



**KULTUR SUSPENSI SEL EMBRIOGENIK TEBU (*Saccharum
Officinarum* L.) MENGGUNAKAN BAP (6-Benzylaminopurine)
DAN KINETIN**

SKRIPSI

Oleh:

Hidayat
NIM 141510501167

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**KULTUR SUSPENSI SEL EMBRIOGENIK TEBU (*Saccharum
Officinarum* L.) MENGGUNAKAN BAP (6-Benzylaminopurine)
DAN KINETIN**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1)
dan memperoleh gelar Sarjana Pertanian

Oleh:

**Hidayat
NIM 141510501167**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Dengan Puji Syukur atas kehadiran Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang, saya persembahkan skripsi ini kepada :

1. Ibu Saya Siti Masruroh dan Bapak saya Sugeng Waluyo tercinta, terima kasih untuk semua kerja keras, dukungan dan motivasi yang tiada henti oleh ibu dan bapak selama ini yang tak mungkin terbalaskan dengan apapun.
2. Kakek dan Nenek dari ibu maupun dari bapak yang juga senantiasa menasehati saya selama ini, yang selalu mendukung saya dalam penyelesaian studi di Universitas Jember
3. Sanak saudara yang senantiasa mendampingi dan mendukung saya sehingga bisa menyelesaikan tugas akhir ini
4. Para guru sekolah dan juga para dosen yang telah membimbing saya dengan memberikan ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat bagi saya
5. Dosen Pembimbing Skripsi saya Ibu Parawita Dewanti yang dengan sabar selalu membimbing dan memberikan arahan kepada saya serta telah menjadi orang tua kedua bagi saya selama ini.
6. Teman serta sahabat sahabat saya dari sekolah hingga perguruan tinggi yang selalu menemani dan tidak segan dalam mengingatkan tentang sesuatu yang baik bagi saya.
7. Sahabat sahabat seperjuangan saya Miftachul Hudah, Anas Rakhman A.S dan Taufan Yudha P yang saling memotivasi dan saling mengingatkan selama ini baik dalam keseharian maupun dalam menyelesaikan tugas akhir ini
8. Rekan rekan Asisten fisiologi tumbuhan yang senantiasa berbagi ilmu bermanfaat serta selalu mendukung saya dalam mengerjakan tugas akhir
9. Rekan rekan organisasi yang senantiasa dalam berbagi ilmu yang bermanfaat bagi saya.
10. Perguruan Tinggi Universitas Jember yang menjadi wadah bagi saya dalam memperoleh ilmu yang bermanfaat baik akademik maupun non akademik.

MOTTO

“Sebaik baiknya ilmu yang diperoleh adalah ilmu yang bermanfaat bagi orang lain, karena ilmu yang bermanfaat merupakan bekal hidup didunia maupun di akhirat”

“Ilmu itu lebih baik dari pada harta. Ilmu menjaga engkau dan engkau menjaga harta. Ilmu itu penghukum (hakim) dan harta terhukum. Harta itu kurang apabila dibelanjakan tapi ilmu bertambah bila dibelanjakan”

(Ali bin Abi Talib)

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

(Asy-Syarah : 6-7)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : HIDAYAT

NIM : 141510501167

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: **“Kultur Suspensi Sel Embriogenik Tebu (*Saccharum Officinarum* L.) Menggunakan BAP (6-Benzylaminopurine) Dan Kinetin”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakkan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 12 November 2018

Yang menyatakan

Hidayat
NIM. 141510501167

SKRIPSI

**KULTUR SUSPENSI SEL EMBRIOGENIK TEBU (*Saccharum
Officinarum* L.) MENGGUNAKAN BAP (6-Benzylaminopurine)
DAN KINETIN**

Oleh :

**HIDAYAT
141510501167**

Pembimbing

Pembimbing Utama

: Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P.
NIP. 196504251990022002

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Kultur Suspensi Sel Embriogenik Tebu (*Saccharum Officinarum* L.) Menggunakan BAP (6-Benzylaminopurine) dan Kinetin**” telah diuji dan disahkan pada :

Hari : Senin

Tanggal : 12 November 2018

Tempat : Ruang Sidang Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P.

NIP. 196504251990022002

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Mohammad Ubaidillah S.Si., M.Agr., Ph.D.

NIP. 196907212000121002

Dr. Ir. Josi Ali Arifandi, MS.

NIP. 195511131983031001

Mengesahkan

Dekan,

Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D

NIP. 196005061987021001

RINGKASAN

Kultur Suspensi Sel Embriogenik Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Menggunakan BAP (6-Benzylaminopurine) dan Kinetin, Hidayat; 141510501167; 2018; Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian; Universitas Jember.

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan jenis tanaman yang banyak dibudidayakan sebagai komoditas penghasil gula. Masih kurangnya kebutuhan bibit tanaman tebu, sehingga dibutuhkan metode perbanyakan tanaman menggunakan kultur jaringan melalui kultur cair untuk memperoleh tanaman dalam jumlah yang banyak. Kultur suspensi merupakan metode perbanyakan tanaman dengan mengembangbiakan sel embriogenik tanaman tebu pada media cair dengan pemberian hormon yang sesuai. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komposisi BAP dan Kinetin yang paling efektif pada hasil suspensi sel embriogenik dan juga regenerasi yang dihasilkan.

Percobaan ini dilaksanakan di Laboratorium CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*), Universitas Jember dari bulan Maret sampai Oktober 2018. Pada penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari 9 perlakuan yang didapatkan dari pemberian komposisi BAP dan Kinetin sebagai berikut : A (Tanpa BAP dan Kinetin), B (BAP $0,5 \text{ mgL}^{-1}$), C (BAP 1 mgL^{-1}), D (Kinetin $0,25 \text{ mgL}^{-1}$), E (Kinetin $0,5 \text{ mgL}^{-1}$), F (BAP $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ + Kinetin $0,25 \text{ mgL}^{-1}$), G (BAP $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ + Kinetin $0,5 \text{ mgL}^{-1}$), H (BAP 1 mgL^{-1} + Kinetin $0,25 \text{ mgL}^{-1}$) dan I (BAP 1 mgL^{-1} + Kinetin $0,5 \text{ mgL}^{-1}$). Data yang diperoleh diolah secara SEM (*Struktural Equation Modeling*) dan ditabulasi dari masing masing parameter pengamatan. Variabel pengamatan terdiri dari morfologi dan warna kalus, histologi jaringan, respon pertumbuhan kalus (kalus embriogenik, jumlah dan panjang koleoptil serta jumlah dan panjang tunas).

Percobaan diawali dengan proses induksi kalus yang didapatkan dari eksplan berupa pucuk daun tebu yang menggulung (*Spindle Leaf*). Induksi dilakukan selama 6 minggu dan diinkubasi ditempat gelap. Tahap selanjutnya adalah proliferasi menggunakan media padat untuk pembentukan somatik embriogenesis selama 3 minggu inkubasi dengan kondisi gelap dan terang. Kalus yang sudah memasuki fase koleoptilar kemudian dipindahkan pada media suspensi. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi BAP dan Kinetin sebesar $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ dan $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ merupakan konsentrasi terbaik yang ditambahkan pada media kultur suspensi dengan parameter jumlah koleoptil sebesar 27 dan panjang koleoptil sebesar 0,663 cm. Regenerasi didapatkan setelah perlakuan kultur suspensi, hasil terbaik pada regenerasi ditunjukkan dengan parameter jumlah tunas sebesar 23,67 pada penambahan konsentrasi BAP dan Kinetin sebesar $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ dan $0,25 \text{ mgL}^{-1}$.

Kata kunci : Tebu (*Saccharum officinarum* L.), Kultur Suspensi, BAP, Kinetin

SUMMARY

Embryogenic Cells Suspension Culture Of Sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.) Using BAP (6-Benzylaminopurine) and Kinetin, HIDAYAT; 141510501167; 2018; Agrotechnology Courses; Faculty Of Agriculture; University Of Jember.

