

## INDUKSI SOMATIK EMBRIOGENESIS TANAMAN TEBU TRANSGENIK BEBAS VIRUS (*Saccharum officinarum*. L) SUT EVENT 02 MENGGUNAKAN 2,4-D DAN BAP

*Induction of Somatic Embryogenesis Transgenic Disease-Free Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) SUT Event 02 by 2,4-D and BAP*

Laily Ilman Widuri<sup>1</sup>, Parawita Dewanti<sup>1,2\*</sup> dan Sigit Soeparjono<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember (UNEJ)

<sup>2</sup>Center for Development of Advanced Science and Technology (CDAST), Universitas Jember (UNEJ)

Jln. Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto, Jember 68121

\*E-mail : parawita@yahoo.com

### ABSTRACT

The aim of this study were to compare the effect of 2,4-D alone and the combination of 2,4-D and BAP on callus induction transgenic virus - free sugarcane SUT *Event 02* through somatic embryogenesis. This research was conducted at the CDAST Laboratory University of Jember, started from September 2014 - February 2015. Research using completely randomized design (CRD) single factor with five different formulation induction mediums and orthogonal contrast test on callus induction parameters. Sugarcane SUT *Event 02* callus was induced from first basal segment *in vitro* explants cultured on Murashige and Skoog medium supplemented with Vitamin Myo-inositol, Pyridoxin-HCl, Thiamin-HCl, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (3 and 4,5 mgL<sup>-1</sup>) Benzylaminopurine (BAP) (1,5mgL<sup>-1</sup>), casein hidrolisat 300 mgL<sup>-1</sup>, sucrose 30 gL<sup>-1</sup>, and phytagel 2,5 gL<sup>-1</sup>. The results showed that the best respond of SUT *Event 02* callus induction were obtained on medium containing 2,4-D alone at concentration 3 mgL<sup>-1</sup>.

**Key words :** Callus induction, SUT *Event 02*, 2,4-D,

### ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan pengaruh 2,4-D tunggal dan kombinasi 2,4-D dan BAP terhadap induksi kalus terbaik pada tebu transgenik SUT *Event 02* bebas virus melalui somatik embriogenesis. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium CDAST Universitas Jember mulai bulan September 2014 – Februari 2015. Penelitian menggunakan Rancangan Acak lengkap (RAL) faktor tunggal dengan lima macam konsentrasi media induksi yang berbeda dan uji kontras ortogonal pada parameter induksi kalus. Kalus tebu SUT *Event 02* diinduksi dari bagian basal pertama eksplan *in vitro* yang dikulturkan pada media Murashige and Skoog yang ditambahkan Vitamin Myo-inositol, Pyridoxin-HCl, Thiamin-HCl, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (3 dan 4,5 mgL<sup>-1</sup>) Benzylaminopurine (BAP) (1,5mgL<sup>-1</sup>), casein hidrolisat 300 mgL<sup>-1</sup>, sukrosa 30 gL<sup>-1</sup>, dan phytagel 2,5 gL<sup>-1</sup>. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan paling baik terhadap respon induksi kalus tebu SUT *Event 02* didapatkan dari media induksi yang mengandung 2,4-D tunggal pada konsentrasi 3 mgL<sup>-1</sup>.

**Kata kunci :** Induksi kalus, SUT *Event 02*, 2,4-D

**How to cite :** Widuri LI, P Dewanti, S Soeparjono. 2015. Induksi somatik embriogenesis tanaman tebu transgenik SUT *event 02* menggunakan 2,4-D dan BAP. *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(1): xx-xx

### PENDAHULUAN

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman penghasil gula yang utama sehingga perlu ditingkatkan kualitas dan kuantitasnya. Tanaman tebu memiliki prospek yang cerah untuk dikembangkan karena tanaman ini tidak hanya diolah untuk menghasilkan gula, tapi juga dimanfaatkan sebagai bahan baku berbagai industri baik kimia, farmasi, pupuk, dan lain – lain. Namun, pesatnya perkembangan tanaman tersebut masih belum diimbangi dengan peningkatan produksi tebu (Departemen Perindustrian, 2009).

Upaya peningkatan kualitas dan kuantitas tebu diantaranya dengan memperbanyak bibit berkualitas yang sehat dalam skala besar yakni melalui kultur jaringan. Kultur jaringan tanaman menjadi metode alternatif yang banyak digunakan karena efisiensi waktu, tenaga, dan hasil yang didapatkan dibandingkan metode konvensional. Metode kultur *in vitro* ini juga banyak dikembangkan untuk produksi bibit tebu dalam kuantitas yang besar dan kualitas yang tinggi.

