



**INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK MENGGUNAKAN  
2,4- *DICHLOROPHENOXYACETIC ACID* DAN KINETIN  
PADA EKSPAN GULUNGAN DAUN MUDA  
TANAMAN TEBU VAR. NXI 1-3**

**SKRIPSI**

Oleh

**Wardatus Sholeha  
NIM 101810401032**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK MENGGUNAKAN  
2,4- *DICHLOROPHENOXYACETIC ACID* DAN KINETIN  
PADA EKSPAN GULUNGAN DAUN MUDA  
TANAMAN TEBU VAR. NXI 1-3**

**SKRIPSI**

Oleh

**Wardatus Sholeha  
NIM 101810401032**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK MENGGUNAKAN  
2,4- *DICHLOROPHENOXYACETIC ACID* DAN KINETIN  
PADA EKSPLAN GULUNGAN DAUN MUDA  
TANAMAN TEBU VAR. NXI 1-3**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Wardatus Sholeha  
NIM 101810401032**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

**PERSEMBAHAN**

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah, saya persembahkan skripsi ini kepada:

1. Ibunda Sri Wahyuni dan Ayahanda Gimun Daryatno, saya ucapkan terimakasih yang tak terhingga atas kasih sayang, pengorbanan, nasehat dan do'a yang selalu mengalir;
2. Guru, ustadz dan kyai yang telah mendidik dan memberikan ilmunya, terimakasih atas ilmu yang telah diberikan;
3. Achmad Shodaryl Akrit, Mohammad Iqbalussofi dan Raihan Anugrah atas semangat yang telah diberikan sampai saat ini;
4. Almater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTTO**

“... Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan”

(Al-Mujaadalah: 11)\*)

“Sesungguhnya bersama kesulitan pasti ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai dari suatu urusan, tetaplah bekerja keras untuk urusan yang lain”

(Asy-Syahr: 6-7)\*)

---

\*): Departemen Agama Republik Indonesia. 2010. *Al Quran dan Terjemahan*. Bandung: Penerbit Hilal.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Wardatus Sholeha

NIM : 101810401032

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Induksi Embriogenesis Somatik Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid dan Kinetin Pada Eksplan Gulungan Daun Muda Tanaman Tebu Varietas NXI 1-3**” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh BOPTN 2014 atas nama Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya 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 mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Maret 2015

Yang menyatakan

Wardatus Sholeha

NIM 101810401032

**SKRIPSI**

**INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK MENGGUNAKAN  
2,4- *DICHLOROPHENOXYACETIC ACID* DAN KINETIN  
PADA EKSPLAN GULUNGAN DAUN MUDA  
TANAMAN TEBU VAR. NXI 1-3**

Oleh

**Wardatus Sholeha**

**NIM 101810401032**

**Pembimbing**

**Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc**

**Dosen Pembimbing Anggota : Dra. Dwi Setyati, M.Si**

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Induksi Embriogenesis Somatik Menggunakan 2,4-*Dichlorophenoxyacetic Acid* dan Kinetin Pada Eksplan Gulungan Daun Muda Tanaman Tebu Varietas NXI 1-3” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Jember pada :

Hari, tanggal :

Tempat : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji:

Ketua (DPU),

Sekretaris (DPA)

Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc  
NIP 195510221982121001

Dra. Dwi Setyati, M.Si  
NIP 196404171991032001

Anggota

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, M.Si  
NIP 197509132000032001

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes  
NIP 196008161989021001

Mengesahkan  
Dekan FMIPA

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph.D  
NIP 196101081986021001



## RINGKASAN

**Induksi Embriogenesis Somatik Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid dan Kinetin Pada Eksplan Gulungan Daun Muda Tanaman Tebu Varietas NXI 1-3; Wardatus Sholeha; 101810401032; 2015; 32 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.**

Embriogenesis somatik adalah perbanyakan tanaman yang berasal dari sel haploid atau diploid untuk membentuk tanaman baru tanpa melalui peleburan sel gamet. Pada saat ini embriogenesis somatik banyak mendapatkan perhatian karena jumlah propagulan yang dihasilkan lebih banyak dan diperoleh dalam waktu singkat. Keberhasilan embriogenesis somatik dibutuhkan komposisi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang sesuai. ZPT merupakan senyawa organik yang berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Jenis ZPT yang banyak digunakan untuk perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik adalah dari golongan auksin dan sitokinin. ZPT 2,4-D merupakan salah satu golongan auksin sintetik dan kinetin adalah golongan sitokinin sintetik.

Tanaman hasil embriogenesis somatik memiliki tingkat regenerasi sangat tinggi sehingga dibutuhkan metode penyimpanan benih sintetik. Penyimpanan benih sintetik sangat diperlukan agar benih mampu bertahan dalam jangka waktu cukup lama tanpa merusak viabilitas benih. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang efektif untuk perbanyakan tanaman tebu var. NXI 1-3 melalui embriogenesis somatik serta pembuatan benih sintetik dengan menggunakan pelapisan Na-alginat.

Induksi kalus embriogenik dilakukan dengan menanam eksplan gulungan daun muda (*leaf roll*) tanaman tebu var. NXI 1-3 pada media induksi yang mengandung konsentrasi 2,4-D yang berbeda yaitu 2 ppm, 3 ppm dan 4 ppm serta diinkubasi pada kondisi gelap selama 6 minggu. Pertumbuhan eksplan membentuk kalus embriogenik dari media induksi terbaik kemudian ditumbuhkan pada media proliferasi. Pada media proliferasi digunakan dua formulasi media dengan konsentrasi

2,4-D yang lebih rendah yaitu 1 ppm dan 2 ppm serta diinkubasi pada kondisi gelap selama 6 minggu. Pertumbuhan kalus embriogenik dari media proliferasi terbaik selanjutnya dipindahkan dan ditumbuhkan pada media regenerasi yang mengandung kinetin 0,5 ppm. Kalus embriogenik yang telah membentuk fase koleoptil digunakan untuk pembuatan benih sintetik (enkapsulasi). Pembuatan benih sintetik tanaman tebu var. NXI 1-3 menggunakan 3 % Na-alginat dan 100 mM CaCl<sub>2</sub>.

Hasil induksi kalus embriogenik menunjukkan konsentrasi 2,4-D 4 ppm lebih efektif untuk menginduksi kalus embriogenik dibandingkan konsentrasi 2 ppm dan 3 ppm yang ditunjukkan dengan tingginya persentase eksplan membentuk kalus embriogenik yaitu 40%. Hal tersebut disebabkan 2,4-D mampu meningkatkan hormon ABA yang merupakan prekursor protein LEA (*Leaf Embryogenesis Abundant*) yang bertanggung jawab terhadap perkembangan embriogenesis somatik. Hasil proliferasi kalus embriogenik menunjukkan konsentrasi paling efektif adalah 2,4-D 2 ppm ditandai dengan terbentuknya fase skutelar lebih cepat yaitu pada umur 3 minggu sedangkan pada konsentrasi 2,4-D 1 ppm masih berada pada fase globular. Tahapan selanjutnya adalah regenerasi embrio somatik pada media mengandung kinetin. Penggunaan 0,5 ppm kinetin bertujuan untuk meningkatkan pembelahan sel melalui mitosis. Peningkatan pembelahan ditandai dengan perubahan dari fase koleoptil sampai membentuk tanaman baru (*plantlet*). Pada umur 6 minggu jumlah *plantlet* yang terbentuk mencapai  $\pm 82$ .

Telah berhasil dilakukan enkapsulasi menggunakan eksplan embrio somatik fase koleoptil menggunakan 3% Na-alginat dan 100 mM CaCl<sub>2</sub>. Benih sintetik selanjutnya disimpan pada media semi solid.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala nikmat, rahmat, ridho, karunia dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Induksi Embriogenesis Somatik Menggunakan *2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid* dan Kinetin Pada Eksplan Gulungan Daun Muda Tanaman Tebu Varietas NXI 1-3”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan stasa satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc selaku dosen pembimbing utama dan Dra. Dwi Setyati, M.Si selaku dosen pembimbing anggota dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, saran, maupun bimbingan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini;
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini selaku dosen penguji I dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes selaku dosen penguji II yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan penelitian ini;
3. Eva Tyas Utami, S.Si, M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang selalu membimbing dan memberikan nasehat selama penulis menjadi mahasiswa;
4. seluruh keluarga besar yang telah memberikan motivasi dan dukungan kepada penulis;
5. keluarga besar Sugar Group Purnama Okviandari, SP, MP., Arsetyo Rahardhianto, S.Si, Fadrian Ramadhan, SP, Novita Berliana, S.Si, Wimbuh Tri Widodo, S.Si, Eni Kusrini, S.Si, Wulan, Rian, Retna, Iffah, Retno, dan Intan terimakasih atas bantuannya selama ini.

6. para sahabat Mbak Mita, Laily 'Loly', Firdha 'Aping', Narita, Ahmil, Qoyyim, Fragaria, Kunti, Derta, Halimah, Mufid 'Embun', Nana, Putri, Aal, serta Fahmi Abdul Halim terimakasih atas supportnya.
7. semua teman-teman BOLU (Biologi 2010) yang telah banyak memberikan motivasi dan warna hidup kepada penulis.
8. serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terimakasih atas semangat, dukungan dan doa kepada penulis.

Jember, Maret 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Batasan Masalah</b> .....	3
<b>1.4 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.5 Manfaat Penelitian</b> .....	3
<b>TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Tebu (<i>Saccharum officinarum</i> L.) Varietas NXI 1-3</b> .....	4
<b>2.2 Embriogenesis Somatik</b> .....	4
<b>2.3 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)</b> .....	8
<b>2.4 N<sup>6</sup>-furfurylaminopurine (kinetin)</b> .....	10
<b>2.5 Benih Sintetik (Enkapsulasi)</b> .....	11
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	13
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	13