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is a type of plant widely cultivated as a sugar producer. There is still a lack of need for sugarcane seedlings, so it takes a method of plant propagation using tissue culture through liquid culture to obtain plants in large quantities. Cell suspension culture is a method of multiplying plants with expanding embryogenic cells of sugarcane in liquid media with giving appropriate hormones. This study aims to know the most effective composition of BAP and Kinetin on suspension cell embryogenic and also plant regeneration produced. This experiment was carried out at the CDAST Laboratory (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*), University of Jember from March to October 2018. The experiment design in this study was used Random Complete (RAL) consists of 9 treatments obtained from composition of BAP and Kinetin as following: A (Without BAP and Kinetin), B (BAP 0, 5 mg L⁻¹), C (BAP 1 mg L⁻¹), D (Kinetin 0, 25 mg l⁻¹), E (Kinetin 0, 5 mg l⁻¹), F (BAP 0.5 mg L⁻¹ + Kinetin 0, 2 5 mg l⁻¹), G (0.5 mg L⁻¹ BAP + Kinetin 0, 5 mg l⁻¹), H (BAP 1 mg L⁻¹ + Kinetin 0.25 mg L⁻¹) and I (BAP 1 mg L⁻¹ + Kinetin 0.5 mg L⁻¹). Data obtained processed by SEM (*Structural Equation Modeling*) and tabulated from respectively parameters observation. Variable observation consists: morphology and callus colour, callus histology, response growth callus (callus embryogenic, Coleoptile number, length of coleoptile, shoot number and bud length).

The experiment began with the callus induction process which was found from spindle leaf shoots explant. Induction is carried out for 6 weeks and incubated in a dark place. The next process is proliferation using solid media to obtain the somatic embryogenesis stage for 3 weeks of incubation in dark and light conditions. Callus, which has become a phase of coloptication, is then transferred to suspension media. The results showed that the concentrations of BAP and Kinetin of 0.5 mg L⁻¹ and 0.25 mg L⁻¹ were the best result on culture media with number of coleoptile parameter equal 27 and the length of the coleoptile was 0.663 cm. Regeneration after suspension culture, the best results with the number of shoots were 23.67 in the details of BAP and Kinetin at 0.5 mg L⁻¹ and 0.25 mg L⁻¹.

Keyword: Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), Suspension Culture, BAP, Kinetin

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan ridhonya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi yang berjudul “Kultur Suspensi Sel Embriogenik Tebu (*Saccharum Officinarum L.*) Menggunakan BAP (*6-Benzylaminopurine*) dan Kinetin“ sebagai syarat untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pertanian.

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

1. Ibu saya Siti Masruroh dan Bapak saya Sugeng Waluyo tercinta, terima kasih untuk semua kerja keras, dukungan dan motivasi yang tiada henti oleh ibu dan bapak selama ini yang tak mungkin terbalaskan dengan apapun.
2. Dr. Ir. Sigit Soeparjono, MS. Ph.D. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
3. Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D., DIC selaku ketua Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
4. Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P. selaku Dosen Pembimbing Utama, yang telah memberikan kesempatan bergabung dengan project penelitian, bimbingan, ilmu, pengalaman, serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
5. Mohammad Ubaidillah S.Si., M.Agr., Ph.D. serta Dr. Ir. Josi Ali Arifandi, MS. sebagai Dosen penguji yang memberikan pengarahan dalam penulisan, bimbingan, saran dan masukan terhadap penyelesaian skripsi.
6. Prof. Dr. Ir Bambang Sugiharto, M. Agr. Sc. Selaku kepala laboratorium CDAST (Center for Development of Advanced Science And Technology) yang telah memberikan bimbingan serta arahan selama penelitian berlangsung.
7. Rekan penelitian di Laboatorium CDAST serta seluruh teknisi Laboratorium CDAST dan seluruh keluarga besar Laboratorium CDAST yang selalu memberi dukungan kepada saya dan senantiasa membantu pekerjaan saya serta selalu memberi arahan selama penelitian di CDAST.

8. Sahabat sahabat seperjuangan saya Miftachul Hudah, Anas Rakhman A.S dan Taufan Yudha P yang saling memotivasi dan saling mengingatkan selama ini baik dalam keseharian maupun dalam menyelesaikan tugas akhir ini
9. Sahabat sekaligus tim dalam asistem fisiologi tumbuhan “Anak Kompleks” yaitu Maghfiroh, Zaiyin, Huda, Wildan serta tim asisten yang sudah saya anggap seperti adik Dynda, Dimas, Maisuri, U’thiya, Seto, Puput, Gita, Febrian, Feri dan Jaka.
10. Sahabat sahabat dalam organisasi “Chorus Rusticarum” dan “UKSM Panjalu” yang telah memberikan Banyak Pengalaman berharga selama perkuliahan hingga saat ini
11. Rekan rekan Kontrakan “17A” Irfan, Heru, Rizal, Andika, Septa, Budi dan Rio yang senantiasa memberi semangat, dukungan serta doa.
12. Keluarga besar Agroteknologi angkatan 2014 yang selalu memberi semangat dan doa.
13. Keluarga KKN 11 “Bayeman Squad” yaitu Tata, Dinda, Linda, Angga, Vita, Ira, Reni, Aisyah dan Afifah, serta keluarga Magang “Kacang Gosong” yaitu Noval, Zupri, Wahid, Ihwan, Imam Tauqit, Anisatul, Mega, Zaiyin dan Tika yang selalu memberi dukungan penuh serta memberi semangat dalam menyelesaikan penelitian ini.
14. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu namun telah memberikan bantuan dan dukungannya selama penyusunan skripsi ini.

Penulis telah berusaha untuk menyelesaikan tanggung jawabnya dalam penulisan Karya Ilmiah Tertulis ini dengan sebaik-baiknya. Apabila ada kesempurnaan datangnya hanyalah dari Allah SWT. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Semoga segala sesuatu yang telah tertulis di dalam karya ilmiah tertulis ini dapat memberikan manfaat bagi para pembaca.

Jember, 12 November 2018

Penulis

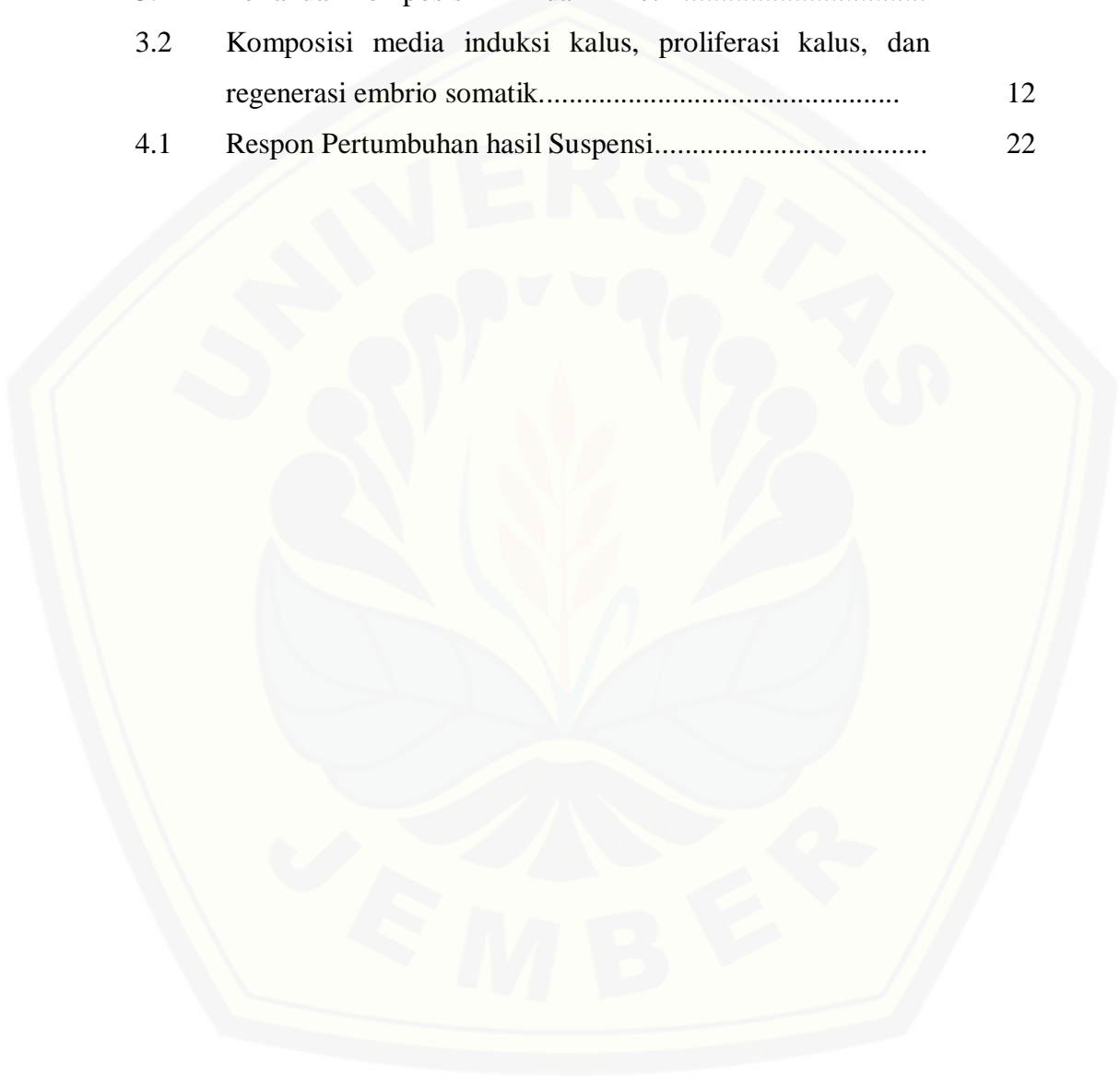
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tanaman Tebu.....	4
2.2 Somatik Embriogenesis	4
2.3 Bahan Tanam	6
2.4 Kultur Suspensi	6
2.5 Faktor yang berperan dalam kultur suspensi.....	7
2.6 Zat Pengatur Tumbuh	8
2.7 Hipotesis	10
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11

