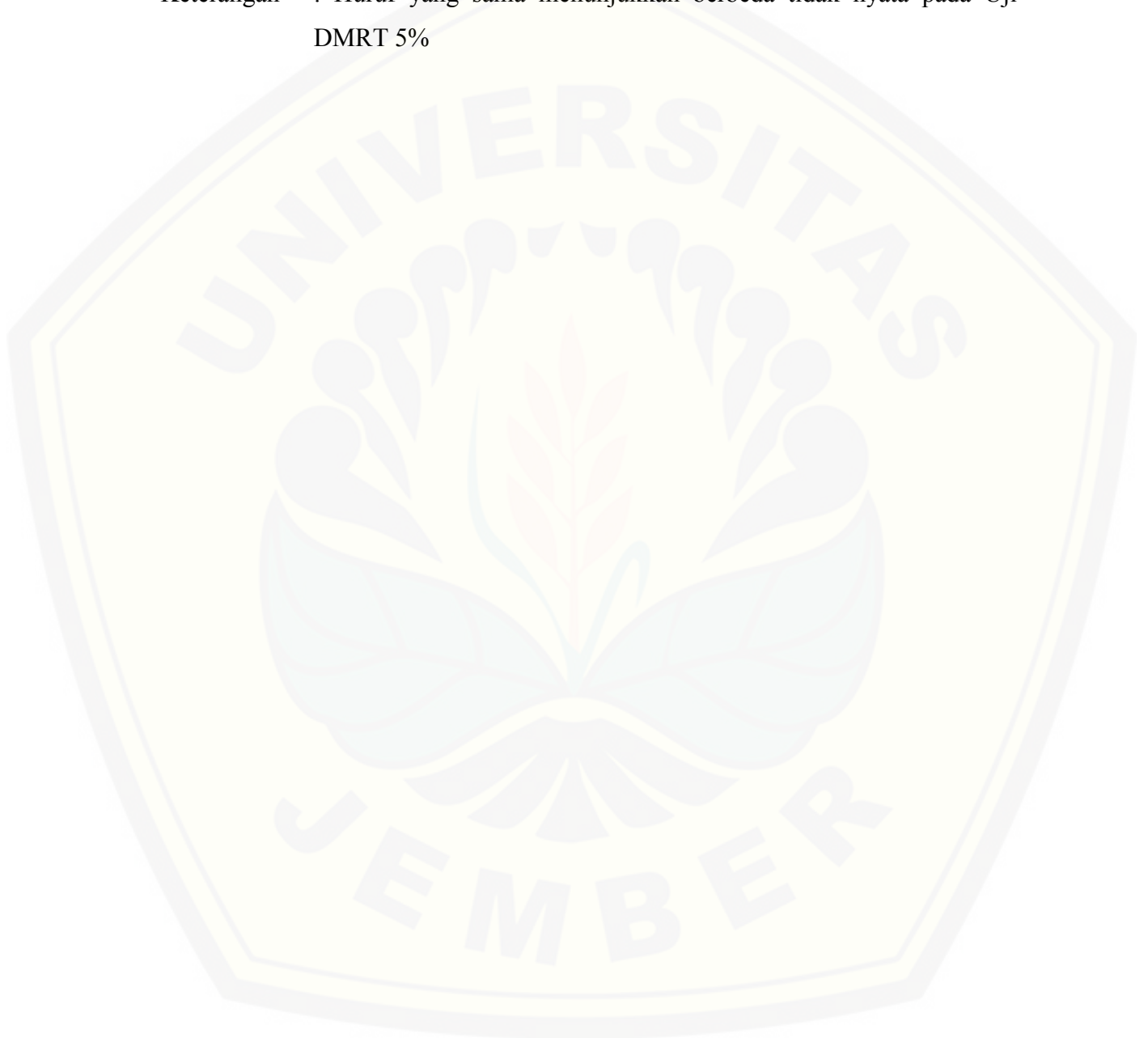
SK	db	JK	KT	Fhit		Ftab	
						0,05	0,01
Perlakuan	2	195,76	97,88	49,56	**	3,68	6,36
Galat	15	29,62	1,97				
Total	17	225,38					