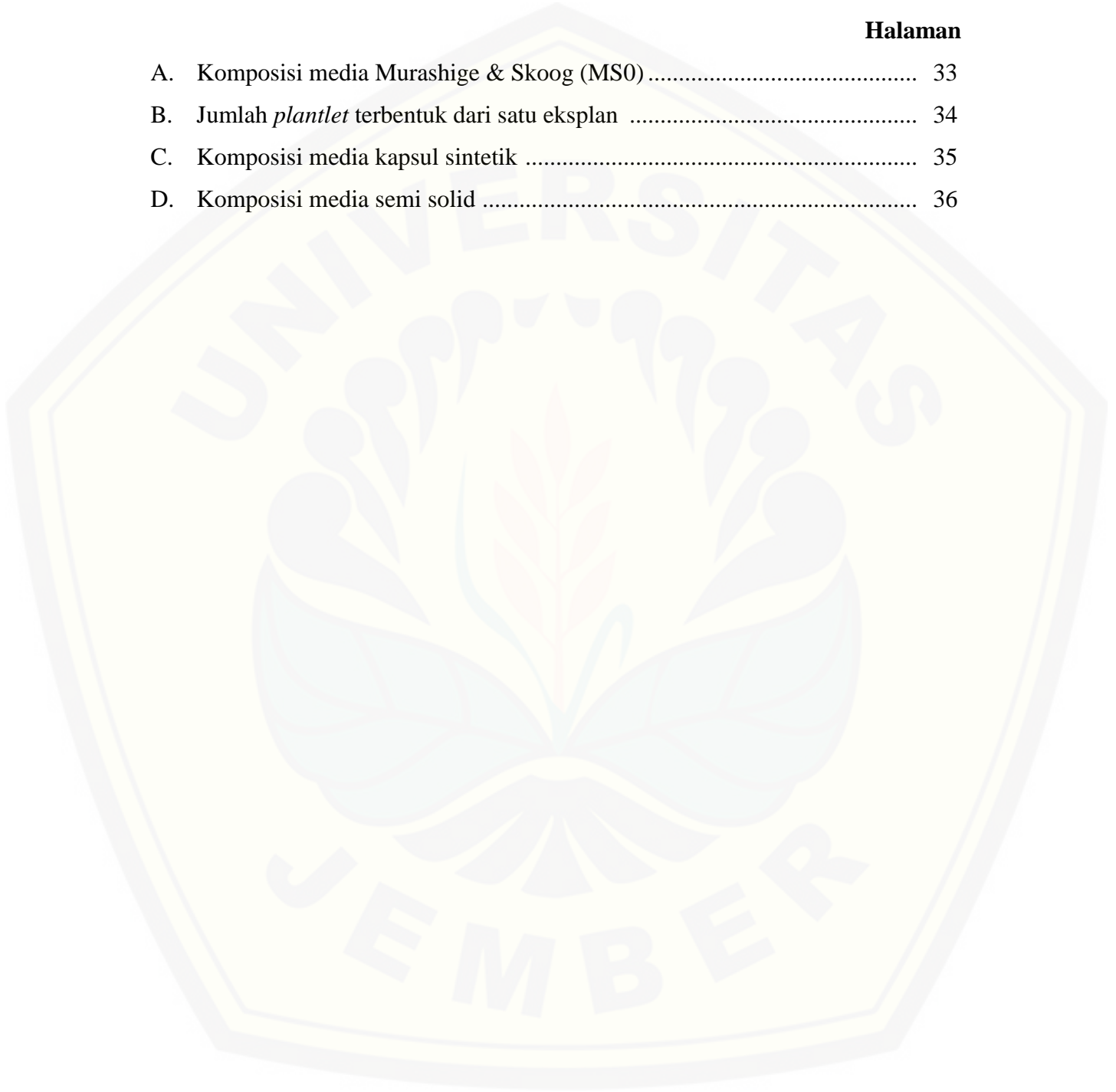
<b>3.2 Bahan dan Alat</b> .....	13
<b>3.3 Alur Penelitian</b> .....	14
<b>3.4 Metode Penelitian</b> .....	14
3.4.1 Pengambilan Eksplan .....	14
3.4.2 Penanaman Eksplan dan Induksi Kalus Embriogenik .....	15
3.4.3 Proliferasi Kalus Embriogenik .....	16
3.4.4 Regenerasi Embriogenesis Somatik .....	17
3.4.5 Teknik Pembuatan Benih Sintetik .....	17
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	18
<b>4.1 Induksi Kalus Embriogenik</b> .....	18
<b>4.2 Proliferasi Kalus Embriogenik</b> .....	20
<b>4.3 Regenerasi Embriogenesis Somatik</b> .....	21
<b>4.4 Benih Sintetik (Enkapsulasi) Tanaman Tebu</b>	
<b>Var. NXI 1-3 Hasil Embriogenesis Somatik</b> .....	22
<b>4.5 Pembahasan Umum</b> .....	24
<b>BAB 5. Penutup</b> .....	26
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	26
<b>5.2 Saran</b> .....	26
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	27
<b>LAMPIRAN</b> .....	33

**DAFTAR GAMBAR**

	<b>Halaman</b>
Gambar 2.1 Perkembangan embriogenesis somatik secara morfologi .....	5
Gambar 2.2 Histologi perkembangan embriogenesis somatik pada tanaman tebu.....	6
Gambar 2.3 Mekanisme pembesaran dan pemanjangan sel oleh auksin .....	9
Gambar 2.4 Struktur kimia 2,4-D .....	10
Gambar 2.5 Struktur kimia kinetin .....	11
Gambar 2.6 Struktur kimia natrium alginat .....	12
Gambar 4.1 Pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap persentase terbentuknya kalus .....	18
Gambar 4.2 Kalus embriogenik dan non-embriogenik pada tanaman tebu Var. NXI 1-3 secara mikroskopis .....	20
Gambar 4.3 Kalus embriogenik dan non-embriogenik pada tanaman tebu Var. NXI 1-3 secara makroskopis .....	20
Gambar 4.4 Kalus embriogenesis somatik pada umur 3 minggu pada konsentrasi 2,4-D yang berbeda .....	21
Gambar 4.5 Regenerasi tanaman tebu Var. NXI 1-3 .....	22
Gambar 4.6 Metode pembuatan benih sintetik .....	24
Gambar 4.7 Perkembangan embriogenesis somatik tanaman tebu varietas NXI 1-3 .....	25

**DAFTAR LAMPIRAN**

	<b>Halaman</b>
A. Komposisi media Murashige & Skoog (MSO) .....	33
B. Jumlah <i>plantlet</i> terbentuk dari satu eksplan .....	34
C. Komposisi media kapsul sintetik .....	35
D. Komposisi media semi solid .....	36





## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pada akhir-akhir ini perbanyakan tanaman secara *in vitro* dengan embriogenesis somatik banyak mendapatkan perhatian karena jumlah propagulan yang dihasilkan lebih banyak dan diperoleh dalam waktu singkat (Purnamaningsih, 2002). Embriogenesis somatik adalah perbanyakan tanaman yang berasal dari sel haploid atau diploid untuk membentuk tanaman baru tanpa melalui peleburan sel gamet (Dixon, 1985).

Eksplan yang digunakan untuk perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik adalah gulungan daun (*leaf roll*) muda tanaman tebu varietas NXI 1-3. Keunggulan tanaman tebu varietas NXI 1-3 antara lain memiliki produktivitas yang tinggi, mempunyai daya tahan keprasan, tahan terhadap hama penyakit tanaman dan mampu beradaptasi dengan mudah terhadap lingkungan (Rasullah *et al.*, 2013). Gulungan daun muda adalah jaringan yang bersifat meristematik yaitu jaringan yang aktif melakukan pembelahan, sehingga hal ini akan meningkatkan induksi embriogenesis somatik. Keberhasilan embriogenesis somatik juga ditentukan oleh beberapa faktor antara lain adalah Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) (Purnamaningsih, 2002).

ZPT merupakan senyawa organik yang berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Davies, 1995; Gaba, 2005). Perannya antara lain mengatur kecepatan pertumbuhan dari masing-masing jaringan guna membentuk tanaman baru. Jenis ZPT yang banyak digunakan pada perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik adalah dari golongan auksin dan sitokinin (Utami *et al.*, 2007). Hal ini telah dibuktikan dari beberapa penelitian sebelumnya diantaranya pada tahap induksi kalus embriogenik tanaman tebu (*Saccharum Officinarum* L.) *in vitro* mampu tumbuh optimal dalam media MS yang dilengkapi dengan 2,4-D (0.5-3,5

mg/l) + 1 mg/l kinetin (Ali & Iqbal, 2010); tahap proliferasi embriogenesis somatik dan regenerasi padi (*Oryza sativa*) *in vitro* mampu tumbuh optimal pada media MS + 2,4-D (0,4  $\mu$ M) + kinetin (2,0  $\mu$ M) (Verma *et al.*, 2011).

Jenis auksin sintetik yang digunakan dalam embriogenesis somatik adalah 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Menurut Roy *et al.* (2011) penggunaan 2,4-D lebih efektif untuk menginduksi kalus embriogenik jika dibandingkan dengan auksin sintetik lainnya.

Sitokinin adalah hormon tumbuhan yang merupakan turunan dari adenine. Sitokinin berfungsi untuk merangsang pembentukan tunas (morfogenesis), pembelahan sel (*sitokinesis*), serta berpengaruh terhadap metabolisme sel (Karim *et al.*, 2003). Sitokinin yang digunakan untuk embriogenesis somatik tebu adalah kinetin. Penambahan kinetin dalam media kultur jaringan mampu meningkatkan proliferasi kalus dan regenerasi (Wan & Liang, 1988), sehingga penggunaan 2,4-D dan kinetin dalam media kultur jaringan diduga mampu menginduksi embriogenesis somatik karena adanya pengaruh sinergisme dari zat pengatur tumbuh tersebut.

Tanaman hasil embriogenesis somatik memiliki tingkat regenerasi sangat tinggi sehingga dibutuhkan metode penyimpanan. Dewasa ini penyimpanan benih dengan metode penyimpanan benih sintetik (enkapsulasi) semakin berkembang. Penyimpanan tersebut sangat diperlukan agar benih mampu bertahan dalam jangka waktu cukup lama tanpa merusak viabilitasnya.

Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut penggunaan ZPT 2,4-D dan kinetin untuk perbanyakan tanaman tebu var. NXI 1-3 menggunakan eksplan gulungan daun muda melalui embriogenesis somatik serta metode pembuatan benih sintetik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik diperlukan medium kultur yang mengandung ZPT. Penggunaan ZPT berperan untuk mengatur kecepatan

pertumbuhan jaringan guna membentuk tanaman baru. Penambahan auksin (2,4-D) dan sitokinin (kinetin) pada konsentrasi tertentu dalam medium kultur dari beberapa penelitian sebelumnya mampu meningkatkan aktivitas embriogenesis somatik pada tanaman tebu dan padi secara *in vitro* serta regenerasi tanaman. Oleh karena itu pada konsentrasi berapakah 2,4-D dan kinetin mampu meningkatkan induksi embriogenesis somatik pada tanaman tebu varietas NXI 1-3 dengan eksplan gulungan daun muda? Hal ini akan dikaji pada penelitian ini.

### **1.3 Batasan Masalah**

Pada penelitian ini eksplan gulungan daun muda yang digunakan adalah pada bagian tengah daun yaitu 4 cm dari bagian pangkal daun muda.

### **1.4 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang efektif untuk perbanyak tanaman tebu var. NXI 1-3 melalui embriogenesis somatik.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang perbanyak tanaman melalui embriogenesis somatik menggunakan kombinasi ZPT 2,4-D dan kinetin pada eksplan gulungan daun muda tanaman tebu var. NXI 1-3.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Varietas NXI 1-3

Tanaman tebu merupakan tanaman semusim yang tumbuh pada iklim tropik dan subtropik. Tebu memiliki toleransi terhadap curah hujan 4,7 - 42,9 dm, temperatur 16,0 - 29,9 °C dan pada pH 4,3 - 8,4. Tanaman tebu termasuk tanaman yang memiliki batang keras (solid), tidak bercabang dengan tinggi tanaman 3-5 m serta berdiameter 2-3 cm (Duke, 1979). Tanaman tebu varietas NXI 1-3 merupakan tebu yang memiliki beberapa keunggulan antara lain memiliki produktivitas yang tinggi, tahan terhadap hama penyakit tanaman, memiliki daya tahan keprasan serta mampu beradaptasi baik dengan lingkungan (Rasullah *et al.*, 2013).

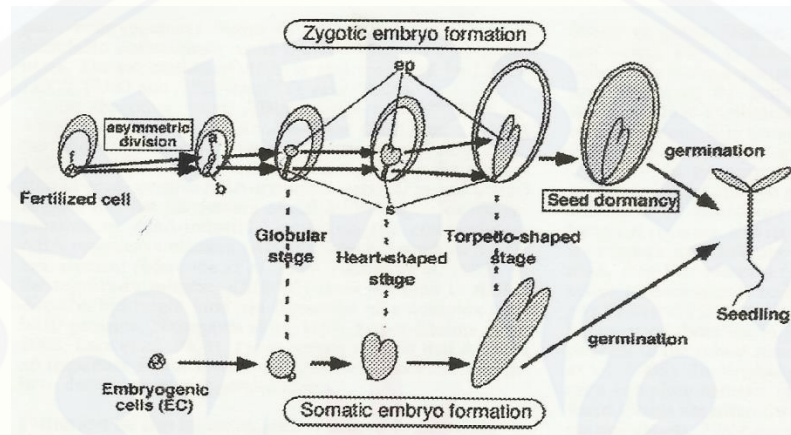
Pada saat ini tanaman tebu banyak dimanfaatkan di dalam industri baik pangan maupun non pangan. Pada industri pangan, tebu digunakan sebagai bahan dasar pembuatan gula tebu, sirup tebu, molase, pengawet dan rum. Pada industri non pangan ampas tebu atau bagase dimanfaatkan untuk pembuatan kertas, bahan dasar papan dan bahan bakar (Duke, 1983).

### 2.2 Embriogenesis Somatik

Embriogenesis somatik merupakan perbanyakan tanaman yang berasal dari sel haploid atau diploid yang berkembang membentuk tumbuhan baru melalui tahap perkembangan embrio tanpa peleburan sel gamet. Embriogenesis somatik dapat dilakukan dengan dua jalur, yaitu jalur langsung (*direct*) dan tidak langsung (*indirect*). Embriogenesis somatik secara langsung meliputi pembentukan embrio dari sel tunggal atau kelompok sel tanpa melalui pembentukan kalus, sedangkan embrio somatik yang terbentuk secara tidak langsung merupakan pembentukan embrio melalui kalus (Dixon, 1985).