3.2 Alat dan Bahan	11
3.3 Rancangan Percobaan	11
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	12
3.5 Variabel Pengamatan	15
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1 Hasil	19
4.1.1 Induksi Kalus Tebu	19
4.1.2 Proliferasi Kalus Tebu	21
4.1.3 Proliferasi kalus tebu menggunakan media cair (Kultur Suspensi) .	22
4.1.4 Regenerasi Kalus Tebu.....	28
4.2 Pembahasan	30
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
3.1	Perlakuan komposisi BAP dan Kinetin.....	12
3.2	Komposisi media induksi kalus, proliferasi kalus, dan regenerasi embrio somatik.....	12
4.1	Respon Pertumbuhan hasil Suspensi.....	22



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
2.1	Perkembangan Somatik embriogenesis	5
2.2	Struktur atom BAP dan Kinetin	9
4.1	Induksi Kalus	20
4.2	Morfologi dan Histologi kalus embriogenik dan non Embriogenik	21
4.3	Morfologi kalus pada tahap proliferasi	22
4.4	Sel Embriogenik dan non embriogenik hasil Suspensi	24
4.5	Regenerasi kalus perlakuan Tanpa dan Kinetin, BAP 0,5 mgL ⁻¹ , BAP 1 mgL ⁻¹ , Kinetin 0,25 mgL ⁻¹ dan Kinetin 0,5 mgL ⁻¹	25
4.6	Regenerasi kalus perlakuan BAP 0,5 mgL ⁻¹ + Kinetin 0,25; BAP 0,5 mgL ⁻¹ + Kinetin 0,5; BAP 1 mgL ⁻¹ + Kinetin 0,25; BAP 1 mgL ⁻¹ + Kinetin 0,25 dan BAP 0,5 mgL ⁻¹ + Kinetin 0,25	26
4.7	Jumlah koleoptil 3 MST pada media cair	27
4.8	Panjang koleoptil 3 MST pada media cair	28
4.9	Jumlah tunas (Planlet tebu) umur 3 MST	29
4.10	Tinggi tunas (Planlet tebu) umur 3 MST	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
1	Komposisi media MS	43
2	Dokumentasi Penelitian	44
3	Perhitungan jumlah dan panjang Koleoptil Menggunakan Aplikasi LAS EZ	46
4	Data Rata rata Jumlah Koleoptil.....	47
5	Data Rata rata Panjang Koleoptil	48
6	Data Rata rata Jumlah Tunas	49
7	Data Rata rata Tinggi Tunas.....	50

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman tebu merupakan salah satu komoditas pertanian yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Sebagai komoditas perkebunan, tentunya tanaman tebu sangat diperhatikan dalam berbagai aspek termasuk budidayanya. Indarti dan Putra (2016) menunjukkan bahwa secara umum luas areal panen tanaman tebu di Indonesia mulai tahun 1980 mengalami peningkatan dari 316.063 ha menjadi 477.123 ha pada tahun 2013 dan diprediksi akan meningkat pada tahun tahun selanjutnya. Peningkatan sebesar 50,96% luas panen tebu menunjukkan bahwa gula yang diproduksi tentunya mengalami peningkatan. beberapa lokasi yang menjadi areal perluasan lahan tebu diantaranya adalah Jawa Timur, Lampung, Jawa Tengah, Jawa Barat, Sumatra Selatan, Sulawesi Selatan, Sumatra Utara, Gorontalo dan Yogyakarta. Seiring dengan perkembangan zaman, metode pengembangbiakan tanaman dengan menggunakan pembibitan secara vegetatif mengalami berbagai kendala seperti serangan organisme pengganggu tanaman salah satunya adalah virus SCSMV (*Sugarcane Streak Mosaik Virus*). Hal ini sesuai dengan Damayanti *et al* (2010), pada budidaya tanaman tebu secara konvensional menggunakan bibit yang berasal dari stek bagian batang tebu lebih tinggi beresiko terkena virus SCSMV.

Budidaya tanaman tebu menggunakan teknik kultur jaringan merupakan suatu pengembangan teknologi yang mulai diterapkan sebagai salah satu cara untuk memperoleh tanaman baru secara vegetatif dengan jumlah yang cukup banyak dibandingkan dengan pengembangbiakan vegetatif secara konvensional. Hendaryono dan Wijayani (1994), tanaman yang didapatkan melalui kultur jaringan memiliki jumlah yang lebih banyak dalam waktu yang relatif singkat serta memiliki kesamaan sifat fisiologi dan morfologi tanaman induknya.

Kultur jaringan tanaman dilakukan dengan menanam secara aseptik suatu jaringan tanaman dengan memanfaatkan sifat totipotensi sel pada tanaman, sehingga dengan pengaturan nutrisi pada media dapat dihasilkan tanaman sesuai harapan. Penggunaan media *Murashige and Skoog* (MS) + 1,5 mg/l 2,4-D

merupakan komposisi media dan zat pengatur tumbuh yang sesuai, sehingga dapat menginduksi pembentukan kalus maupun pindah tanam kalus (Fiah, dkk., 2014).

Pembiakan tanaman tebu dengan menginduksi kalus pada media padat merupakan metode yang umum digunakan untuk menghasilkan planlet yang akan diregenerasi menjadi tanaman baru dalam jumlah yang banyak. Pembiakan eksplan dengan hanya menggunakan media padat masih kurang efisien mengingat potensi dalam pengembangan kalus embriogenik untuk bisa diinisiasi menjadi sel embriogenik menggunakan media cair dalam pengembangannya. Hal ini juga diungkapkan oleh Minarsih, dkk (2013) yang menyatakan bahwa efisiensi penggunaan media padat masih kurang efisien ditinjau dari jumlah planlet yang dihasilkan atau diproduksi pada kultur tanaman tebu.

Penggunaan media cair sebagai kultur suspensi tidak hanya untuk menghasilkan tanaman dalam jumlah banyak, akan tetapi juga sebagai metode untuk menghasilkan sel serta sebagai sarana untuk melakukan pengamatan pertumbuhan tanaman dalam tingkat sel. Dwimahyani (2007), penggunaan media cair juga dapat digunakan untuk melihat pengaruhnya pada pertumbuhan kalus, sehingga bisa dihasilkan kalus yang ideal sebagai bahan dasar untuk metode kultur suspensi. Minarsih, dkk (2015) juga menyatakan penggunaan media cair dapat digunakan sebagai transformasi gen menggunakan metode sistem perendaman sesaat.