Salah satu genotipe tebu yang sangat berpotensi dikembangkan untuk memperbanyak bibit tebu sehat diantaranya tebu SUT *Event 02*. Tebu SUT *Event 02* merupakan tebu rekayasa

genetika dari varietas Bulu Lawang yang telah dioverekspresi gen *SoSUT1* (Sugiharto and Safitri, 2011).

Hasil studi sebelumnya telah dilakukan penelitian mengenai eliminasi virus SCMV secara *in vitro* pada tebu SUT *Event 02*. Eliminasi virus dilakukan pada planlet dari hasil propagasi tunas lateral tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1 Event 02* yang diinkubasi pada media antiviral ribavirin kemudian diuji dengan menggunakan DAS ELISA dan menghasilkan 100 % planlet bebas virus SCMV (Ramadhan, 2014). Planlet tebu yang telah positif bebas virus dapat dijadikan bibit unggul yang berkualitas sehingga perlu diperbanyak dalam skala besar secara kultur jaringan melalui somatik embriogenesis.

Teknik memperbanyak secara kultur jaringan yakni melalui somatik embriogenesis memiliki potensi untuk dikembangkan karena menurut Purnamaningsih (2002) hasil memperbanyak melalui somatik embriogenesis dinilai menguntungkan. Teknik ini dapat menghasilkan jumlah propagula yang tidak terbatas dalam waktu yang singkat. Teknik ini juga mulai banyak dieksplorasi untuk produksi benih sintetik (*artificial seeds*) yang memiliki prospek cerah untuk pengembangan upaya peningkatan produksi tebu.

Somatik embriogenesis memiliki beberapa tahapan spesifik dimulai dari pembentukan massa pro embrionik (*pro embryonic masses*) diikuti pembentukan somatik embrio, pendewasaan, dan regenerasi (Hussein *et al.*, 2006; Purnamaningsih, 2011). Pembentukan embrio dari sel somatik dapat terjadi melalui dua jalur, yakni secara langsung dan secara tidak langsung. Embriogenesis secara langsung (*direct somatic embryogenesis*) terbentuk dari sel epidermis eksplan tanpa fase pengkalusan. Sedangkan somatik embriogenesis tidak langsung (*indirect somatic embryogenesis*) terbentuk dari proses pengkalusan terlebih dahulu kemudian diikuti perkembangan embrioid dari bagian dekat permukaan atau dalam kalus.

Somatik embriogenesis langsung (*direct somatic embryogenesis*) pada tanaman padi diproduksi dari induksi somatik embrio langsung dari sel pro-embriogenik dari daun, batang, mikrospora, protoplast tanpa proliferasi kalus sedangkan somatik embriogenesis tidak langsung (*indirect somatic embryogenesis*) diproduksi dari friabel kalus embriogenik (Islam *et al.*, 2013).

Induksi kalus tanaman tebu bebas virus secara *in vitro* melalui teknik somatik embriogenesis (SE) sangat dipengaruhi dengan penambahan zat pengatur tumbuh. Pemberian jenis zat pengatur tumbuh dapat mengoptimalkan hasil pembentukan somatik embrio apabila diberikan dengan konsentrasi yang tepat. Menurut penelitian Naz *et al.* (2008) pemberian kombinasi ZPT auksin dan sitokinin yakni auksin sintetik 2,4-D dan sitokinin sintetik BAP dapat mempengaruhi proses pembentukan embrio somatik langsung paling baik.

Kombinasi auksin dan sitokinin juga dilaporkan paling efektif untuk menginduksi somatik embrio (Jahangir and Nasir, 2010). Penelitian induksi somatik embriogenesis pada tebu SUT *Event 02* dengan pemberian beberapa kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP ini diharapkan dapat menjadi metode alternatif perbanyakan bibit tebu bebas virus yang efektif guna mendukung upaya peningkatan kuantitas dan kualitas produksi tanaman tebu.