Ciri khusus dari embrio somatik adalah memiliki struktur bipolar yaitu mampu membentuk dua calon meristem yaitu meristem akar dan meristem tunas.

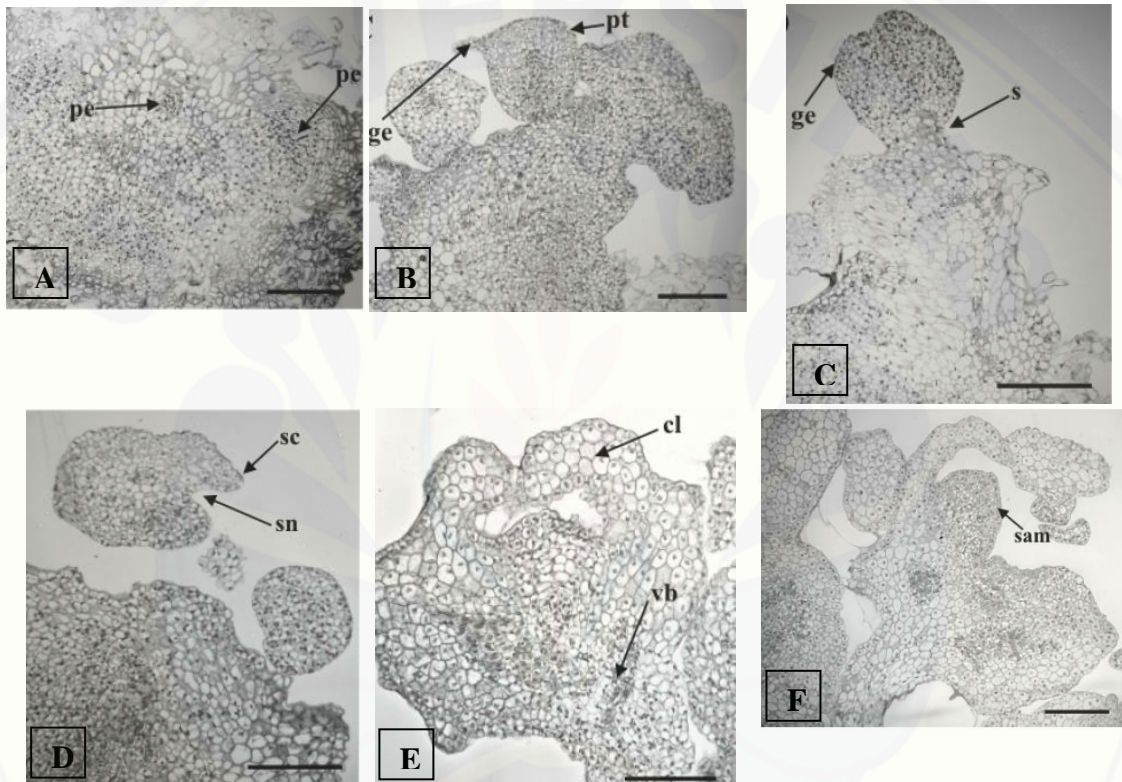
Disamping itu, perkembangan embrio somatik mirip dengan perkembangan embrio zigotik, sehingga dengan struktur tersebut akan lebih menguntungkan (Gambar 2.1). Tanaman baru yang terbentuk membutuhkan waktu relatif pendek jika dibandingkan dengan perbanyakan tunas adventif yang unipolar (Lestari, 2011).



Gambar 2.1 Perkembangan embriogenesis somatik secara morfologi (Murthy *et al.*, 2010).

Tahapan embriogenesis somatik meliputi beberapa fase, diantaranya: fase globular, fase skutelar, dan koleoptilar. Fase globular terbentuk setelah sel mengalami pembelahan dan protoderm sudah tampak jelas (Gambar 2.2 A-B). Pada beberapa tanaman embrio globular melekat pada permukaan kalus melalui suspensor namun pada umumnya suspensor tidak dapat dibedakan secara jelas atau tidak dapat diamati pada struktur multiseluler (Gambar 2.2 C). Perkembangan selanjutnya dari embrio globular dapat dikarakterisasi dengan pembentukan nodus daun atau nodus skutelar yang mengindikasikan terbentuknya fase skutelar (Gambar 2.2 D). Skutelum merupakan sel yang kompak, banyak mengandung sitoplasma, memiliki bentuk yang tidak teratur, memiliki trakeid pada prokambium yang membatasi sel epitel (Guideroni & Demarly, 1988). Pada tahap selanjutnya jumlah lapisan sel pada skutelum semakin bertambah dan akan muncul koleoptil. Pada tahap munculnya koleoptil merupakan fase koleoptilar (Gambar 2.2 E). Peningkatan jumlah lapisan sel

pada skutelum dan koleoptil disertai dengan terbentuknya meristem apikal yang tampak jelas pada nodus skutelar. Setelah tahap perkembangan embriogenesis somatik seperti pembentukan meristem apikal daun, primordia daun dan perkembangan koleoptil dan skutelar maka dilanjutkan dengan pembentukan meristem akar (Gambar 2.2 F) (Bomfim *et al.*, 2014).



Gambar 2.2 Histologi perkembangan embriogenesis somatik pada tanaman tebu. **A)** pe = proembrio. **B)** pt = protoderm, ge = embrio globular. **C)** ge = embrio globular, s = suspensor. **D)** sc = skutelum, sn = nodus skutelar. **E)** cl = koleoptil, vb = sarung pembuluh angkut. **F)** sam = meristem apikal (Bomfim *et al.*, 2014).

Menurut Purnamaningsih (2002), embriogenesis somatik memiliki beberapa tahapan spesifik, yaitu induksi kalus embriogenik, pendewasaan dan perkecambahan.

a. Induksi Kalus Embriogenik

Tahap induksi kalus embriogenik dilakukan dengan mengisolasi eksplan dan penanaman pada media tumbuh. Embriogenesis somatik pada umumnya ditumbuhkan didalam media yang memiliki kandungan auksin dalam konsentrasi tinggi (Purnamaningsih, 2002), Keberhasilan induksi dan perkembangan somatik embriogenesis ditentukan oleh beberapa faktor, diantaranya: jenis eksplan, sumber nitrogen, sumber karbon dan jenis ZPT yang digunakan. Pada tahap induksi kalus embriogenik, kultur ditumbuhkan dalam media yang mengandung auksin dan sitokinin dengan konsentrasi berbeda (Gill *et al.*, 2004).

Jenis eksplan yang digunakan harus bersifat embriogenik atau meristematik. Eksplan meristematik ditandai dengan ukuran sel yang kecil, sitoplasma padat, inti sel kecil, vakuola kecil dan memiliki butir pati. Penggunaan eksplan meristematik pada umumnya dapat meningkatkan pembentukan embrio somatik yang lebih tinggi. Pada umumnya eksplan yang digunakan dapat berupa gulungan daun muda, hipokotil, epikotil, akar, embrio zigotik muda dan embrio zigotik dewasa (Purnamaningsih, 2002).

Embriogenesis somatik mengalami proses perkembangan morfologi yang terjadi pada embrio zigotik, sehingga pada saat induksi membutuhkan komposisi nutrisi yang optimal di dalam media. Nitrogen merupakan salah satu faktor untuk memacu morfogenesis secara *in vitro*. Bentuk nitrogen tereduksi dan asam amino seperti casein hidrolisat dan prolin sangat penting untuk inisiasi dan perkembangan embrio somatik karena dapat merangsang terjadinya interaksi antara sel dan jaringan pada organ multiseluler (Ammirato, 1983).

Nutrisi yang dibutuhkan untuk menginduksi embriogenesis somatik selain nitrogen adalah gula. Gula merupakan sumber nutrisi dan sumber karbon yang dibutuhkan makhluk hidup. Penambahan gula dalam media juga berfungsi untuk mempertahankan tekanan osmotik media. (Purnamaningsih, 2002).

Konsentrasi zat pengatur tumbuh pada media inisiasi menentukan persentase eksplan menghasilkan embrio dan jumlah embrio per eksplan yang dihasilkan (Winarsih *et al.*, 2003). Pada media induksi zat pengatur tumbuh auksin dibutuhkan dalam konsentrasi yang lebih tinggi dan sitokinin dalam konsentrasi rendah. Berdasarkan hasil penelitian Gill *et al.* (2004) menunjukkan penggunaan konsentrasi 3-4 mg/l 2,4-D mampu menginduksi dan meningkatkan pembentukan kalus embrionik dan regenerasi pada tanaman tebu. Menurut Tiel *et al.* (2005) konsentrasi auksin yang tinggi juga akan meningkatkan massa atau berat kalus.

b. Pendewasaan dan Perkecambahan

Pada tahap pendewasaan atau proliferasi kalus embriogenik zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah auksin sintetik. Konsentrasi 2,4-D yang digunakan di dalam media pendewasaan adalah setengah dari konsentrasi pada media induksi yaitu antara 1-2 mg/l (Kaur & Gosal, 2009). Hal ini bertujuan agar tanaman mampu mengorganisir pertumbuhan sel-sel dari tanaman itu sendiri.

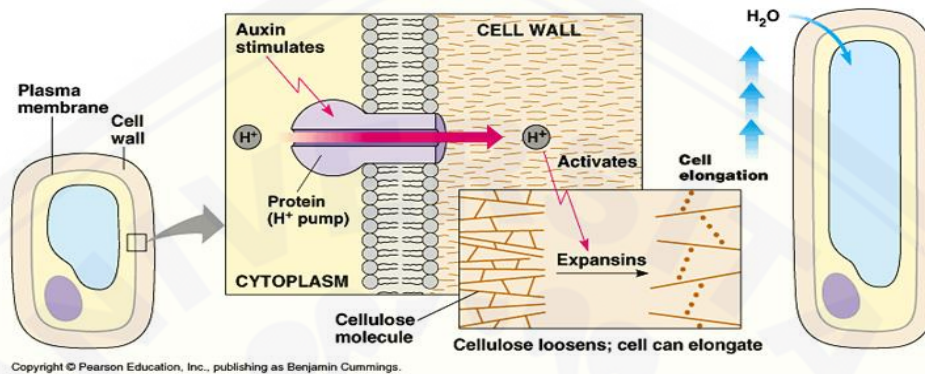
Kalus yang telah membentuk fase skutelar dipindahkan pada media regenerasi atau perkecambahan. Pada tahap perkecambahan atau regenerasi zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah sitokinin (Gill *et al.*, 2004). Sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang banyak terlibat dalam proses fisiologi dan perkembangan tumbuhan, seperti penundaan senescens pada daun (Gan & Amasino, 1996), pengaktifan meristem tunas lateral (Synkova *et al.*, 1997), menstimulasi perkecambahan (Pospilova *et al.*, 2000) menstimulasi pembentukan kalus dan regenerasi kalus (Wan & Liang, 1988). Penambahan ABA pada tahap perkecambahan juga diperlukan untuk pematangan embrio (Sinha, 1996). Waktu yang dibutuhkan untuk pematangan embrio dari fase skutelar hingga terbentuk plantlet adalah 6 minggu (Haq & Memon, 2012).

### 2.3 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

Auksin merupakan salah satu zat pengatur tumbuh yang berperan dalam proses perkembangan tumbuhan, antara lain untuk pemanjangan sel (Utami *et al.*, 2007); proliferasi kalus (Huan *et al.*, 2004); induksi embrio somatik (Shinoyama *et*



*al.*, 2004). Jenis auksin sintetik yang digunakan pada penelitian kali ini adalah 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

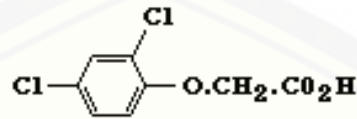


Gambar 2.3 Mekanisme pembesaran dan pemanjangan sel oleh auksin (Reece *et al.*, 2011).