Pemilihan media cair dengan komposisi zat pengatur tumbuh yang sesuai merupakan faktor utama penunjang regenerasi somatik embriogenesis pada tanaman tebu. Hormon sitokinin salah satunya berupa BAP (*6-Benzylaminopurine*) dimana berdasarkan penelitian Gill, *et al* (2004) dengan pemberian konsentrasi sebesar $0,5 \text{ mg/L}^{-1}$ dihasilkan regenerasi tunas tertinggi. Hormon lain yang menunjang regenerasi kalus tanaman yang diinisiasi melalui media cair adalah mengkombinasikan media dengan kinetin. Sholeha (2014) membuktikan hasil penelitian dengan penambahan kinetin dengan konsentrasi 0,5 ppm mampu meningkatkan regenerasi dan pertumbuhan embrio somatik.

Penggunaan komposisi zat pengatur tumbuh yang sesuai diharapkan proses kultur tebu dapat menghasilkan sel sel embriogenesis sertamemperoleh (*Embryogenic Cell Suspension*) yang homogen hingga dapat dihasilkan eksplan setelah diregenerasikan. penambahan zat pengatur tumbuh berupa BAP (*6-Benzylaminopurine*) dan Kinetin digunakan dalam percobaan kali ini karena dianggap paling efektif untuk mengetahui kualitas sel embriogenik tanaman menggunakan kultur suspensi.

1.2 Rumusan Masalah

Penggunaan media padat untuk produksi Somatik Embriogenesis pada tanaman tebu kurang efisien, sehingga diperlukan media cair dengan komposisi Zat pengatur tumbuh yang tepat untuk dapat menghasilkan somatik embriogenesis pada tanaman tebu, oleh karena itu hormon BAP dan Kinetin pada media kultur suspensi ditambahkan untuk mengetahui bagaimana pengaruhnya terhadap kalus embriogenik tebu.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan pada penelitian ini adalah untuk mendapatkan komposisi Zat pengatur tumbuh berupa BAP dan Kinetin yang terbaik terhadap kultur suspensi tanaman tebu dan dapat meregenerasikan hasil suspensi tanaman tebu.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil pada penelitian ini didapatkan regenerasi kalus dengan komposisi zat pengatur tumbuh (BAP dan Kinetin) yang sesuai pada tanaman tebu dan tunas hasil regenerasi tanaman bisa dikembangkan untuk produksi benih sintetik

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Tebu

Tebu merupakan tanaman perkebunan yang banyak dibudidayakan serta bernilai ekonomis yang cukup tinggi. Tanaman tebu mengandung banyak sukrosa yang terdapat pada batang. Tanaman tebu tergolong jenis tanaman perdu dan berikut merupakan klasifikasi tanaman tebu dengan nama latin :

Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Monocotyledone</i>
Ordo	: <i>Graminales</i>
Famili	: <i>Graminae</i>
Genus	: <i>Saccharum</i>
Species	: <i>Saccharum officinarum</i>

Tanaman tebu tergolong jenis tanaman perdu atau rumput rumputan sesuai dengan taksonomi diatas. Terdapat banyak jenis varietas tanaman tebu di Indonesia, di antaranya yaitu tebu Cirebon hitam, tebu kasur, POJ 100, POJ 2364, EK 28, POJ 2878. Setiap varietas tanaman tebu memiliki sifat morfologi yang berbeda, seperti ukuran batang dan warna batangnya. Tanaman tebu merupakan tanaman berbiji tunggal. Tinggi tanaman tebu berkisar antara 2-4 meter. Ciri khas dari tanaman tebu yaitu memiliki batang yang beruas dengan adanya buku buku batang sebagai tempat dudukan daun tanaman tebu. Bentuk daun tanaman tebu adalah berpelepah dan berupa helaian daun, panjang dau tanaman tebu dapat mencapai 1 hingga 2 meter tergantung dari jenis dan variretasnya sedangkan lebarnya 4-8 cm dengan permukaan kasar dan berbulu. Tanaman tebu memiliki bunga majemuk yang berbentuk malai yang terdapat pada bagian puncak sebuah poros gelagah, sedangkan tanaman tebu memiliki akar serabut (Thomas, 1992).

2.2 Somatik Embriogenesis

Perkembangbiakan tanaman melalui kultur jaringan didapatkan dari berbagai jaringan maupun sel tanaman yang memiliki potensi besar untuk dapat

dikembangkan. kemampuan beberapa sel tanaman untuk menghasilkan tanaman baru dengan pembentukan embrio tanpa adanya pertemuan gamet jantan dan betina tanaman didapatkan melalui somatik embriogenesis. Sukmadjaja dan Mulyana (2011) pengembangan organ organ somatik dapat berasal dari bagian tanaman dan memiliki ciri tanpa pembuahan sel, melainkan melalui pengkalusan yang dan bersifat bipolar sehingga mampu meregenerasi menjadi tanaman utuh. Somatik embriogenesis membentuk kalus untuk kemudian melewati tahap tahap perkembangan tanaman pada umumnya yaitu diferensiasi hingga terbentuk tunas dan pendewasaan.

Menurut Zavattieri, *et al* (2010) beberapa tahapan Somatik Embriogenesis terjadi pada tahap induksi maupun proliferasi dengan penambahan zat penstimulus yang tepat sel somatik akan merespon sehingga terekspresi pembentukan dan perkembangan preembrio untuk selanjutnya diikuti tahap tahap perkembangan kalus mulai dari globular, skutelar, koleoptilar dan kotiledon.



Gambar 1. Perkembangan somatik embriogenesis fase globular, skutelar dan koleoptilar

Beberapa tahapan somatik embriogenesis pada tebu menentukan keberhasilan perkembangan kalus hingga terbentuk fase kotiledon. Fase globular pada somatik embriogenesis ditandai dengan adanya tonjolan pada kalus yang kemudian masuk pada tahapan skutelar, dimana tonjolan kalus yang berkembang mulai membentuk menyerupai hati. Memasuki fase koleoptilar mulai terbentuk 2 meristem akar dan pucuk yang menandakan diferensiasi kalus menjadi organ organ tanaman (Ho dan Vasil, 1983).

2.3 Bahan Tanam

Bahan tanam atau eksplan merupakan bagian terpenting yang digunakan dalam proses induksi atau proses inisiasi. Nugroho dan Sugito (2000), inisiasi merupakan upaya penumbuhan meristem atau bagian organ tanaman. Jaringan meristem merupakan jaringan yang banyak digunakan sebagai bahan atau eksplan untuk kultur jaringan. Tiel, *et al* (2016), penggunaan jaringan meristem memiliki efisiensi regenerasi yang cukup tinggi sehingga sangat menentukan keberhasilan dalam tahapan pembentukan embrio somatik pada suatu tanaman. Menurut Manuhara (2014), eksplan yang berasal dari jaringan yang telah terdeferensiasi seperti bagian pucuk memiliki respon yang baik ketika mengalami cekaman karena luka sehingga bisa menginduksi pembentukan kalus yang merupakan sel sel pada eksplan yang terus membelah menghasilkan kumpulan sel tidak terorganisasi. Media yang digunakan dalam induksi kalus merupakan media padat dengan konsentrasi nutrisi yang sudah ditentukan sehingga menghasilkan kalus sebagai mikropropagasi eksplan *in vitro*.

2.4 Kultur Suspensi

Pembiakan tanaman yang dilakukan secara vegetatif menggunakan teknologi kultur jaringan tidak lepas dari beberapa bahan yang dikembangkan. Kultur suspensi merupakan salah satu metode pengembangbiakan bahan tanam dan merupakan suatu sistem yang lebih detail untuk dapat mempelajari mekanisme perkembangbiakan tanaman dalam skala sel. Sel sel embriogenik sebagai bahan suspensi yang digunakan sebagai sumber protoplas untuk dapat difusikan sehingga berpotensi menjadi embrio somatik. Penggunaan kultur suspensi tanaman dapat meningkatkan produksi tanaman karena lebih berpotensi menjadi tanaman baru dan perkembangan sel tanaman yang dapat tumbuh pada media diharapkan dapat tumbuh menjadi tanaman baru sehingga prinsip kultur jaringan yaitu memanfaatkan totipotensi sel dapat dioptimalkan dengan mengembangbiakan sel sel embriogenik tanaman (Sumaryono dan Riyadi, 2005).