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata
 * Berbeda nyata
 ns Berbeda tidak nyata
 cv 0,55 %

Hasil Uji Jarak Berganda Duncan

Perlakuan	Rata-Rata	Rank	SSR 5%	DMRT 5%	Notasi
IK1	1,98	1	3,01	1,72	a
IK2	8,34	2	3,16	1,80	b
IK3	9,48	3			b

Keterangan : Huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada Uji DMRT 5%



Lampiran 4

Parameter : Waktu Terbentuknya Tunas (Tahapan Regenerasi Kalus)

Desain : Rancangan Acak Lengkap

ULANGAN	RK1	RK2	RK3	RK4	RK5	JUMLAH	RERATA
1	75	27	23	20	15	160	32
2	75	32	20	22	19	168	33,6
JUMLAH	150	59	43	42	34	328	
RERATA	75	29,5	21,5	21	17		32,8

Sidik Ragam

SK	db	JK	KT	Fhit	not	F5%
Perlakuan	4	4616,6	1154,15	213,73	**	5,19
Galat	5	27	5,4			
Total	9	4643,6				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata
 * Berbeda nyata
 ns Berbeda tidak nyata
 cv 1,64 %

Matriks Kontras Orthogonal

Kontras	RK1	RK2	RK3	RK4	RK5	Σk_i	Q _i	JK
	150	59	43	42	34			
RK 1 \gg RK2,RK3,RK4,RK5	4	-1	-1	-1	-1	0	422	4452,1
RK2, RK3 \gg RK4, RK5	0	1	1	-1	-1	0	26	84,5
RK2 \gg RK3	0	1	-1	0	0	0	16	64
RK4 \gg RK5	0	0	0	1	-1	0	8	16

Sidik Ragam Kontras Orthogonal

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	not	F5%
Perlakuan	4	4616,6	4557,85	844,05	**	5,19
RK 1 \gg RK2,RK3,RK4,RK5	1	4452,1	4452,1	824,463	**	6,61
RK2, RK3 \gg RK4, RK5	1	84,5	84,5	15,648	**	

RK2 >< RK3	1	64	64	11,852	**	
RK4 >< RK5	1	16	16	2,963	ns	
Galat	5	27	5,4			
Total	9	4643,6				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata
 ns Berbeda tidak nyata



Lampiran 5

Parameter : Jumlah Tunas (Tahapan Regenerasi Kalus)

Desain : Rancangan Acak Lengkap

ULANGAN	RK1	RK2	RK3	RK4	RK5	JUMLAH	RERATA
1	3	28	45	98	119	293	58,6
2	9	32	42	96	122	301	60,2
JUMLAH	12	60	87	194	241	594	
RERATA	6	30	43,5	97	120,5		59,4

Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	not	F5%
Perlakuan	4	18231,4	4557,85	844,05	**	5,19
Galat	5	37	7,4			
Total	9	18268,4				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata
 * Berbeda nyata
 ns Berbeda tidak nyata
 cv 1,92 %

Matriks Kontras Orthogonal

Kontras	RK1	RK2	RK3	RK4	RK5	Σk_i	Q _i	JK
	12	60	87	194	241			
RK 1 \times \times RK2,RK3,RK4,RK5	-4	1	1	1	1	0	534	7128,9
RK2, RK3 \times \times RK4, RK5	0	-1	-1	1	1	0	288	10368
RK2 \times \times RK3	0	-1	1	0	0	0	27	182,25
RK4 \times \times RK5	0	0	0	-1	1	0	47	552,25

Sidik Ragam Kontras Orthogonal

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	not	F5%
Perlakuan	4	18231,4	4557,85	844,05	**	5,19
RK 1 \times \times RK2,RK3,RK4,RK5	1	7128,9	7128,9	1320,167	**	6,61
RK2, RK3 \times \times RK4, RK5	1	10368	10368	1920,000	**	
RK2 \times \times RK3	1	182,25	182,25	33,750	**	