## BAHAN DAN METODE

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

Pelaksanaan percobaan dilakukan dengan beberapa tahap meliputi :

**Pembuatan media induksi kalus.** Media dasar untuk induksi kalus adalah media Murashige and Skoog yang ditambahkan Vitamin Myo-inositol, Pyridoxin-HCl, Thiamin-HCl. Stok media dan ZPT 2,4-D dan BAP diambil selanjutnya dilarutkan dengan aquadest ke dalam beaker glass. Setelah itu larutan diukur derajat keasamannya dengan menggunakan pH meter. Larutan media tersebut kemudian ditambahkan phytigel sebanyak 2,5 gL<sup>-1</sup>. Selanjutnya media dipanaskan dalam microwave selama ± 3 menit lalu dimasukkan ke dalam botol dan ditutup. Media disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 120°C dan tekanan 17,5 psi selama 20 menit.

**Persiapan eksplan.** Planlet tebu SUT *Event 02* didapatkan di Laboratorium CDAST dari hasil penelitian sebelumnya, yakni eliminasi virus SCMV pada tebu PRG SUT *Event 02* asal varietas Bulu Lawang (BL) dengan antiviral ribavirin dan telah dikonfirmasi bebas virus dengan menggunakan analisis DAS ELISA. Planlet tebu SUT *Event 02* disubkultur dan diperbanyak dalam media MS untuk mendapatkan tunas baru hingga mencapai ± 100 planlet. Tunas baru yang sudah berkembang menjadi

planlet dengan umur ± 1 bulan, kemudian diseleksi sesuai dengan kriteria yakni sehat, segar, tinggi ± 1-3 cm. Tanaman yang memenuhi kriteria diambil dari botol kultur kemudian dibersihkan dari sisa media di dalam LAF. Setelah itu planlet tebu *in vitro* dipotong bagian basalnya dengan ukuran ± 0,5 cm dari atas pangkal. Bagian potongan yang digunakan sebagai eksplan adalah potongan segmen pertama pangkal planlet.

**Induksi kalus.** Eksplan yang sudah diambil bagian basalnya ditanam pada botol yang berisi media induksi dengan perlakuan kontrol yakni MS (A), ZPT 2,4-D tunggal 3 mgL<sup>-1</sup> (B), 2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> (C), 2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup>, 2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup> (D) dan 2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup> (E). Kultur diletakkan di kondisi gelap untuk menginduksi kalus pada suhu 23° - 25°C selama 5 minggu. Kegiatan subkultur dilakukan dalam rentang waktu 3 minggu sekali.

**Parameter pengamatan.** Variabel pengamatan yang digunakan dalam percobaan ini terdiri dari 3 parameter yakni waktu induksi kalus, persentase induksi kalus, dan morfologi kalus. Parameter persentase induksi kalus dan morfologi kalus diamati pada eksplan berumur 3 MST. Perkembangan kalus diamati secara makroskopik dan morfologi kalus diamati secara mikroskopik menggunakan mikroskop stereo.

## HASIL

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pengaruh media menunjukkan nilai yang berbeda sangat nyata terhadap parameter waktu induksi kalus dan persentase induksi kalus tebu PRG SUT *Event 02* (Tabel 1).

**Tabel 1.** Hasil analisis ragam pada parameter waktu induksi kalus dan persentase induksi kalus.

Parameter	Nilai F- Hitung
Waktu induksi kalus	64,37 **
Persentase induksi kalus	30,95 **

Keterangan : \*\*: berbeda sangat nyata, \*: berbeda nyata, ns: berbeda tidak nyata

Hasil analisis ragam dari parameter yang berbeda sangat nyata selanjutnya diuji lanjut dengan uji kontras orthogonal (1DB). Hasil uji kontras ortogonal yang disajikan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa media perlakuan A (kontrol) berbeda sangat nyata terhadap media perlakuan B,C,D, dan E (perlakuan penambahan ZPT) pada parameter waktu induksi kalus dan persentase induksi kalus.

**Tabel 2.** Hasil analisis kontras orthogonal pada parameter waktu induksi kalus dan persentase induksi kalus.

Kontras	Parameter Pengamatan	
	Waktu induksi kalus	Persentase induksi kalus
A >> B,C,D,E	126,23 **	5,00 *
BC >> DE	109,58 **	0,03 ns
B >> C	1,33 ns	0,03 ns
D >> E	2,19 ns	0,55 ns

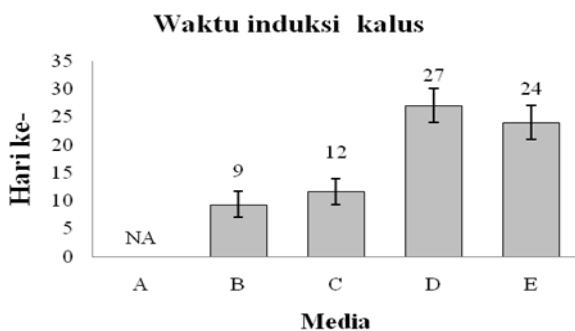
Keterangan : \*\*: berbeda sangat nyata, \*: berbeda nyata, ns: berbeda tidak nyata