Keberhasilan kultur suspensi sangat dipengaruhi oleh perlakuan yang diberikan serta beberapa faktor lain seperti sub kultur pada bahan tanamnya. Sub kultur kalus bertujuan untuk tetap menyediakan nutrisi bagi kalus, selain itu sub

kultur kalus juga meningkatkan bobot biomasanya. Sub kultur pada kultur suspensi pada beberapa kali pengulangan memiliki hasil yang baik pada kalus yang dikembangkan, akan tetapi hal ini juga dapat berdampak buruk ketika sub kultur dilakukan secara berulang ulang. Sumaryono dan Riyadi (2005), sub kultur dilakukan dengan memperhatikan perkembangan sel yang tumbuh pada media cair dan berdasarkan hasil penelitian sub kultur optimal dilakukan setelah 14 hari dan pengulangan subkultur dilakukan sebanyak 2 kali yang paling efektif. Perlakuan sub kultur pada kultur suspensi juga merupakan salah satu upaya untuk memperbanyak sel supaya terus berlanjut dan menghasilkan explant yang banyak. Hal ini sesuai menurut Nasir (2001), Pengaturan kombinasi media cair sebagai bahan kultur suspensi sangat berpengaruh besar terhadap keberhasilan kultur sel tanaman dan juga perlakuan subkultur pada sel suspensi dapat meningkatkan perkembangan menggunakan media baru dengan ketentuan tidak melebihi batas kepadatan minimum yang justru dapat mengakibatkan pembelahan dan pertumbuhan sel menjadi terhenti.

2.5 Faktor yang berperan dalam kultur suspensi

Kalus yang dihasilkan pada proses induksi memiliki potensi yang besar untuk dapat dikembangkan menggunakan media cair. Kalus yang digunakan sebagai bahan untuk kultur suspensi harus memenuhi kriteria yang sesuai. Proliferasi kalus akan menentukan keberhasilan dalam memperoleh sel tunggal yang bersifat embriogenik. Dwimahyani (2007), kalus hasil induksi media padat harus bersifat friable (bertekstur remah) sehingga dapat dikatakan *ideal callus* (IC) serta ketika proses inisiasi menggunakan media cair akan mudah dipecah dan terdispersi menjadi *small cell aggregat*. Sel sel yang dihasilkan setelah terdispersi memiliki potensi untuk dapat berkembang pada komposisi media yang sesuai. Celiktas (2010) menyatakan media cair memiliki kemampuan dalam menumbuhkan sel dan organ kalus.

Hasil induksi berupa kalus embriogenik mengandung banyak sel embriogenik sehingga berpotensi besar untuk didapatkan regenerasi tanaman yang lebih banyak. Hal penting yang menjadi pengaruh besar adalah kualitas ECS

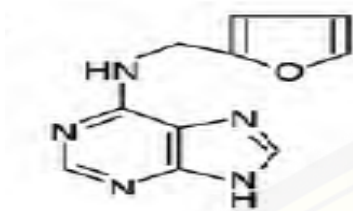
(*Embryogenic Cell Suspension*) yang didapat melalui tahapan sub kultur pada proses proliferasi, hal ini sesuai dengan Dwimahyani (2007), yang menyatakan homogenitas suatu suspensi sel mempengaruhi kemampuan regenerasi pada sel suspensi dan juga perlakuan sub kultur terbaik untuk menghasilkan regenerasi berdasarkan penelitian yaitu dilakukan sebanyak 2 kali serta penambahan nutrisi dalam proliferasi kalus juga penting sehingga didapatkan ECS (*Embryogenic Cell Suspension*) yang terbaik.

Regenerasi sel yang melibatkan media cair sebagai media pensuspensi jaringan tanaman seperti kalus embriogenik. Tingkat keberhasilan kultur suspensi tergantung beberapa faktor, diantaranya adalah jenis media dan juga hormon yang digunakan selama proses regenerasi kalus maupun sel embriogenik pada tanaman. Beberapa faktor tersebut antara lain kecepatan putaran (rpm) pada media yang berisi kalus maupun suspensi sel embriogenik tanaman. Sel tunggal didapatkan karena pengaruh oleh guncangan atau getaran alat seperti shaker dengan kecepatan antara 30-180 rpm yang dapat mempercepat proses dispersi bahan menjadi larut didalam media cair sehingga dari jaringan embriogenik dapat terpecah menjadi sel embriogenik (Hutami, 2009). Proses sub kultur pada saat kultur suspensi juga berfungsi untuk menciptakan sel embriogenik yang homogen, sehingga proses regenerasi sel menjadi mudah dan juga presentase keberhasilan sel dalam fase fase pengkalusan hingga menjadi eksplan memiliki peluang yang tinggi.

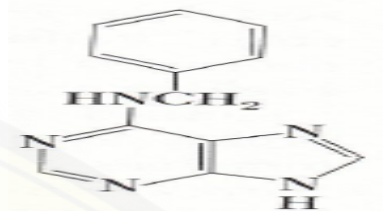
2.6 Zat Pengatur tumbuh

Zat pengatur tumbuh sangat dibutuhkan oleh tanaman untuk menunjang pertumbuhan maupun serangkaian metabolisme tanaman. Zat pengatur tumbuh ada yang bersifat menghambat dan juga direspon baik bagi tanaman. Davies (2010), proses fisiologis tanaman dipengaruhi oleh konsentrasi hormon yang ada, hormon mempengaruhi diferensiasi. Beberapa hormon seperti Auksin, Sitokinin dan Giberelin merupakan hormon yang sering digunakan dan dari jenis hormon tersebut juga terdapat turunan turunannya. Hormon sitokinin merupakan salah

satu hormon yang memiliki peran penting dalam memicu pertumbuhan tunas tanaman, berikut merupakan turunan dari sitokinin seperti BAP dan Kinetin.



Gambar 3. Struktur atom kinetin



Gambar 3. Struktur atom BAP

Kinetin merupakan salah satu hormon turunan dari sitokinin, sitokinin berdasarkan Mark (1991) merupakan hormon yang banyak digunakan untuk merangsang pembelahan sel pada tanaman. Stimulasi sitokinin berasal dari isolasi DNA sel yang telah diidentifikasi sebagai *6-Furfuryl Amino Purin* (Davies, 2010). Menurut Tolera, *et al* (2014), Kinetin sangat berpengaruh signifikan terhadap hasil kultur tanaman tebu dan hal ini terbukti pada inisiasi awal tanaman tunas dengan parameter jumlah tunas pereksplan dan panjang tunas rata rata. Pembelahan sel akibat pemberian kinetin sangat merespon pembentukan tunas tanaman.

Beberapa jenis hormon lain seperti BAP (*6-Benzylaminopurine*) merupakan salah satu jenis Sitokinin dan sering digunakan sebagai zat pengatur tumbuh pada tanaman tebu di media kultur jaringan sebagai pemicu regenerasi (Sadat, *et al.*, 2011). Pada penelitian Ijaz, *et al* (2012), menunjukkan bahwa BAP sebagai hormon yang ditambahkan dengan konsentrasi kecil pada regenerasi tanaman tebu juga sangat dipengaruhi oleh usia kalus saat regenerasi.

Kinetin dan BAP merupakan Hormon turunan dari sitokinin yang memiliki peran dalam memicu pertumbuhan pada tanaman. Penelitian Lawyer, *et al* (2014) menunjukkan pemberian ZPT BAP dan Kinetin dengan perbandingan konsentrasi $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ dan $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ memiliki pengaruh besar terhadap regenerasi terutama pertumbuhan meristem apikal pada tanaman tebu. Pengaturan konsentrasi ZPT BAP dan juga kinetin sangat berpengaruh dalam memicu perakaran pada tanaman (Erturk, 2001).