RK4 >< RK5	1	552,25	552,25	102,269	**	
Galat	5	37	7,4			
Total	9	18268,4				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata
ns Berbeda tidak nyata



Lampiran 6

Parameter : Tinggi Tunas (Tahapan Regenerasi Kalus)

Desain : Rancangan Acak Lengkap

ULANGAN	RK1	RK2	RK3	RK4	RK5	JUMLAH	RERATA
1	0,67	3,67	3,00	4,33	4,67	16,33	3,27
2	1,00	3,00	4,33	4,00	5,33	17,67	3,53
JUMLAH	1,67	6,67	7,33	8,33	10,00	34,00	
RERATA	0,83	3,33	3,67	4,17	5,00		3,40

Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	not	F5%
Perlakuan	4	19,62	4,91	16,98	**	5,19
Galat	5	1,44	0,29			
Total	9	21,07				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata
 * Berbeda nyata
 ns Berbeda tidak nyata
 cv 0,38 %

Matriks Kontras Orthogonal

Kontras	RK1	RK2	RK3	RK4	RK5	$\sum k_i$	Qi	JK
	1,67	6,67	7,33	8,33	10,00			
RK 1 \times RK2,RK3,RK4,RK5	-4	1	1	1	1	0	25,67	16,47
RK2, RK3 \times RK4, RK5	0	-1	-1	1	1	0	4,33	2,35
RK2 \times RK3	0	-1	1	0	0	0	0,67	0,11
RK4 \times RK5	0	0	0	-1	1	0	1,67	0,69

Sidik Ragam Kontras Orthogonal

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	not	F5%
Perlakuan	4	19,62	4,91	16,98	**	5,19
RK 1 \times RK2,RK3,RK4,RK5	1	16,47	16,47	57,01	**	6,61
RK2, RK3 \times RK4, RK5	1	2,35	2,35	8,12	**	
RK2 \times RK3	1	0,11	0,11	0,38	ns	

RK4 >< RK5	1	0,69	0,69	2,40	ns	
Galat	5	1,44	0,29			
Total	9	21,07				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata
ns Berbeda tidak nyata



Lampiran 7

Parameter : Waktu Terbentuknya Akar (Tahapan Regenerasi Kalus)

Desain : Rancangan Acak Lengkap

ULANGAN	RK1	RK2	RK3	RK4	RK5	JUMLAH	RERATA
1	28	23	20	16	15	102	20,40
2	32	25	18	17	16	108	21,60
JUMLAH	60	48	38	33	31	210	
Rerata	30	24	19	17	16		21

Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	not	F5%
Perlakuan	4	289	72,25	27,79	**	5,19
Galat	5	13	2,60			
Total	9	302				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata
 * Berbeda nyata
 ns Berbeda tidak nyata
 cv 0,38 %

Matriks Kontras Orthogonal

Kontras	RK1	RK2	RK3	RK4	RK5	$\sum k_i$	Qi	JK
	60	48	38	33	31			
RK 1 \times RK2,RK3,RK4,RK5	4	-1	-1	-1	-1	0	90	202,5
RK2, RK3 \times RK4, RK5	0	-1	-1	1	1	0	288	10368
RK2 \times RK3	0	-1	1	0	0	0	27	182,3
RK4 \times RK5	0	0	0	-1	1	0	47	552,3

Sidik Ragam Kontras Orthogonal

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	not	F5%
Perlakuan	4	19,62	4,91	16,98	**	5,19
RK 1 \times RK2,RK3,RK4,RK5	1	202,5	202,50	77,88	**	6,61
RK2, RK3 \times RK4, RK5	1	10368	10368,00	3987,69	**	
RK2 \times RK3	1	182,25	182,25	70,10	**	

RK4 >< RK5	1	552,25	552,25	212,40	**	
Galat	5	1,44	0,29			
Total	9	21,07				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata
ns Berbeda tidak nyata