Proses pemanjangan sel oleh auksin dimulai dari masuknya auksin ke dalam sitoplasma sehingga akan mempengaruhi protein dalam membran dan menyebabkan terpompanya ion H<sup>+</sup> dari sitoplasma menuju dinding sel. Masuknya ion H<sup>+</sup> ke dalam dinding sel akan meningkatkan pH dinding sel menjadi asam sehingga mampu mengaktifkan enzim-enzim yang bergantung pada pH, seperti enzim selulase dan β-1,3 glucanase. Teraktivasinya enzim-enzim tersebut akan memutuskan ikatan silang hidrogen rantai molekul selulosa penyusun dinding sel. Akibatnya dinding sel menjadi lentur dan air di sekitar sel akan masuk ke dalam sel melalui osmosis menyebabkan sel bertambah panjang. Auksin selain menginduksi pemanjangan sel juga meningkatkan aktivitas enzim selulosa sintetase yang bertugas untuk mensintesis dinding sel baru (Woodwart & Bartel, 2005).

2,4-D merupakan auksin sintetis yang sering digunakan untuk menginduksi embrio somatik. Hal ini dapat diamati dari segi aktivitas 2,4-D lebih optimal jika dibandingkan dengan IAA (Wattimena *et al.*, 1992) yang disebabkan karena 2,4-D memiliki gugus karboksil yang dipisahkan oleh karbon dan oksigen sehingga akan memberikan aktivitas yang optimal (Gambar 2.4) (Abidin, 1985).

**2,4-D**  
**2,4-dichlorophenoxyacetic acid**

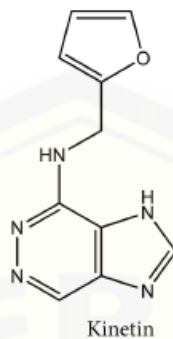


Gambar 2.4 Struktur kimia 2,4-D (Woodward & Bartel, 2005).

#### 2.4 N<sup>6</sup>-furfurylaminopurine (Kinetin)

Sitokinin adalah senyawa turunan adenine yang mampu mempengaruhi berbagai proses fisiologis di dalam tubuh tanaman. Sitokinin digunakan merangsang terbentuknya tunas, berpengaruh terhadap metabolisme sel, serta aktivitas utamanya adalah mendorong pembelahan sel jika dikombinasikan dengan auksin (Karjadi & Buchory, 2008). Sitokinin dikelompokkan menjadi dua jenis, yaitu sitokinin alami dan sitokinin sintetik. Sitokinin alami tersedia di dalam tubuh tanaman dalam bentuk zeatin ribotida dan zeatin ribosida sedangkan sitokinin sintetik seperti benzyl adenine (BA), 6-benzyl amino purin (BAP), dan kinetin. Sitokinin sintetik memiliki modifikasi adenine dan rantai samping yang berasal dari asam mevalonat (Wattimena *et al.*, 1992b). Jenis sitokinin yang digunakan pada penelitian kali ini kinetin (Gambar 2.6). Penambahan kinetin mampu meningkatkan proliferasi kalus dan regenerasi melalui mitosis sitokinesis, sintesis total protein, biosintesis lignin, diferensiasi pembuluh vaskuler, dan diferensiasi kloroplas dari protoplas (Wan & Liang, 1988).

D'Agostino & Kieber (1999) menambahkan mekanisme sitokinin dalam mengatur pembelahan sel yaitu dengan meningkatkan ekspresi D-type cyclin gene *CycD3* yaitu gen yang mengatur proses transisi G1 menuju fase M dalam siklus sel.

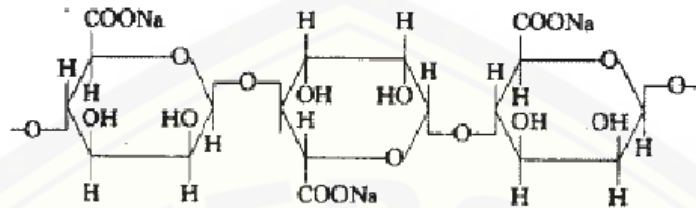


Gambar 2.5 Struktur kimia kinetin (Yardim & Senturk, 2010).

Campbell *et al.* (2003), menyatakan bahwa pada saat berasosiasi dengan auksin, sitokinin mampu menstimulasi pembentukan organ, memudahkan transport hara serta menghambat dominansi apikal. Hal tersebut didukung oleh Wattimena *et al.* (1992) bahwa sitokinin mampu menekan dominansi apikal, sehingga pada akhirnya akan menghasilkan jumlah tunas yang cukup banyak.

### 2.5 Benih Sintetik (Enkapsulasi)

Benih sintetik (enkapsulasi) merupakan teknik pembungkusan eksplan (embrio somatik, embrio zigotik, meristem, tunas pucuk atau planlet mikro) dengan suatu bahan pembungkus yang tidak merusak eksplan, dapat disimpan dalam jangka waktu cukup lama dan dapat dikecambahkan (Redenbaugh *et al.*, 1985). Pembungkusan embrio somatik dilakukan dengan menggunakan alginat. Alginat merupakan koloidal kitin yang diekstraksi dari ganggang laut *Macrocystis pyrifera* dan *Ascophyllum nodosum* yang bersifat biokompatibel dan biodegradable. Alginat yang tersedia secara komersial adalah dalam bentuk garam yaitu natrium alginat (Gambar 2.6) yang merupakan sejenis gel diperkaya bahan nutrisi, zat pengatur tumbuh, atau komponen lainnya yang mendukung proses perkecambahan. Keunikan alginat adalah memiliki kemampuan perubahan menjadi hidrogel dengan kandungan air didalamnya sebesar 95% yang merupakan syarat penting untuk menangkap senyawa (Wang & Perl, 2006).



Gambar 2.6 Struktur kimia natrium alginate (Rasyid, 2005)

Teknik enkapsulasi berpotensi dalam menjaga stabilitas benih selama proses penanganan, dapat menyimpan benih dalam jangka waktu lama tanpa kehilangan viabilitasnya, memudahkan dalam proses pengiriman, dapat ditanam secara langsung dari kondisi *in vitro* ke lapang dengan biaya produksi relatif lebih rendah (Marthur *et al.*, 1989). Menurut Bornman (1993), produksi benih sintetik bertanggung jawab secara luas untuk memproduksi benih pada beberapa tanaman komersial.

### **BAB 3. METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

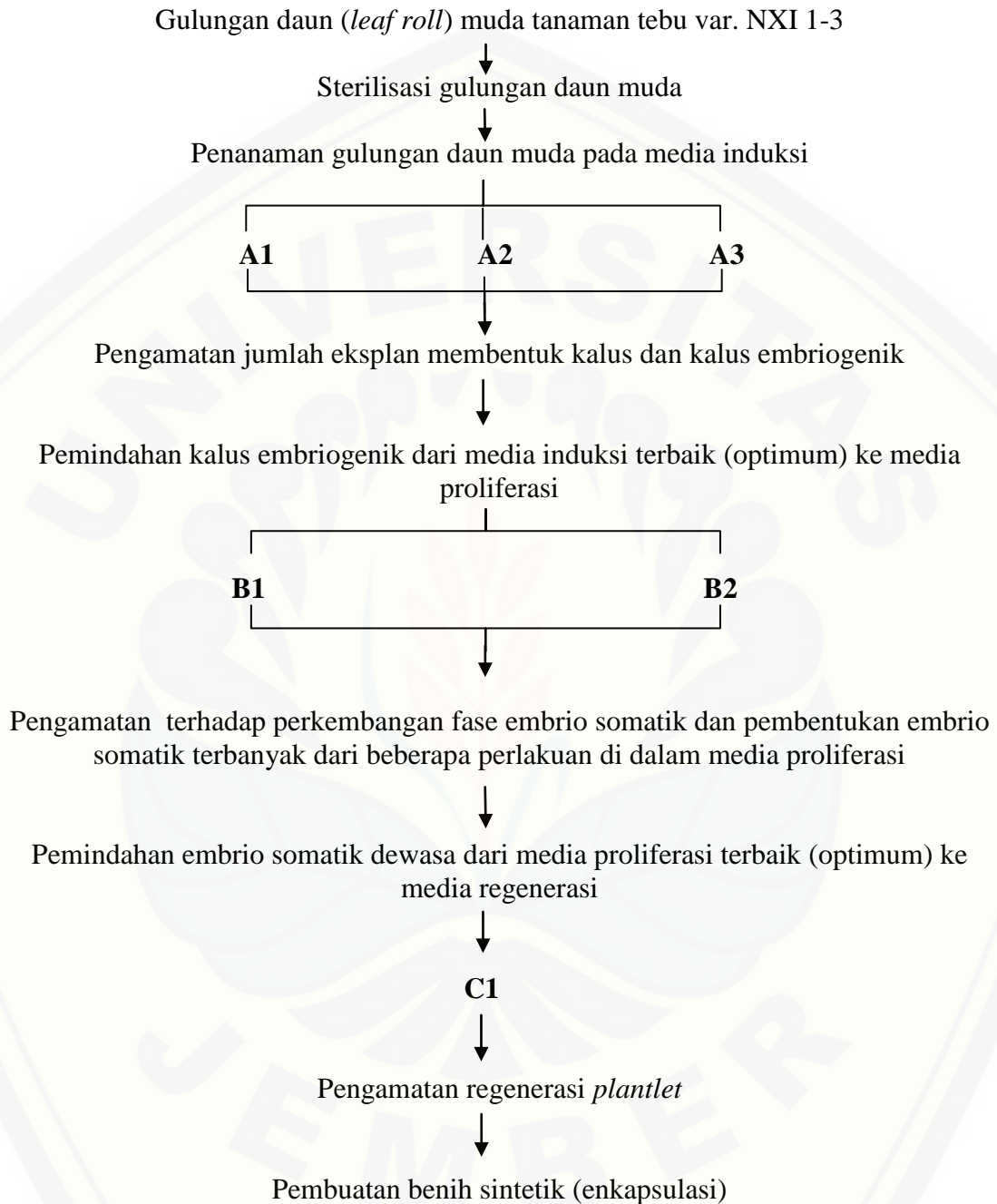
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST), Universitas Jember mulai bulan Januari hingga November 2014.

#### **3.2 Bahan dan Alat**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain gulungan daun (*leaf roll*) muda tanaman tebu varietas NXI 1-3, alkohol, kinetin, 2,4-*Dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D), media MS0, sukrosa 30 gr/l, mio-inositol 100 ml/l, pyridoxine 0,50 ml/l, thiamine 0,50 ml/l, casein hidrolisat 300 mg/l, polivinil pirolidon (PVP) 300 mg/l, prolin 560 mg/l, agar kuljar 11 gr/l, Na-alginat 3 gr/ 100 ml, dan CaCl<sub>2</sub> 100mM.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Laminar Air Flow* (LAF), pinset, gunting, cawan petri steril, pisau skalpel, botol kultur, gelas ukur, *beaker glass*, *microwave*, *autoclave*, pH meter, mikroskop stereo Leica EZ4 HD, pipet, neraca analitis, pengaduk magnetik, tisu, kertas saring, pipet Pasteur, *aluminium foil*, plastik *autoclavable*, dan kertas label.

### 3.3 Alur Penelitian



### 3.4 Metode Penelitian

#### 3.4.1 Pengambilan Eksplan

Eksplan yang digunakan berasal dari gulungan daun (*leaf roll*) muda tanaman tebu varietas NXI 1-3. Pengambilan gulungan daun muda diawali dengan membuang satu persatu daun pada bagian terluar dengan jarum atau pisau skalpel sehingga tersisa gulungan daun muda pada bagian terdalam. Gulungan daun muda kemudian disterilisasi dengan cara direndam dalam larutan alkohol 70% selama 5 menit lalu dibakar diatas api bunsen selanjutnya direndam dalam alkohol 96% selama 5 menit dan dibakar kembali diatas api bunsen. Gulungan daun muda yang telah steril dipindahkan ke cawan petri steril.