2.7 Hipotesis

Terdapat komposisi media terbaik pemberian zat pengatur tumbuh BAP (6-*Benzylaminopurin*) dan Kinetin pada kultur suspensi sel embriogenik tanaman tebu.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dengan judul “**KULTUR SUSPENSI SEL EMBRIOGENIK TEBU (*Saccharum Officinarum* L.) MENGGUNAKAN BAP (6-Benzylaminopurine) DAN KINETIN**” dilaksanakan pada bulan Maret 2018 hingga Oktober 2018 di Laboratorium Kultur Jaringan, CDAST (*Center for Defelopment of Advanced Scinces and Technology*), Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan merupakan alat standart kultur jaringan, meliputi *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF), autoklaf, pH meter, stirrer, mikropipet, pinset, pisau scalpel, bunsen, alumunium foil, kertas saring, botol kultur, petridish, beaker glass, gelas ukur, kamera, mikroskop stereo, neraca analitik.

3.2.2 Bahan

Bahan tanam (eksplan) yang digunakan merupakan pucuk daun muda yang masih menggulung dari tanaman tebu Varietas Bulu Lawang (BL) yang berusia 6 bulan. Selain bahan tanam, juga diperlukan bahan lain dalam proses induksi kalus, proliferasi dan perlakuan kultur suspensi yaitu berupamedia MS (Murashige Skoog) cair, zat pengatur tumbuh (2,4-D), BAP (*6-Benzylaminopurine*) dan Kinetin.

3.3 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 1 faktor, yaitu komposisi ZPT berupa BAP (*6-Benzylaminopurine*) dan Kinetin, sehingga didapatkan 9 perlakuan dengan 3 ulangan.

Adapun Tabel 3.1 perlakuan komposisi BAP dan Kinetin adalah sebagai berikut

Kode	Perlakuan
(A)	Tanpa BAP dan Kinetin
(B)	BAP 0,5 mgL ⁻¹
(C)	BAP 1 mgL ⁻¹
(D)	Kinetin 0,25 mgL ⁻¹
(E)	Kinetin 0,5 mgL ⁻¹
(F)	BAP 0,5 mgL ⁻¹ + Kinetin 0,25 mgL ⁻¹
(G)	BAP 0,5 mgL ⁻¹ + Kinetin 0,5 mgL ⁻¹
(H)	BAP 1 mgL ⁻¹ + Kinetin 0,25 mgL ⁻¹
(I)	BAP 1 mgL ⁻¹ + Kinetin 0,5 mgL ⁻¹

Analisis data yang dalam penelitian ini menggunakan olah data secara SEM (*Struktural Equation Modeling*) . Data yang diperoleh kemudian akan ditabulasi dan dihitung nilai rata-ratanya.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Komposisi media induksi kalus, proliferasi kalus dan media regenerasi embrio somatik terdapat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2. Komposisi media induksi kalus, proliferasi kalus, dan regenerasi embrio somatik.

Bahan kimia	Media induksi padat	Media proliferasi padat	Media proliferasi cair	Media regenerasi cair
Media dasar	MS + vitamin	MS + vitamin	MS + vitamin	MS + vitamin
Agar	5 gL ⁻¹	5 gL ⁻¹	-	-
2,4-D	4 mgL ⁻¹	2 mgL ⁻¹	-	-
BAP	-	-	Perlakuan	-
Kinetin	-	-	Perlakuan	-
Casein hidrolisat	300 mgL ⁻¹	500 mgL ⁻¹	500 mgL ⁻¹	500 mgL ⁻¹
L-Prolin	-	560 mgL ⁻¹	560mgL ⁻¹	560mgL ⁻¹

(mgL ⁻¹)				
L-Glutamine	-	40 mgL ⁻¹	40 mgL ⁻¹	40 mgL ⁻¹
Arginin	-	-	50 gL ⁻¹	50 gL ⁻¹
Sukrosa (g)	30 gL ⁻¹	30 gL ⁻¹	30 gL ⁻¹	30 gL ⁻¹
PVP	-	-	300 mgL ⁻¹	300 mgL ⁻¹

Pembuatan media dilakukan sesuai dengan komposisi seperti yang tertera pada tabel 1. Volume pembuatan media induksi, proliferasi maupun regenerasi disesuaikan dengan kebutuhan. Masing masing botol kultur diisi dengan 25 ml media yang telah diaduk hingga komposisi media homogen dan diukur tingkat keasaman hingga 6,2. Pada media induksi ditambahkan pematat berupa bubuk agar sebanyak 5 gL⁻¹, kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121^oC dengan tekanan 17,5 psi selama 30 menit.

1. Persiapan Bahan Tanam (eksplan)

Bahan tanam yang digunakan pada penelitian ini menggunakan eksplan yang berasal dari pucuk daun menggulung dari tanaman tebu varietas buluh lawang. Sterilisasi bahan tanam berupa pucuk daun yang menggulung dari tanaman tebu adalah dengan cara menyemprot alkohol 70%, kemudian dimasukkan kedalam LAF (Laminar Air Flow) untuk kemudian dilakukan sterilisasi lanjutan. Sterilisasi dilakukan di dalam LAF meliputi pemberian alkohol 96% yang disemprotkan pada permukaan eksplan, kemudian dilakukan proses pembakaran permukaan eksplan yang sudah disemprot alkohol 96%. Pembakaran dilakukan secara cepat dan merata pada seluruh bagian eksplan terutama pada ujung ujung eksplan yang bersentuhan langsung dengan alat pemotong. Pengupasan eksplan dilakukan setelah proses pembakaran yaitu dengan cara daun dikelupas untuk diambil bagian terdalamnya sekitar 1-5 gulungan daun, dengan 2-3 mm panjang irisan dan 0,5 cm diameter eksplan.

2. Induksi Kalus

Proses induksi kalus dilakukan dengan cara menanam eksplan pada media induksi yang terdiri dari komposisi bahan (Tabel 1). Eksplan *spindle leaf* ditanam

pada media induksi selama 6 minggu diruang gelap dengan suhu ruang 23-25⁰C. Subkultur dilakukan setiap 3 minggu sekali. Indikator keberhasilan eksplan yang ditumbuhkan ada media induksi adalah terbentuknya kalus kalus embriogenik dengan ciri warna putih kekuningan dengan tekstur remah/vriable dan juga pada kalus terdapat bagian yang menonjol dan menandakan kalus terbentuk bersifat embrogenik. Selanjutnya kalus akan dipindah pada media proliferasi.

3. Proliferasi kalus (media padat)

Kalus kalus embrogenik hasil induksi untuk selanjutnya akan dikembangkan pada media proliferasi dengan tujuan untuk matangkan fase kalus embriogenik. Media tumbuh yang digunakan merupakan media MS dan untuk tahap proliferasi menggunakan hormon auksin (2,4-D) dengan konsentrasi 2 mgL⁻¹ dan dengan penambahan komponen lain yang menunjang proses proliferasi kalus seperti yang tertera pada tabel 1. Proliferasi kalus embriogenik bertujuan untuk memacu proses tahapan embrio berupa globular, skutelar, koleoptilar dan kotiledon pada tahapan embriogenesis. Proliferasi kalus dilakukan dengan mengambil kalus pada media induksi dan dipindahkan pada media proliferasi. Proliferasi kalus dilakukan selama 2 minggu dengan diletakkan pada kondisi gelap dan dan suhu ruang 23⁰-25⁰C dan 1 minggu ditempat terang untuk kemudian kalus yang dihasilkan telah membentuk spot hijau yang siap dipindahkan pada media cair yang sudah diberi perlakuan komposisi bahan untuk melakukan proses pemecahan kalus embriogenik hingga regenerasi.