Hasil analisis kontras ortogonal (Tabel 2) menunjukkan bahwa pemberian zat pengatur tumbuh menunjukkan nilai yang berbeda sangat nyata terhadap parameter waktu induksi kalus dan berbeda nyata terhadap parameter persentase induksi kalus. Eksplan yang ditumbuhkan pada media induksi dengan penambahan zat pengatur tumbuh menunjukkan adanya respon

pembengkakan (*swelling*). Pemberian zat pengatur tumbuh terbukti memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap waktu induksi kalus. Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan pada media kultur menjadi faktor utama yang dapat mengkoordinasi pembelahan sel dan morfogenesis eksplan (Figuroa *et al.*, 2006) serta menentukan keberhasilan proses diferensiasi sel dan jaringan tanaman yang dikulturkan (Sukamadjaja dan Mulyana, 2011).

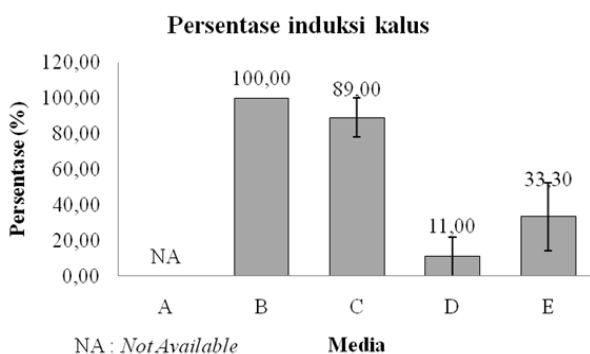
Syarat lain yang penting diperhatikan selain media dan komposisi zat pengatur tumbuh adalah jenis eksplan. Eksplan yang telah banyak dimanfaatkan pada penelitian sebelumnya adalah bagian *spindle leaf* (Ho and Vasil, 1983; Tiel *et al.*, 2006; Mayang dkk, 2011; Anjum *et al.*, 2012). Roy *et al.* (2011) menggunakan gulungan daun tebu yang masih muda sebagai eksplan untuk produksi kalus dan induksi somatik embriogenesis.

Eksplan yang digunakan pada penelitian ini menggunakan tanaman tebu hasil kultur *in vitro* mulai bagian dasar (basal) terutama segmen pertama (bagian basal) tebu *in vitro* yang mengandung banyak sel meristematik seperti yang dilaporkan Mustafa and Khan (2012).



**Gambar 1.** Waktu induksi kalus tebu *SUT Event 02* pada lima macam komposisi media yang berbeda.

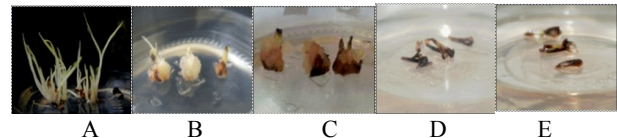
Perkembangan eksplan menjadi kalus diamati dengan menentukan cepat tidaknya waktu induksi kalus. Berdasarkan Gambar 1 menunjukkan bahwa perlakuan kontrol tidak menunjukkan terbentuknya kalus karena mengalami organogenesis sehingga data waktu induksi kalus tidak tersedia (*not available*). Waktu induksi kalus tercepat diperoleh dari perlakuan media induksi B dengan pemberian 2,4-D tunggal pada taraf 3 mgL<sup>-1</sup> disusul konsentrasi 4,5 mgL<sup>-1</sup>. Pemberian kelompok kombinasi 2,4-D dan BAP menunjukkan hasil induksi kalus lebih lama dibandingkan dengan pemberian 2,4-D tunggal.



**Gambar 2.** Persentase induksi kalus tebu *SUT Event 02* pada lima macam komposisi media yang berbeda.

Respon yang baik terhadap parameter persentase induksi kalus juga ditunjukkan dengan pemberian 2,4-D tunggal pada tebu *SUT Event 02*. Induksi kalus pada taraf 2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> dan 4,5 mgL<sup>-1</sup> merupakan rentang level yang optimum untuk menginduksi kalus tebu *SUT Event 02*. Namun nilai persentase induksi kalus pada kelompok perlakuan penambahan BAP yang dikombinasikan dengan dua level 2,4-D yang berbeda (Media D dan E) tidak menunjukkan hasil yang optimum dibandingkan dengan perlakuan 2,4-D tunggal.