#### 3.4.2 Penanaman Eksplan dan Induksi Kalus Embriogenik

Gulungan daun diambil pada bagian tengah yaitu 4 cm dari bagian pangkal dan dipotong dengan ukuran  $\pm 4$  mm. Setiap bagian tengah gulungan daun dipotong sebanyak 14 eksplan. Eksplan tersebut kemudian ditanam dalam botol kultur yang telah berisi media dasar MS padat yang telah dimodifikasi dan masing-masing botol kultur ditanam 7 eksplan. Penanaman eksplan bertujuan untuk menginduksi pertumbuhan kalus. Pada media induksi menggunakan 2,4-D dengan konsentrasi berbeda yaitu A1, A2 dan A3 (Tabel 3.1).

Tabel 3.1 Formulasi media induksi kalus embriogenik

Media	Perlakuan
A1	MS + 2,4-D 2 mg/l + kasein hidrolisat 300 mg/l + PVP 300 mg/l + sukrosa 30 g/l + agar kuljar 11 g/l.
A2	MS + 2,4-D 3 mg/l + kasein hidrolisat 300 mg/l + PVP 300 mg/l + sukrosa 30 g/l + agar kuljar 11 g/l.
A3	MS + 2,4-D 4 mg/l + kasein hidrolisat 300 mg/l + PVP 300 mg/l + sukrosa 30 g/l + agar kuljar 11 g/l.

Kultur selanjutnya diinkubasi dalam ruang gelap pada suhu 22-24 °C selama 6 minggu. Setiap 3 minggu sekali kultur dipindah pada medium baru dengan komposisi

yang sama dan setiap 2 hari sekali dilakukan pengamatan terhadap jumlah eksplan yang berkalus. Data jumlah eksplan berkalus digunakan untuk menghitung persentase eksplan yang membentuk kalus dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase eksplan membentuk kalus} = \frac{\sum \text{eksplan membentuk kalus}}{\sum \text{seluruh eksplan}} \times 100$$

(Tahir *et al.*, 2011).

Pada saat akhir inkubasi dilakukan penghitungan persentase kalus embriogenik dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase kalus embriogenik} = \frac{\sum \text{kalus embriogenik}}{\sum \text{seluruh kalus}} \times 100$$

(Tahir *et al.*, 2011).

Pertumbuhan eksplan yang membentuk kalus embriogenik dengan persentase tertinggi dari media induksi terbaik (optimum) dipindahkan dan ditumbuhkan pada media proliferasi.

### 3.4.3 Proliferasi Kalus Embriogenik

Eksplan berkalus dari media induksi selanjutnya ditumbuhkan pada media proliferasi dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D lebih rendah (Tabel 3.2). Setiap media proliferasi berisi satu eksplan hal tersebut bertujuan untuk memudahkan pengamatan perkembangan fase embriogenesis somatik.

Tabel 3.2 Formulasi media proliferasi kalus embriogenik

Media	Perlakuan
B1	MS + 2,4-D 1 mg/l + kasein hidrolisat 300 mg/l + PVP 300 mg/l + sukrosa 30 g/l + prolin 560 mg/l + agar kuljar 11 g/l.
B2	MS + 2,4-D 2 mg/l + kasein hidrolisat 300 mg/l + PVP 300 mg/l + sukrosa 30 g/l + prolin 560 mg/l + agar kuljar 11 g/l.



Kultur selanjutnya diinkubasi dalam ruang gelap selama 6 minggu pada suhu 22-24 °C. Setiap 3 minggu sekali dilakukan pengamatan terhadap perkembangan fase embriogenik menggunakan mikroskop stereo dan jumlah embrio somatik pada setiap perlakuan. Setiap 3 minggu sekali dilakukan subkultur dengan cara eksplan berkalus dipindah ke medium yang sama. Pertumbuhan kalus embriogenesis somatik dari media proliferasi terbaik (optimum) selanjutnya dipindahkan dan ditumbuhkan pada media regenerasi.

#### 3.4.4 Regenerasi Embriogenesis Somatik

Embrio somatik selanjutnya diperbanyak dengan cara ditumbuhkan ke dalam media perbanyakan (regenerasi) dengan satu botol kultur berisi satu embrio somatik dewasa. Pada tahap ini digunakan formulasi media regenerasi dengan komposisi seperti yang tercantum dalam Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Formulasi media regenerasi kalus embriogenik

<b>Media</b>	<b>Perlakuan</b>
C1	MS + kinetin 0,5 mg/l + sukrosa 30 g/l + PVP 300 mg/l + agar kuljar 11 g/l.

Kultur diinkubasi selama 6 minggu dengan periode pencahayaan 16 jam terang dan 8 jam gelap (Haq & Memon, 2012). Pada minggu ke-3 dan ke-6 dilakukan pengamatan terhadap perkembangan embrio somatik membentuk plantlet.

#### 3.4.5 Pembuatan Benih Sintetik (Enkapsulasi)

Proses enkapsulasi diawali dengan mengisolasi embrio somatik yang telah memasuki fase koleoptil. Bagian koleoptil yang didapatkan ditaburkan pada permukaan Na-alginat 3% yang telah mengandung media tumbuh (MS0 + Sukrosa + kinetin) selanjutnya koleoptil diambil secara tunggal dengan menggunakan pipet Pasteur. Na-alginat yang telah mengandung koleoptil diteteskan di atas larutan CaCl<sub>2</sub>

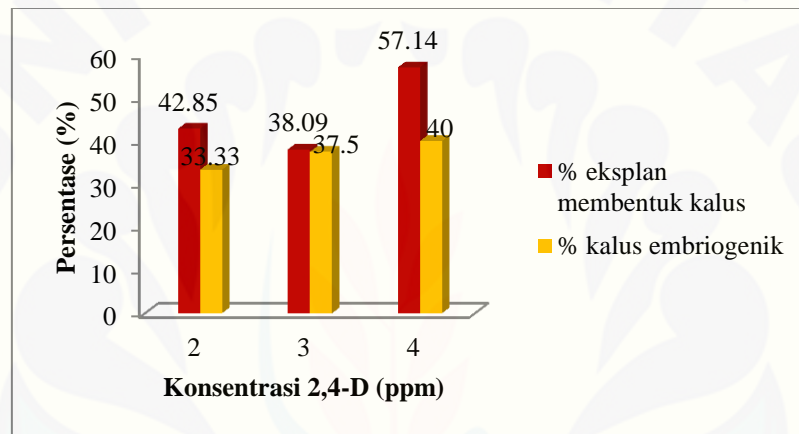
100 mM dan direndam selama 40 menit. Kapsul yang terbentuk dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali selanjutnya diletakkan di atas kertas saring untuk dikeringanginkan dan kapsul kemudian dimasukkan kedalam media semi solid. Kapsul selanjutnya diinkubasi pada intensitas cahaya 80-100 pada suhu 4°C.



## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Induksi Kalus Embriogenik

Pada induksi kalus embriogenik digunakan tiga macam konsentrasi 2,4-D yaitu 2 ppm, 3 ppm dan 4 ppm. Hasil penelitian menunjukkan 2,4-D pada konsentrasi 4 ppm lebih efektif untuk menginduksi kalus dan kalus embriogenik (Gambar 4.1).



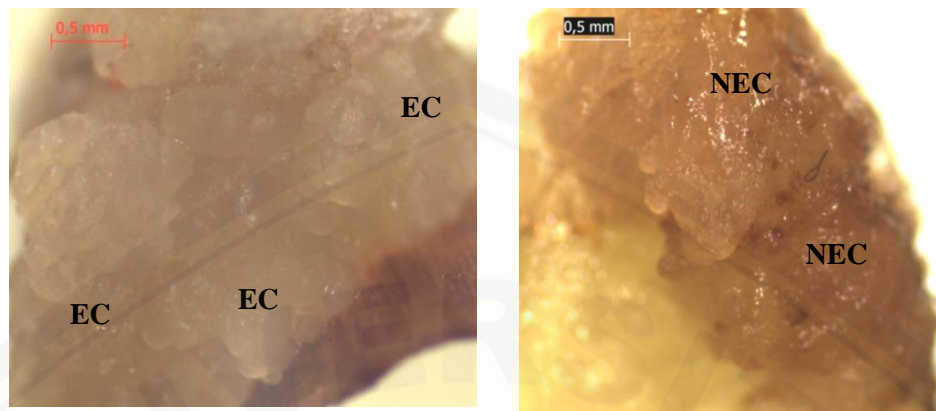
Gambar 4.1 Pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap persentase terbentuknya kalus.

Pada gambar 4.1 menunjukkan konsentrasi 4 ppm 2,4-D memiliki kemampuan tertinggi untuk menginduksi kalus dibandingkan dengan dua konsentrasi 2,4-D lainnya yaitu sebesar 57,14%. Peningkatan konsentrasi 2,4-D tersebut diharapkan mampu meningkatkan terbentuknya kalus embriogenik.

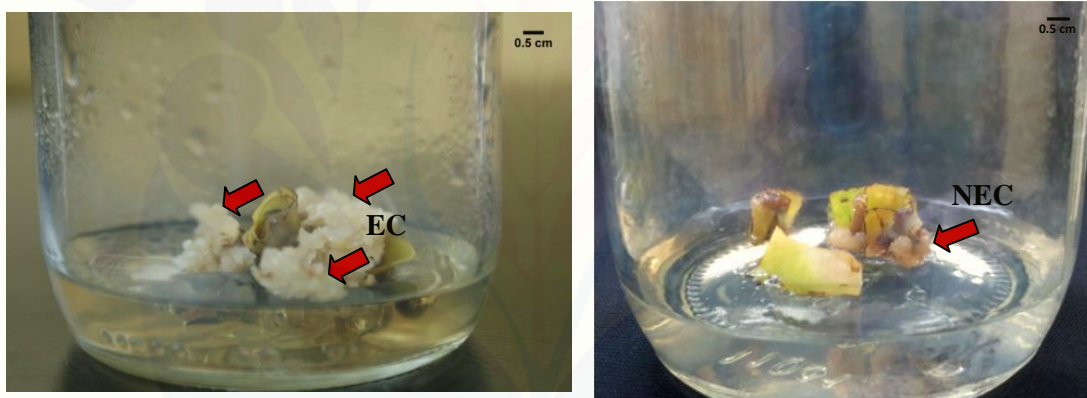
Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D maka persentase kalus embriogenik yang terbentuk akan semakin tinggi. Hal tersebut terbukti pada konsentrasi 4 ppm 2,4-D mampu meningkatkan pembentukan kalus embriogenik tertinggi yaitu sebesar 40%, sedangkan pada konsentrasi 3 ppm 2,4-D sebesar 37,5% dan konsentrasi 2 ppm 2,4-D sebesar 33%.

Peningkatan persentase kalus embriogenik disebabkan 2,4-D berperan dalam proses pemanjangan sel dan induksi embriogenesis somatik dengan cara meregulasi beberapa gen yang bertanggung jawab terhadap tahap perkembangan embriogenesis somatik (Lakshmanan *et al.*, 2006). Menurut Grossmann (2000), menyatakan bahwa penambahan 2,4-D merupakan faktor terpenting untuk induksi embriogenesis somatik hal ini disebabkan 2,4-D merupakan ZPT sekaligus herbisida yang mampu mengaktifkan hormon ABA dan etilen. Peningkatan hormon ABA mampu menginduksi ekspresi protein seperti LEA (*Leaf Embryogenesis Abundant*). LEA merupakan protein yang bertanggung jawab terhadap perkembangan embriogenesis somatik sehingga dapat diketahui bahwa 2,4-D merupakan faktor yang berpengaruh terhadap pembentukan embriogenesis somatik. Chithra *et al.*, (2005) menyatakan bahwa tinggi rendahnya persentase kalus embriogenik dipengaruhi oleh konsentrasi hormon auksin sintetik yang berfungsi untuk menginduksi kalus embriogenik. Kalus embriogenik merupakan kumpulan sel yang dicirikan dengan struktur bipolar yaitu mampu membentuk dua meristem sekaligus diantaranya meristem tunas dan meristem akar (Purnamaningsih, 2002).