4. Proliferasi Kalus (media cair)

Kalus yang dihasilkan setelah 3 minggu proliferasi padat dan sudah membentuk spot hijau kemudian dipindahkan pada media proliferasi cair. Pembuatan media disesuaikan dengan komposisi media yang sudah tertera pada tabel 1. Kalus embriogenik hasil proliferasi untuk selanjutnya akan dikembangkan pada media cari sebagai bahan kultur suspensi. Pengambilan kalus yang digunakan untuk dikembangkan pada media suspensi harus memiliki beberapa kriteria, yaitu pada kalus embriogenik yang sudah muncul spot hijau pada permukaan kalusnya. Kalus yang akan masuk pada media cair harus homogen yaitu ditimbang seberat 0,25 gram dan dimasukkan pada media cair sebanyak 25

ml pada erlenmeyer ukuran 100 ml. Media cair yang digunakan merupakan media MS tanpa pemberian agar dan dengan perlakuan komposisi bahan serta nutrisi yang berbeda. perlakuan komposisi zat pengatur tumbuh pada media regenerasi dengan menggunakan BAP (*6-Benzylaminopurine*) dan kinetin dengan perbandingan yang sudah tertera pada rancangan percobaan. Pada tahap proliferasi kalus dilakukan selama 3 minggu dengan perlakuan subkultur sebanyak 2 kali selang waktu 1 minggu. Sub kultur dilakukan dengan memipet dan menyaring larutan pada perlakuan sebelumnya untuk kemudian dipindahkan dengan komposisi bahan yang sama. Pada tahap proliferasi ini dilakukan dibawah penyinaran selama 16 jam perhari dan dilakukan pengojogan dengan kecepatan 100 rpm pada *shacker*.

5. Regenerasi Kalus hasil Suspensi

Kalus hasil suspensi pada media proliferasi cair kemudian dipindahkan pada media regenerasi. Media regenerasi yang digunakan adalah media cair dengan prinsip perendaman sesaat atau media cair statis. Pembuatan media regenerasi cair dilakukan dengan menambahkan komposisi bahan yang sudah tertera pada tabel 1. Media dimasukkan kedalam tabung yang sebelumnya sudah berisi kertas saring steril. Pemberian kertas saring bertujuan untuk menahan kalus agar dapat beregenerasi pada media cair tanpa terendam secara keseluruhan pada media cair. Regenerasi dilakukan hingga kalus dapat membentuk organ lengkap seperti tunas dan akar regenerasi kalus dilakukan selama 3 minggu pada kondisi terang.

3.5 Variabel Pengamatan

3.5.1 Tahap induksi dan proliferasi kalus

1. Morfologi kalus

Pengamatan morfologi kalus dapat diketahui selama proses induksi kalus. eksplan yang ditanam pada media induksi dilakukan pengamatan selama 2 minggu sekali untuk mengetahui perkebangkan kalus yang terbetuk dengan ciri kalus embriogenik. Pada proses proliferasi, morfologi kalus yang diamati yaitu meliputi tahap tahap perkembangan kalus embriogenik pada berbagai fase seperti globular, skutelar dan koleoptilar. Pengamatan morfologi kalus bertujuan selain

untuk mengetahui tahapan perkembangan kalus juga digunakan untuk menentukan tahapan kalus yang sesuai untuk dipindahkan pada media regenerasi

2. Warna Kalus

Kalus yang dihasilkan selama proses induksi dan proliferasi tentunya memiliki ciri-ciri tertentu dan akan dipilih kalus tertentu untuk dapat dilanjutkan pada tahap regenerasi. Kalus embriogenik dapat dihasilkan pada media tahap induksi dan proliferasi, dan untuk mengetahui kriteria kalus embriogenik dibutuhkan pengamatan warna. Parameter warna bertujuan untuk mengetahui kualitas kalus yang dihasilkan. Kalus embriogenik dicirikan dengan warna kalus putih hingga kekuningan dan mengkilat, kemudian bertekstur remah serta mudah dipisahkan. Beberapa ciri kalus yang tidak bersifat embriogenik dapat diketahui pula dengan melihat ciri warna kecoklatan, terlihat pucat dan bertekstur lembek.

3. Histologi Jaringan

Pengamatan histologi jaringan pada kalus dilakukan untuk memastikan kalus yang bersifat embriogenik. Pengamatan histologi jaringan dapat mengetahui ciri dan tahapan kalus selama pada media proliferasi dan juga pada pengamatan ini hanya dilakukan 1 kali histologi jaringan juga dilakukan pada kalus hasil suspensi. Histologi jaringan sebagai parameter pengamatan secara mikroskopis untuk mengetahui tahapan somatik embriogenesis. Jaringan yang akan diamati dengan difiksasi dengan FAA (Formaldehyde Acetic Acid Alcohol) selama 24 jam. Sampel yang telah difiksasi kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol absolute I, alkohol absolut II berturut-turut masing-masing 30 menit. Kemudian dealkoholisasi dilakukan dengan berturut-turut mencampurkan alkohol dan xylol dengan perbandingan 3:1, 1:1, 1:3 dan memasukkan dalam larutan xylol I selama 30 menit dan larutan xylol II selama semalam. Bahan tanam diinfiltrasi menggunakan parafin lunak dengan 3 kali pengulangan masing-masing 2 jam, kemudian dimalamkan. Kemudian bahan tanam ditanam didalam kotak kertas dengan parafin keras, penanaman dilakukan didalam oven. Selanjutnya menempelkan hasil penanaman pada holder kayu menggunakan parafin yang dicairkan di atas bunsen. Penempelan harus dilakukan dengan kuat agar tidak lepas ketika diiris.

Pengirisan dilakukan dengan rotary microtom dengan ketebalan 10 μm . Kemudian meletakkan irisan diatas gelas benda yang telah dicampuri gliserin dan ditambah putih telur. Hasil irisan berupa pita parafin yang ditempel pada gelas benda dan menempatkannya pada hot plate dengan temperatur 45⁰C hingga pita parafin merenggang. Irisan yang telah mengering diwarnai dengan menggunakan safarin 1% aquosa. Tahap terakhir irisan ditetesi dengan entelan terlebih dahulu kemudian ditutup dengan gelas menutup dan mengeringkan diatas hot plate dengan temperatur 45⁰C. Pengamatan jaringan dilakukan dalam preparat kaca dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x kemudian mengambil gambar.

3.5.2 Tahap proliferasi kalus menggunakan media cair (Kultur Suspensi)

1. Respon pertumbuhan hasil suspensi

Respon pertumbuhan hasil suspensi yang diamati meliputi beberapa paramater yaitu kualitas sel dan kalus hasil suspensi, munculnya koleoptil dan munculnya akar. Pengamatan kalus hasil suspensi dilakukan dengan cara menyaring kaus hasil suspensi kemudian dipindahkan pada petridisk untuk selanjutnya dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop untuk mengetahui kualitas kalus yang dihasilkan selama penggojogan. Pengamatan sel hasil suspensi dilakukan dengan cara memipet suspensi kemudian ditetaskan pada kaca preparat dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 x untuk mengetahui kualitas sel yang dihasilkan selama penggojogan.

2. Panjang dan jumlah Koleptil yang terbentuk

Panjang dan jumlah koleoptil yang terbentuk setelah diproliferasi menggunakan media cair merupakan parameter pertama yang diamati. Kriteria koleoptil terbentuk yang diamati adalah koleptil yang terbentuk sempurna yang memiliki bentuk panjang dan berwarna hijau. Jumlah koleoptil diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10-30x dan juga panjang koleoptil diukur menggunakan aplikasi LAS ES hasil dari pengamatan menggunakan mikroskop dengan skala ukur centimeter (cm).