Pengaruh macam media terhadap induksi kalus menunjukkan hasil pertumbuhan eksplan yang berbeda – beda pada tebu *SUT Event 02*.



**Gambar 3.** Induksi kalus tebu *SUT Event 02* pada 5 macam media yang berbeda pada 3 MST.

Hasil pertumbuhan eksplan basal tebu *in vitro* media kontrol MS (Gambar 3A) pada tebu *SUT Event 02* tidak mengalami tahapan pembentukan kalus dan mengalami organogenesis. Organogenesis secara langsung yang ditandai dengan tumbuhnya tunas dari eksplan karena adanya pembentukan pusat aktivitas meristematik (meristemoid) yang mengarah pada pembentukan organ sedangkan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP merangsang pertumbuhan kalus yang berbeda – beda karakteristiknya.

Eksplan tebu *SUT Event 02* yang ditumbuhkan pada media induksi B dengan pemberian 2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> (Gambar 3B) selama 3 MST kalus yang terbentuk muncul dari bagian basal eksplan yang banyak mengandung sel – sel meristematik pada sekitar daerah yang dilukai pada saat penanaman demikian juga pada eksplan dalam media induksi C dengan pemberian 2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup> (Gambar 3C). Hal yang berbeda ditunjukkan pada eksplan yang ditumbuhkan pada media induksi D dan E dengan kombinasi 2,4-D dan BAP (Gambar 3D dan 3E) dimana eksplan tidak menunjukkan pertumbuhan kalus yang optimal karena bagian eksplan basal *in vitro* mengalami pencoklatan (*browning*).

Pemberian 2,4-D tunggal pada tebu *SUT Event 02* pada penelitian ini menunjukkan hasil terbaik dalam menginduksi kalus dibandingkan dengan kombinasi 2,4-D dan BAP yang tidak menghasilkan kalus pada tahap induksi seperti yang dilaporkan Anjum *et al.* (2012). Penambahan auksin 2,4-D saja memiliki potensi lebih untuk proses inisiasi kalus tebu (Ali and Iqbal, 2010). Pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D dengan konsentrasi yang tinggi (3-4 mgL<sup>-1</sup>) dapat menghasilkan induksi kalus tebu yang paling baik jika dibandingkan dengan pemberian 2,4-D pada konsentrasi yang lebih rendah (1-1,5 mgL<sup>-1</sup>) (Ali *et al.*, 2010).

Morfologi kalus yang didapatkan pada tahap induksi diamati ciri – ciri embriogenik atau tidaknya secara mikroskopik menggunakan mikroskop stereo. Kalus embriogenik merupakan memiliki tipe kalus yang dapat memproduksi somatik embrio setelah diberi perlakuan pada kondisi kultur (Hussein *et al.*, 2006). Kalus embriogenik memiliki ciri berwarna putih kekuningan, berstruktur remah dan kering sedangkan kalus non embriogenik berstruktur kompak, basah, dan berwarna bening kecoklatan.

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopik dapat diamati bahwa morfologi kalus hasil induksi ada yang memiliki karakteristik embriogenik dan non embriogenik (Gambar 4). Keberadaan kalus non embriogenik (Gambar 4A) dan kalus embriogenik (Gambar 4B) yang ditumbuhkan pada media induksi

yang sama dapat berkaitan dengan faktor internal dan faktor karakteristik dari masing – masing jaringan (Figuroa *et al.* 2006). Kalus yang non embriogenik tersebut dipisahkan dengan bagian yang embriogenik kemudian disubkultur untuk mengoptimalkan perkembangan sel – sel embriogenik.



**Gambar 4.** Morfologi kalus tebu non embriogenik (A) Kalus tebu embriogenik (B)

Bagian kalus yang *glossy*, remah, dan kering yang terdapat pada media induksi B dan C menunjukkan ciri – ciri kalus embriogenik sedangkan kalus tidak transparan dan kompak serta berwarna putih susu atau cenderung kecoklatan hingga beberapa bagian berwarna coklat kehitaman seperti yang disebutkan menunjukkan ciri – ciri kalus non embriogenik. Kalus dengan ciri – ciri embriogenik yang kompeten selanjutnya akan membentuk unit yang menyerupai embrio (embryooid) yang memiliki dua calon meristem (bipolar) yang kemudian akan melewati tahap pendewasaan dan perkecambahannya setelah disubkultur pada media proliferasi.