Kalus embriogenik dapat dibedakan dengan kalus non-embriogenik. Berdasarkan hasil pengamatan kalus embriogenik dicirikan dengan struktur kalus kering, berwarna putih susu hingga bening, berstruktur remah serta mengalami proses perkembangan membentuk fase-fase embriogenesis somatik sedangkan kalus non-embriogenik memiliki struktur kalus lunak, berair, berwarna kecoklatan serta tidak mengalami proses perkembangan fase embriogenesis somatik (stagnan). Hal ini didukung oleh pendapat Gandanou *et al.*, (2005) yang menyatakan bahwa kalus embriogenik dicirikan dengan struktur kalus kering, berwarna putih hingga krem dan memiliki struktur remah sedangkan kalus non embriogenik dicirikan dengan struktur kalus kompak, basah, dan berwarna bening kecoklatan. Berikut perbedaan mikroskopis (Gambar 4.2) dan makroskopis (Gambar 4.3) antara kalus embriogenik dan non-embriogenik.



Gambar 4.2 Kalus embriogenik dan non-embriogenik pada tanaman tebu Var. NXI 1-3 secara mikroskopis (perbesaran 16X). EC = kalus embriogenik; NEC = kalus non-embriogenik.

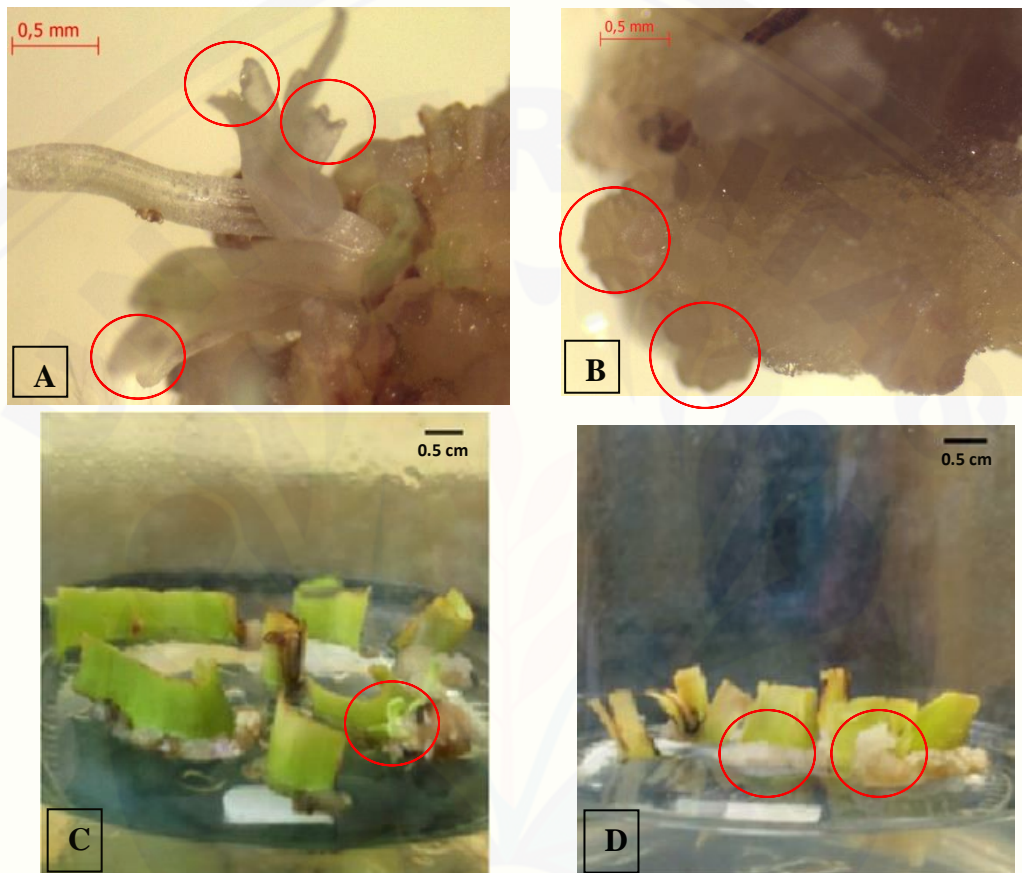


Gambar 4.3 Kalus embriogenik dan non-embriogenik pada tanaman tebu Var. NXI 1-3 secara makroskopis. EC = kalus embriogenik; NEC = kalus non-embriogenik.

#### 4.2 Proliferasi Kalus Embriogenik

Pada tahapan proliferasi kalus embriogenik, konsentrasi 2,4-D yang paling sesuai adalah 2 ppm. Pada umur 3 minggu konsentrasi 2,4-D 2 ppm mampu meningkatkan perkembangan kalus embriogenik dari fase globular membentuk fase skutelar (Gambar 4.4 A) sedangkan pada konsentrasi 2,4-D 1 ppm kondisi kalus masih berada pada fase globular (Gambar 4.4 B). Menurut George (1993),

embriogenesis somatik pada tanaman monokotil diawali dengan berkembangnya tahapan globular yang dilanjutkan dengan perkembangan membentuk fase skutelar, koleoptil sampai kotiledon.

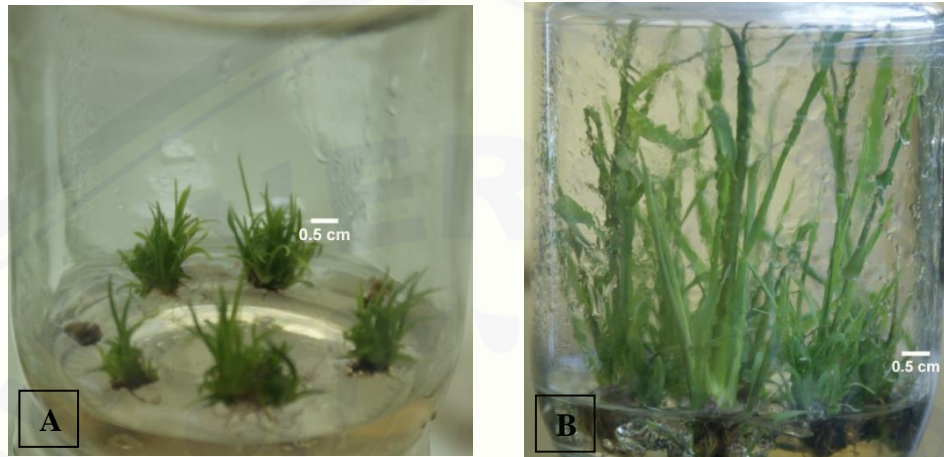


Gambar 4.4 Kalus embriogenesis somatik pada umur 3 minggu pada konsentrasi 2,4-D yang berbeda: **A)** Fase skutellar pada perbesaran mikroskop 16x, konsentrasi 2 ppm 2,4-D. **B)** Fase globular pada perbesaran mikroskop 16x, konsentrasi 1 ppm 2,4-D. **C)** Makroskopis kalus embriogenik pada media proliferasi 2 ppm 2,4-D. **D)** Makroskopis kalus embriogenik pada media proliferasi 1 ppm 2,4-D.

### 4.3 Regenerasi Embriogenesis Somatik

Regenerasi embrio somatik ditumbuhkan pada media regenerasi yang mengandung kinetin. Kinetin merupakan ZPT dari golongan sitokinin sintetik. Penambahan ZPT kinetin bertujuan untuk meningkatkan regenerasi melalui mitosis

(Wan & Liang, 1988). Pada media regenerasi embrio somatik ditumbuhkan selama 6 minggu.



Gambar 4.5 Regenerasi tanaman tebu Var. NXI 1-3. **A)** umur 3 minggu. **B)** umur 6 minggu pada media MS + 0,5 ppm kin + sukrosa 30 g/l + PVP 300 mg/l + agar kuljar 11 g/l.

Berdasarkan hasil pengamatan pada Gambar 4.5 A terlihat bahwa pada umur 3 minggu di dalam media regenerasi embrio somatik perkembangannya tidak seragam ada yang telah membentuk *plantlet* sedangkan yang lain masih berada pada fase skutelar dan koleoptil. Pada umur 3 minggu jumlah *plantlet* yang terbentuk dari satu eksplan rata-rata berjumlah  $\pm 35$  sedangkan pada umur 6 minggu rata-rata jumlah *plantlet* yang terbentuk mencapai  $\pm 82$  (Lampiran B). Perbedaan pembentukan fase yang tidak serempak dalam satu kalus menyebabkan jumlah *plantlet* yang ada di dalam media regenerasi berbeda.

#### **4.4 Benih Sintetik (Enkapsulasi) Tanaman Tebu Var. NXI 1-3 Hasil Embriogenesis Somatik**

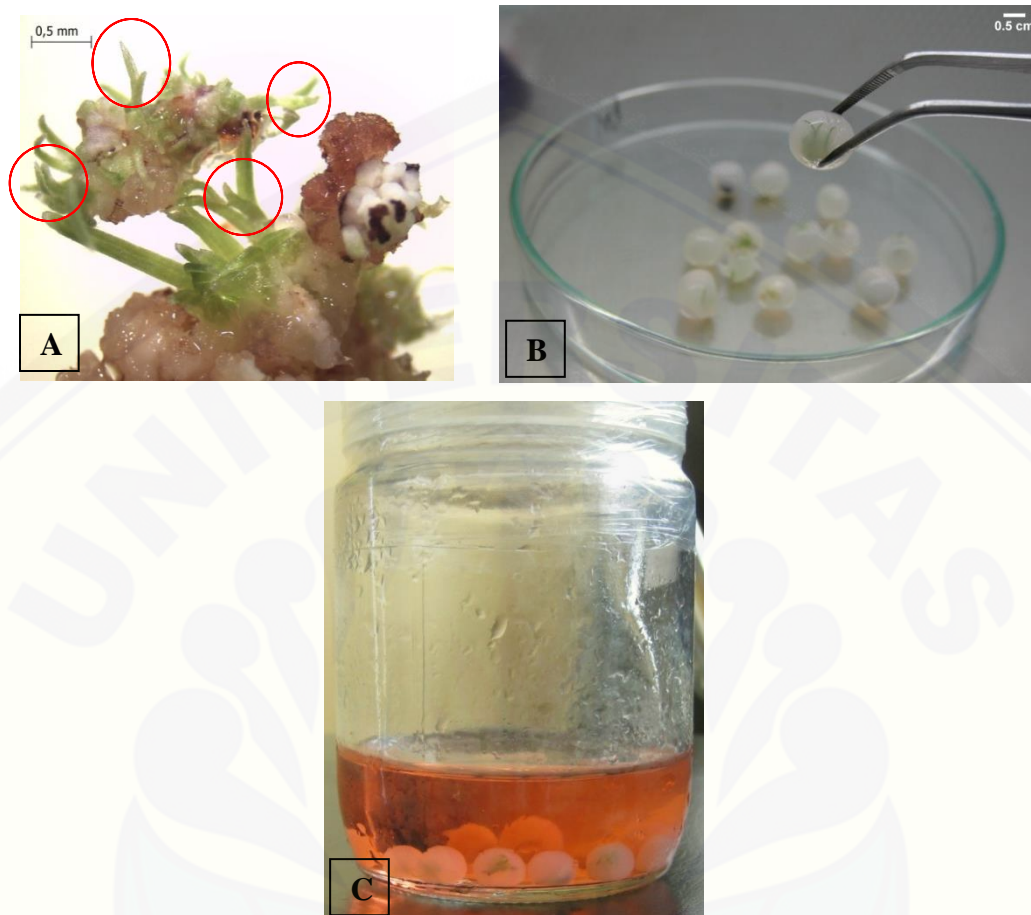
Embrio somatik tanaman tebu Var. NXI 1-3 yang didapat selanjutnya dikapsulkan untuk pembuatan benih sintetik (enkapsulasi). Tujuan enkapsulasi adalah agar eksplan mampu disimpan dalam jangka waktu lama (*medium term preservation*)

tanpa kehilangan viabilitasnya sehingga dapat digunakan sewaktu-waktu apabila dibutuhkan.

Enkapsulasi dilakukan dengan mengisolasi embrio somatik yang telah membentuk fase koleoptil (Gambar 4.6 A). Penggunaan bagian koleoptil sebagai bahan tanaman yang dikapsulkan disebabkan bagian tersebut bersifat meristematik. Menurut Yoshida *et al.* (1993) sel tanaman yang bersifat meristematik lebih toleran terhadap penyimpanan dibandingkan sel yang telah dewasa. Bagian koleoptil selanjutnya ditaburkan pada 3% Na-alginat yang telah mengandung media tumbuh (Lampiran C). Penggunaan 3% Na-alginat didukung dari hasil penelitian Daud *et al.* (2008) dan Geetha *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa pembuatan benih sintetik dengan 3% Na-alginat dalam 100 mM  $\text{CaCl}_2$  merupakan konsentrasi optimal di dalam pembuatan benih sintetik.