#### KESIMPULAN

Pemberian 2,4-D tunggal dengan konsentrasi 3 mgL<sup>-1</sup> dan 4,5 mgL<sup>-1</sup> memberikan respon induksi kalus paling baik pada tebu SUT *Event* 02 dibandingkan dengan pemberian kombinasi 2,4-D dan BAP. Kalus yang dihasilkan dari pemberian konsentrasi 3 mgL<sup>-1</sup> dan 4,5 mgL<sup>-1</sup> menunjukkan ciri – ciri embriogenik yang selanjutnya berkembang membentuk tahapan – tahapan somatik embriogenesis.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ali SJ, Iqbal and MS Khan. 2010. Genotype independent *in vitro* regeneration system in elite varieties of sugarcane. *Pakistan Journal of Botany* 42(6):3783-3790.
- Ali S and J Iqbal. 2010. Facile regeneration through adventive / somatic embryogenesis from *in vitro* cultured immature leaf segments of elite varieties of sugarcane ( *Saccharum officinarum* L.). *Biologia (Pakistan)* 56(1&2):55-62.
- Anjum N, S Ijaz, IA Rana, TM Khan, IA Khan, MN Khan, G Mustafa, FA Joiya and A Iqbal. 2012. Establishment of an *in vitro* regeneration system as a milestone for genetic transformation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) against *Ustiligo scitaminea*. *Bioscience Methods* 3(2):7-20.
- Departemen Perindustrian. 2009. *Roadmap Industri Gula*. Direktorat Jendral Industri Agro dan Kimia.
- Figuroa FRQ, RR Herera, RMG Avalos, VML Vargas. 2006. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue and Organ Cultivation* 86:285-301.
- Hussein S, R Ibrahim, ALP Kiong. 2006. Somatic embryogenesis: an alternative method for *in vitro* micropopagation. *Iranian Journal of Biotechnology* 4(3):156-161.
- Ho WJ and IK Vasil. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) the morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 118:169-180.
- Islam M, ME Haque, SM Alam, MA Islam, M Khalekuzzaman and B Sikdar. 2013. Morphological and histological observation of embryogenic calli derived from immature embryo of BRR1 Dhan28 (*Oryza sativa* L.) variety. *Plant Biology* 3(5):21-27.
- Jahangir GZ and IA Nasir. 2010. Various hormonal supplementations active sugarcane regeneration *in-vitro*. *Journal of Agriculture Science* 2(4):231-237.
- Mayang RB, D Hapsoro dan Yusnita. 2011. Regenerasi *in vitro* tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.): Induksi dan proliferasi kalus, serta induksi tunas. *Jurnal Agrotropika* (16)2:52-56.
- Mustafa G and MS Khan. 2012. Reproducible *in vitro* regeneration system for purifying sugarcane clones. *African Journal of Biotechnology* 11(42):9961-9969.
- Naz S, A Ali and A Siddique. 2008. Somatic embryogenesis and planlet formation in different varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) HSF-243 and HSF-245. *Sarhad Journal of Agriculture* 24(4):593-598.
- Purnamaningsih R. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Agriobio* 5(2):51-58.
- Ramadhan, F. 2014. Eliminasi virus SCMV ( *Sugarcane Mozaik Virus*) dengan kemoterapi ribavirin pada beberapa *event* tebu PRG. Skripsi. Jurusan Budidaya Pertanian. Universitas Jember.
- Roy M, M Hossain, A Biswas, MK Biswas, and R Islam. 2011. Plant regeneration through somatic embryogenesis from leaf sheath derived callus sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) var ISD-16. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 21(2):143-149.
- Sugiarto B and H Safitri. 2011. A comparison studi for *Agrobacterium* - mediated transformation method in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Jurnal Ilmu Dasar* 12(2):140-141.
- Sukmadjaja D dan Mulyana. 2011. Regenerasi dan pertumbuhan beberapa varietas tebu (*Saccharum officinarum* L.) secara *in vitro*. *AgroBiogen* 7(2):106-118.
- Tiel K, GA Enriquez, AD Fuentes, A Ferreira, Y Coll and M Pujol. 2006. Development of a system for rapid plant regeneration from *in vitro* sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue. *Biotechnologia Aplicada* 23(1):22-24.