Proses selanjutnya adalah perendaman Na-alginat yang mengandung embrio somatik pada larutan 100 mM  $\text{CaCl}_2$ . Menurut Taha *et al.*, (2013) larutan  $\text{CaCl}_2$  berfungsi untuk memadatkan kapsul. Proses perendaman Na-alginat di dalam larutan  $\text{CaCl}_2$  dilakukan selama 40 menit. Hal tersebut berfungsi untuk menyempurnakan pembentukan kapsul (Ipekci & Gozukirmizi, 2003). Kapsul tersebut berfungsi sebagai endosperm sintetik atau cadangan makanan pada saat benih disimpan. Kapsul yang telah terbentuk kemudian diinkubasi didalam media semi solid (Lampiran D) pada intensitas cahaya  $\pm 88$  lux dengan suhu 4 °C. Inkubasi kapsul didalam media semi solid bertujuan agar kapsul tidak mudah rusak akibat proses osmosis sedangkan penyimpanan pada suhu rendah dapat mengurangi aktivitas enzim terutama enzim hidrolisis sehingga hal tersebut dapat mengurangi perombakan cadangan makanan (Syamsu *et al.*, 2003). Berikut tanaman tebu yang dikapsulkan dan hasil pembuatan benih sintetik.



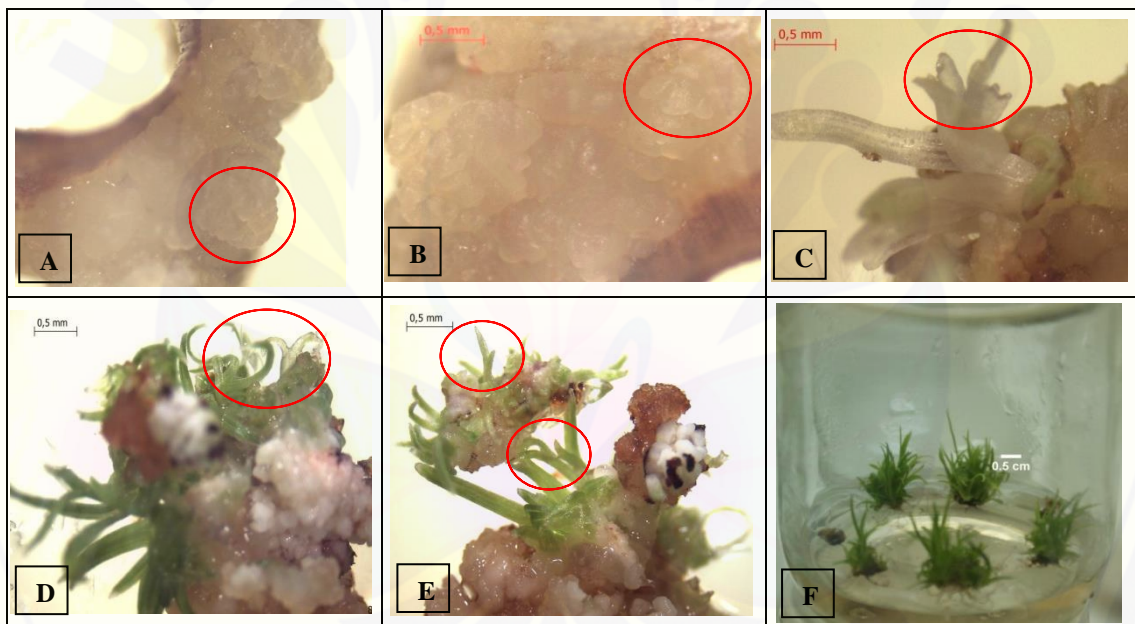


Gambar 4.6 Metode pembuatan benih sintetik. **A)** Bagian koleoptil yang dienkapsulasi (perbesaran 8X). **B)** Benih sintetik tanaman Tebu Var. NXI 1-3 yang dienkapsulasi menggunakan 3% Na-alginat dan 100 mM  $\text{CaCl}_2$ . **C)** Inkubasi kapsul pada media semi solid.

#### 4.5 Pembahasan Umum

Perkembangan kalus embriogenik tanaman tebu varietas NXI 1-3 terjadi selama  $\pm 4$  bulan terhitung dari awal penanaman eksplan pada media induksi sampai terbentuk *plantlet*. Perkembangan ini terbagi menjadi 5 fase, yaitu fase globular, skutelar, koleoptil, kotiledon hingga terbentuk *plantlet*. Perkembangan fase globular pada media induksi kalus embriogenik sampai dengan hari ke-28 yang kemudian dilanjutkan menuju fase skutelar. Perkembangan pada tahap skutelar terbagi dalam 2 fase yaitu *early scutellar* dan *late scutellar*. Tahap *early scutellar* ditandai dengan

pembelahan pada bagian ujung kalus membentuk seperti hati (hari ke-49) dan *late scutellar* ditandai dengan bertambah panjang bagian ujung yang terbelah membentuk seperti torpedo (hari ke-56). Dari fase *late scutellar* eksplan berkembang menjadi fase koleoptil (hari ke-70). Pada fase ini klorofil sudah mulai terbentuk. Pada saat koleoptil telah terbentuk, perkembangan dilanjutkan menuju fase kotiledon. Fase kotiledon adalah perkembangan embrio somatik yang telah mampu dibedakan antara bagian tunas dan akar (hari ke-91). Tahapan berikutnya setelah fase kotiledon adalah *plantlet*. Proses perkembangan kalus embriogenik menjadi *plantlet* terjadi pada hari ke-112 setelah tanam.



Gambar 4.7 Perkembangan embriogenesis somatik tanaman tebu varietas NXI 1-3. **A)** Fase globular (umur 28 hari). **B)** Fase *early scutellar* (umur 42 hari). **C)** Fase *late scutellar* (umur 56 hari). **D)** Fase koleoptil (umur 70 hari). **E)** Fase kotiledon (umur 98 hari). **F)** *Plantlet* (umur 112 hari).

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Konsentrasi 2,4-D 4 ppm lebih efektif untuk menginduksi kalus embriogenik yang ditunjukkan dengan tingginya persentase eksplan membentuk kalus embriogenik yaitu sebesar 40%. Konsentrasi 2,4-D 2 ppm adalah konsentrasi yang paling efektif untuk tahap proliferasi kalus embriogenik yang ditandai dengan terbentuknya fase skutelar pada umur 3 minggu. Penggunaan kinetin 0,5 mg/l mampu meningkatkan pertumbuhan embrio somatik dewasa (koleoptil) membentuk tanaman baru (*plantlet*). Benih sintetik telah berhasil dibuat dari embrio somatik fase koleoptil dengan menggunakan 3 % Na-alginat dan 100 mM CaCl<sub>2</sub>.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan prosedur pembuatan benih sintetik yang mampu menyimpan eksplan dalam jangka waktu yang lebih lama tanpa mengurangi viabilitas dari eksplan.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Abidin, Z. 1985. *Dasar-Dasar Pengetahuan tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung: Angkasa.
- Ali, S., & Iqbal, J. 2010. Facile Regeneration Through Adventive or Somatic Embryogenesis from *in vitro* Cultured Immature Leaf Segments of Elite Varieties of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Biologia* (Pakistan). Vol. 56: 55-62.
- Ammirato, P. V. 1983. *Embryogenesis*. New York: Mac-millan.
- Bomfim, G., Dibax, R., Augusto, R., Filho, J. C. B., and Daros, E. 2014. Plant Regeneration and Histological Study of The Somatic Embryogenesis of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) cultivars RB855156 and RB72454. *Acta Scientiarum. Agronomy*. Vol. 36: 63-72.
- Bornman, C. H. 1993. Maturation of Somatic Embryos. In: *Synseeds: Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement* (Ed. Redenbaugh K.). Boca Raton, Florida. CRC Press. 105–114.
- Chithra, M., Martin, K. P., Sunandakumari, C., and Madhusoodanan, P. V. 2005. Somatic Embryogenesis, Encapsulation, and Plant Regeneration of *Rotula aquatica*., A Rare Rhoephytic Woody Medical Plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. Vol. 41 : 28-31.
- Daud, N., Taha, R. M., and Hasbullah, N. A. 2008. Artificial Seed Production from Encapsulated Micro Shoots of *Saintpaulia ionantha* Wendl. (African violet). *J. Appl. Sci*. Vol. 8 (24): 4662-4667.
- Davies, P. J. 1995. *Plant Hormone: Physiology Biochemistry and Molecular Biology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Dixon, R. A. 1985. *Plant Cell Culture a Practical Approach*. Washington DC: Department of Biochemistry, Royal Holloway College. IRL Press Oxford.
- Duke, J.A. 1979. Ecosystematic Data on Economic Plants. *Quart. J. Crude Drug Res*. Vol. 17 (3–4): 91–110.

- Duke, J. A. 1983. Handbook of Energy Crops. Unpublished. Online ([http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Saccharum\\_officinarum.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Saccharum_officinarum.html)). [Diakses tanggal 30 Januari 2014].
- D'Agostino, I. B. & Kieber, J. J. 1999. Molecular Mechanisms of Cytokinin Action. *Curr Opin Plant Biol.* Vol. 2 (5): 359-364.
- Gaba, V. P. 2005. *Plant Growth Regulator*. In R.N. Trigiano and D.J. Gray (eds.) Plant Tissue Culture and Development. London: CRC Press (7-100).
- Gan, S. & Amasino, R.M. (1996). Cytokinins in Plant Senescence: From Spray and Pray to Clone and Play. *BioEssays*. Vol. 18: 557-565.
- Gandonou, C., Errabii, T., Abrinii, J., Idaomari M., Chibi F., and Senhaji N. S. 2005. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). *African J. Biotechnol.* 4 (11): 1250-1255.
- Geetha R., Gopal G.V., and Niranjan M.H. 2009. In vitro Response of Encapsulated Shoot Tips of *Spilanthes acmella*. *J. Basic Appl. Biol.* Vol. 3 (1&2): 82-86.
- George, E. F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture Part. 1*. Basingstoke: Exegetics.
- Gill, K. N., Gill, R., & Gosal, S. S. 2004. Factors Enhancing Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Indian Journal of Biotechnology*. Vol. 3. 119-123.
- Grossmann, K. 2000. Mode of Action of Auxin Herbicides: A New Ending to A long, Drown Out Story. *Trends Plant Sci.* Vol. 5: 506-508.
- Guiderdoni, E., & Demarly, Y. 1988. Histology of Somatic Embryogenesis in Cultured Leaf Segments og Sugarcane Plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol. 14: 71-88.
- Haq, I., & Memon, S. 2012. Efficient Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Indian Journal of Biotechnology*. Vol. 11 (15): 3704-3708.
- Huan, L.V.T., Takamura, T., and Tanaka, M. 2004. Callus Formation and Plant Regeneration from Callus Through Somatic Embryo Structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*. Vol. 166: 1443-1449.

- Ipekci, Z. & Gozukirmizi, N. 2003. Direct Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed Production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell*. Vol. 22: 16-23.
- Karjadi A. K. & Buchory, A. 2008. Pengaruh Auksin dan Sitokinin terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Jaringan Meristem Kentang Kultivar Granola. *J Hort*. Vol. 18 (4): 380-384.
- Karim, M.Z., Amin, M. N., Azad, M. A. K., Begum, F., Rahman, M. M., Islam, M. M., and Alan, R. 2003. Effects of Different Plant Growth Regulator on *in vitro* Shoot Multiplication of *Chrysanthemum morifolium*. *J. Biological Science*. Vol. 3 (6):553-560.
- Kaur, A. & Gosal, S. S. 2009. Dessication of Callus Enhances Somatic Embryogenesis and Subsequent Shoot Regeneration in Sugarcane. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol. 8: 332-334.
- Lakshmana, P., Geijskes, R. J., Wang, L., Elliot, A., Grof, C. P. L., Berding, N., Smith, G. R. 2006. Developmental and Hormonal Regulation of Direct Shoot Organogenesis and Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum* spp. Interspecific hybrids) Leaf Culture. *Plant Cell Reports*. Vol. 25: 1007-1015.
- Li, B. & Wolyn D. J. 1996. Temperature and Genotype Affect Asparagus Somatic Embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. Vol. 32 (3): 136-139.
- Lestari, E. G. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyakkan Tanaman melalui Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*. Vol. 7(1): 63-68.
- Mathur, J., Ahuja, P. S., Lal N. and Mathur A. K. 1989. Propagation of *Valeriana wallichii* DC using Encapsulated Apical and Axial Shoot Buds. *Plant Sci* 60: 111-6.
- Murthy, K. S. R., Kondamudi, R., Pulaiah, T. 2011. High Frequency Somatic Embryogenesis in *Ceropegia spiralis* Wight- An Endemic and Endangered Medical Plant. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol. 9: 414-418.
- Pospilova, A. J., Synkova, H., Rulcova, J. 2000. Cytokinin and Water Stress. *Biologia Plantarum*. Vol. 43: 321-328.

- Purnamaningsih, Ragapadmi. 2002. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Buletin AgroBio*. Vol. 5 (2): 51-58.
- Rasullah, F. F F., Nurhidayati, T., Nurmallasari. 2013. Respon Pertumbuhan Tunas Kultur Meristem Apikal Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Varietas NIX 1-3 Pada Media MS dengan Penambahan Arginin dan Glutamin. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. Vol. 2 (2): 2337-3520.
- Rasyid, A. 2005. Beberapa Catatan Tentang Alginat. *Oseana*. Vol. 30 (1): 9-14.
- Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., and Jackson R. B. 2011. *Biology*. Ninth edition. San Fransisco: Pearson Education, Inc., Publishing as Pearson Benjamin cumming.
- Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P. R., & Kossler, M. E. 1985. *In Colloquim on Progres and Prospects in Forest and Crop Biotechnology*. F. Valentin (Ed.). Spinger-Verlag, Berlin.
- Roy, M., Hossain, M., Biswas, A., Biswas, M. K., & Islam, R. 2011. Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis from Leaf Sheath Derived Callus of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Var. Isd-16. *Plant Tissue Culture & Biotech*. Vol. 21 (2): 143-149.
- Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T., and Kazuma, T. 2004. Simple and Efficient Method for Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaves of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Plant Biotechnology*. Vol. 21 (1): 25-33.
- Sinha, H. 1996. Studies on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Sugarcane. *Thesis*. India. Punjab Agricultural University.
- Syamsu, W., Yubiarti N., Kurniaty R., & Abidin, Z. 2003. *Teknik penanganan benih orthodox. (buku 1)*. Bogor: Badan Penelitian dan pengembangan Kehutanan; Balai Penelitian dan pengembangan Teknologi perbenihan.
- Synkova, H., Wilhelmova, N., Sestak, Z., Pospisilova, J. (1997). Photosynthesis in Transgenic Plants With Elevated Cytokinin Contents. Pessaraki M (Eds.) *Handbook of Photosynthesis*. 541-552.
- Taha, R. M., Mahmad, N., Yaacob J. S., Abdullah, N., & Mohajer, S. 2013. Sythetic Seeds Production and Regeneration of *Oxalis triangularis* for Mass

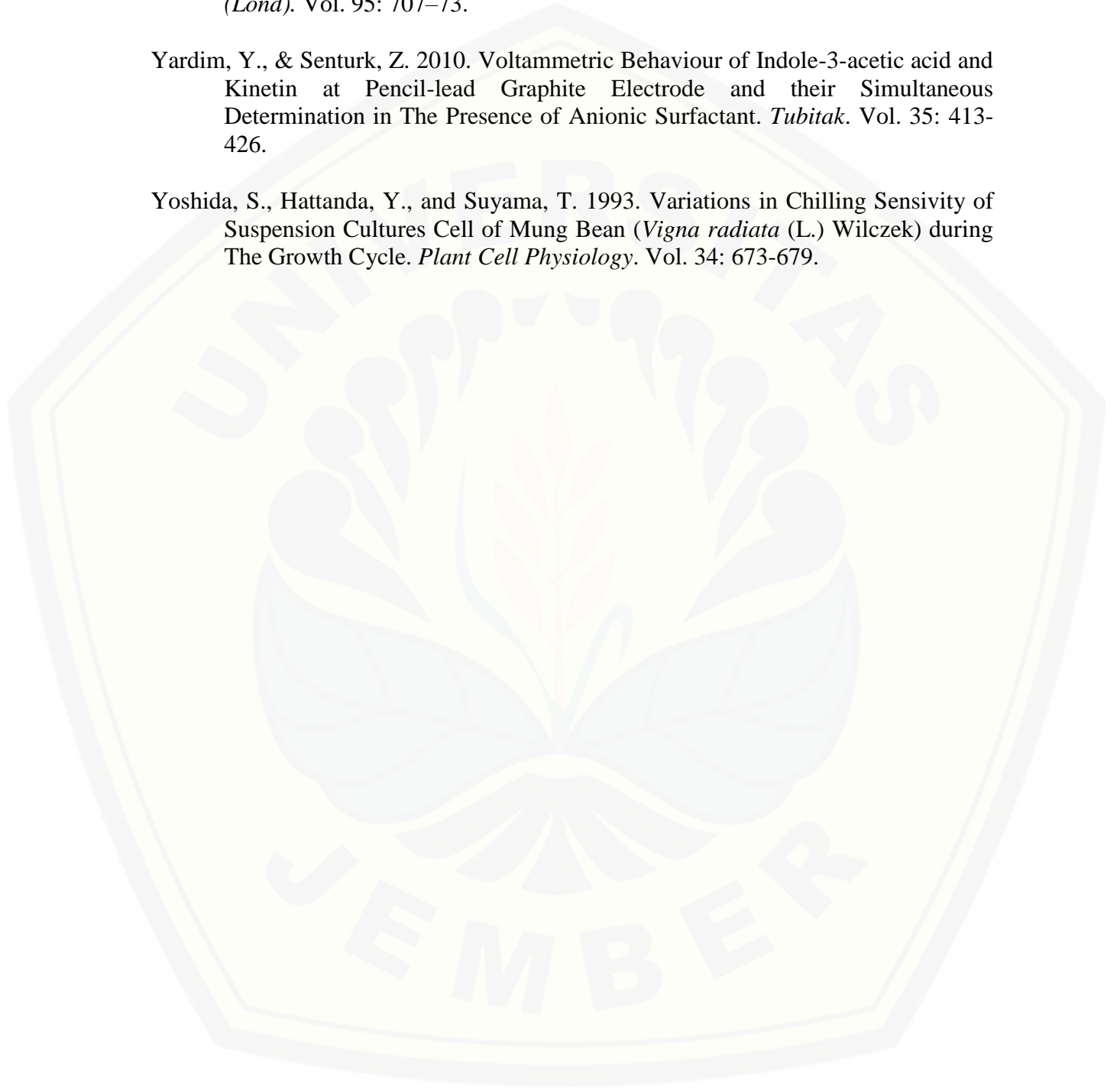
- Propagation and Conservation. *International Journal of Environmental Science and Development*. Vol. 4 (5): 394.
- Tahir, M. S., Victor, K., & Abdulkadir, S. 2011. The Effect 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) Concentration Induction in Sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*. Vol. 19 (2): 213-217.
- Tiel, K., Enriquez, G. A., Ceballo, Y., Soto, N., Fuentes, A. D., Ferreira, A., Coll, Y., & Pujol M. 2005. Development of a System for Rapid Plant Regeneration from *in vitro* Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Meristematic Tissue. Cuba: Plant Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology.
- Utami, E. S. W., Sumardi, I. Taryono, & Semiarti, E. 2007. Pengaruh  $\alpha$ -Naphthaleneacetic acid (NAA) Terhadap Embriogenesis Somatik Anggrek Bulan *Phalaenopsis Amabilis* (L.) Bl. *Biodiversitas*. Vol. 8, No. 4: 295-299.
- Verma, D., Joshi, R., & Kumar, P. 2011. Protocol for *in vitro* Somatic Embryogenesis and Regeneration of Rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol. 49: 958-963.
- Wan, Y. S. E. L. & Liang, G. H. 1988. The Effect of Kinetin on Callus Characters in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*. Vol. 39: 249.
- Wang, Q. & Perl, A. 2006. Cryopreservation of Embryogenic Cell Suspensions by Encapsulation-Vitrification. *Methods Mol Biol*. Vol. 318: 77-86.
- Wattimena, G. A. 1988a. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Wattimena, G.A., Gunawan, L.W., Mattjik, N.A., Syamsudin, N. E., Wiendi, M. A., & Ernawati, A. 1992b. *Bioteknologi Tanaman*. Laboratorium Kultur Jaringan, Pusat Antar Universitas Bioteknologi-IPB. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Bogor.
- Winarsih, S., Santoso, D., & Wardiyati, T. 2003. Embryogenesis Somatik dan Regenerasi Tanaman Pada Kultur Jaringan Pada Kultur *in vitro* Organ Bunga Kakao. *Pelita Perkebunan*. Vol. 19 (1): 99-108.
- Winarto, B. & Mattjik, N. A. 2009. Studi Kultur Anther pada Aksesori *Anthurium* Lokal. *J Hort*. Vol. 19 (4): 386-395.



Woodward, A. W., & Bartel, B. 2005. Auxin: regulation, action, interaction. *Ann Bot (Lond)*. Vol. 95: 707–73.

Yardim, Y., & Senturk, Z. 2010. Voltammetric Behaviour of Indole-3-acetic acid and Kinetin at Pencil-lead Graphite Electrode and their Simultaneous Determination in The Presence of Anionic Surfactant. *Tubitak*. Vol. 35: 413-426.

Yoshida, S., Hattanda, Y., and Suyama, T. 1993. Variations in Chilling Sensivity of Suspension Cultures Cell of Mung Bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) during The Growth Cycle. *Plant Cell Physiology*. Vol. 34: 673-679.



**Lampiran A. Komposisi Media Murashige & Skoog (MS0)**

Stok	Senyawa	Massa stok (gram)		Pemakaian / Liter
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,50	/L	20 ml
B	KNO <sub>3</sub>	95,00	/L	20 ml
C	CaCl <sub>2</sub>	22,00	/250 mL	5 ml
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,31		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,5		
	CoCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	0,0013		
D	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,0125	/250 mL	5 ml
	KI	0,0415		
	MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	18,5		
	ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,43		
E	CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	0,0013	/250 mL	5 ml
	MnSO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	0,7525		
F	Na <sub>2</sub> EDTA	1,86	/250 mL	5 ml
	FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	1,39		
Vitamin	Myoinositol	0,001 mg/L	/250 mL	5 ml
	Thiamine HCl	0,008 mg/L		5 ml
	Pyridoxine HCl	0,08 mg/L		
Sukrosa	Sukrosa			30 g/L
Bahan pematik	Agar kuljar			11 g/L

**Lampiran B. Jumlah *plantlet* terbentuk pada masing-masing eksplan**

<b>Eksplan</b>	<b>Jumlah <i>plantlet</i></b>
1	74
2	91
3	88
4	75
Total	328
<b>Rata-rata</b>	<b>82 <i>plantlet</i></b>

**Lampiran C. Komposisi Media Kapsul Sintetik**

<b>Stok</b>	<b>Senyawa</b>	<b>Pemakaian / 100 mL</b>
A	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1 ml
B	$\text{KNO}_3$	1 ml
C	$\text{CaCl}_2$ $\text{H}_3\text{BO}_3$ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,5 ml
D	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ KI $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 ml
E	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5 ml
F	$\text{Na}_2\text{EDTA}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 ml
Vitamin	Myoinositol Thiamine HCl Pyridoxine HCl	0,5 ml
Sukrosa	Sukrosa	2g
Bahan pematat	Na-alginat	3g
ZPT	Kinetin	0,5 ppm

**Lampiran D. Komposisi media Semi Solid**

<b>Stok</b>	<b>Senyawa</b>	<b>Pemakaian (mL)</b>
Bahan pematat	Phytigel	0,1 g
Akuades	Akuades	100