3.5.3 Tahap regenerasi kalus hasil Suspensi

1. Jumlah Tunas

Tunas hasil regenerasi dapat dihitung setelah mencapai tinggi 1 cm dan terbentuk daun. Jumlah tunas yang terbentuk terus dilakukan pengamatan hingga pengamatan berakhir yaitu setelah eksplant berumur 3 minggu setelah tanam pada media cair yang diberi kertas saring

2. Tinggi Tunas

Pengukuran tinggi tanaman dilakukan dengan cara mengukur dari pangkal hingga ujung daun. Pengamatan tinggi tunas dilakukan pada akhir pengamatan, yaitu saat tanaman berumur 3 MST.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan data hasil pengamatan yang telah diperoleh dapat disimpulkan bahwa konsentrasi BAP (6-Benzylaminopurine) dan Kinetin terbaik untuk media kultur suspensi tanaman tebu adalah pada media F (BAP $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ + Kinetin $0,25 \text{ mgL}^{-1}$) dengan hasil penelitian jumlah koleoptil sebanyak 27 dan panjang koleoptil $0,663 \text{ cm}$, begitu pula pada hasil regenerasi menunjukkan bahwa koleoptil yang dihasilkan dengan jumlah tunas planlet tebu terbaik sebanyak 23,67.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan adalah untuk penelitian selanjutnya lebih dapat mengoptimalkan waktu kultur suspensi sel embriogenik hingga menjadi kalus embriogenik yang siap untuk diregenerasikan, dan juga pencegahan browning untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan dengan menambahkan beberapa konsentrasi bahan yang sesuai sehingga dapat meminimalisir terjadinya browning pada kalus yang dapat menghambat regenerasi kalus menjadi planlet.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, M.S., H.M El-Shabrawi, A.S Soliman and M.A Selim. 2018. Optimization of germination, callus induction, and cell suspension culture of African locust beans *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. *Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1): 191-201.
- Alcantara, G.B.D., R. Dibax, R.A.D Oliviera, J.C.B. Filho and E. Daros. 2014. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum spp.*) cultivars RB855156 and RB72454. *Acta Scientiarum*, 36(1): 63-72.
- Ali, A., S. Naz and J. Iqbal. 2007. Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane (*saccharum officinarum*). *Pak J. Bot*, 39(6): 1961-1977.
- Ardestani, N.K and M. Sharifi. 2015. Establishment of callus and cell suspension culture of *Scrophularia striata* Boiss.: an in vitro approach for acteoside production. *Cytotechnology*, 67(1): 475-485.
- Ascough, G.D and C.W Fennell. 2004. The regulation of plant growth and development in liquid culture. *Botany*, 70(2): 181-190.
- Cipriano, J.I.D., A.C.F Cruz, K.C Mancini, E.R Schmildt, J.C Lopes, W.C Otoni and R.S Alexandre. 2018. Somatic embryogenesis in *Carica papaya* as affected by auxins and explants, and morphoanatomical-related aspects. *An Acad Bras Cienc*, 90(1): 385-400.
- Celiktas, O.Y., A. Gurel and F.V Sukan. 2010. Large Scale Cultivation Of Plant Cell And Tissue Culture In Bioreactors. *Transworld Research Network*, 73(2): 1-54.
- Damayanti, T.A., L.K Putra and Giyanto. 2010. Hot Water Treatment of Cutting-Cane Infected with *Sugarcane Streak Mosaic Virus* (Scsmv). *ISSAAS*, 16(2): 17-25.
- Dwimahyani, I. 2007. Metode Suspensi Sel Untuk Membentuk Spot Hijau Pada Kultur In-Vitro Galur Mutan Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha Curcas L.*). *Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*, 3(2): 55-80.
- Erturk, H and Walker. 2001. Effects Of Rooting Period, Clump Size, And Growth Medium On Sugarcane Plantlets In Micropropagation During And After Transformation To Photoautotrophy. *American Society of Agricultural Engineers*, 43(2): 499-504.

- Fiah, R.L., Taryono dan Toekidjo. 2014. Kemampuan Regenerasi Kalus Empat Klon Tebu (*Saccharum Officinarum L.*) *Callus Regeneration Of Four Sugarcane (Saccharum Officinarum L.) Clone. Vegetalika*, 3(1): 91-101.
- Gill, N.K., R. Gill and S.S Gosal. 2004. Factor enhancing somatic embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum L.*). *Biotechnology*, 3(1): 119-123.
- Haridas, B.A and G.S Ashok. 2017. Standardization of in-vitro callus induction and regeneration protocol for mature embryo of proso millet (*Panicum Miliaceum L.*). *Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4): 2153-2163.
- Hendaryono, D.P.S dan A. Wijayani. 1994. *Kultur Jaringan Tanaman*. Yogyakarta : Kanisius.
- Ho, W.J and 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*, 118(1): 169-180.
- Hutami, S. 2009. Tinjauan Penggunaan Suspensi Sel Dalam Kultur *In Vitro*. *AgroBiogen*, 5(2): 84-92.
- Ijaz, S., L.A Rana, I.A Khan and M. Saleem. 2012. Establishment of an *in vitro* regeneration system for genetic transformation of selected sugarcane genotypes. *Genetic and Molecular Research*, 11(1): 512-530.
- Indarti, D dan R.K Putra. 2016. *Outlook Tebu*. Jakarta : Pusat data dan Sistem Informasi Pertanian.
- Iqbal, M., A. Ali, N.H Naveed, U.A Khan, N.M.A Faz, M. Imran, D. Ashfaq and M. Hussain. 2016. Effect of explant and growth regulator on the expression of callogenesis, somatic embriogenesis and plantlets formation in sugarcane (*Saccharum Officinarum L.*). *Biosciences*, 9(4): 147-156
- Jalil, M., N. Khalid and R.Y Othman. 2003. Plant Regeneration form embriogenic suspension cultures of *Musa acuminata cv. Mas (AA)*. *Plant cell Tissue and organ culture*, 75(1): 209-214.
- Karami, O and P.O Ahmadi. 2008. Morphology, Hisology and Protein Pattern in Embriogenic and Non-Embriogenik callus of Carnation. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 1(1): 1-2.
- Khatoon, N., B. Naqvi, G. Abbas and F. Ahmed. 2018. Optimization of the protocol for initiation, multiplication and acclimatization of sugarcane variety US-633. *Advance Research*, 4(1): 63-65.

- Lawyer, F.E., Z.O Jamaledine, P.T Lyam, I.T Borokini, A.A.A Adedeji and A.U Okere. 2014. Phytohormones Influence on the In-Vitro Regeneration of *Saccharum Officinarum* L. from Apical Meristem Culture. *Biology and Life Science*, 5(2): 85-95.
- Malik, S.I., H. Rashid, T. Yasmin and N.M Minhas. 2003. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid on Callus Induction from Mature Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seeds. *Agriculture and Biology*, 6(1): 156-159.
- Mallikarjuna, S.J., M.H. Kumar, P. Sudhakar and D.M. Reddy. 2018. Regeneration of sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.) Clones from mutagenic Treated Calli. *Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(6): 1420-1432.
- Manuhara, Y.S.W. 2014. *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Surabaya : Airlangga University Press
- Mark, J.L. 1991. *Revolusi Bioteknologi*. Jakarta : Yayasan Obor Indonesia.
- Minarsih, H., D. Subiyarti, I. Riyadi, S.M. Putra dan L. Ambarsari. 2015. Evaluasi varietas, sumber eksplan dan strain *Agrobacterium* terhadap keberhasilan transformasi tebu dengan gen *P5CS*. *Menara Perkebunan*, 83(1): 1-9.
- Minarsih, H., I. Riyadi, Sumaryono dan A. Budiani. 2013. Mikropropagasi Tebu (*Saccharum Officinarum*. L) Menggunakan Sistem Perendaman Sesaat. *Menara Perkebunan*, 81(1): 1-8.
- Nasir, M. 2002. *BIOTEKNOLOGI : Potensi dan Keberhasilannya dalam Bidang Pertanian*. Jakarta : RajaGrafindo Persada.
- Nugroho, A dan H. Sugito. 2000. *Pedoman Pelaksanaan Teknik Kultur Jaringan*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Oropeza, M., A.K Marcano and E.D Garcia. 2001. Proteins Related With Embryogenic Potential In Callus And Cell Suspensions Of Sugarcane (*Saccharum Sp.*). *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 37(1): 211-216.
- Padua, M.S., C.D Lima, L.V Paiva, D. Barduche, B.R Santos and V.C Stein. 2015. Histological and ultrastructural analysis of the Banana cv. Prata-Anã embryogenic calluses and cell suspension. *Amazonian*, 58(2): 168-175.
- Patel, V.S., R. Mehta, K.H. Naik, D. Singh, D.U Patel and S.C Mali. 2015. Callus induction & whole plant regeneration in sugarcane (*Saccharum* spp. complex) variety CO 86032. *Green Farming*, 6(5): 1-6.

- Pour, M.Z., P. Azadi, A. Majd, M.J Kermani and S. Irian. 2015. Effect of stress factors on somatic embriogenesis of rose. *Biosciences*, 6(2): 255-265.
- Purwito, A., R. Ravenska dan A. Maharijaya. 2016. Regenerasi Tanaman dari Kalus Tebu yang Diiradiasi Sinar Gamma pada Medium dengan PEG 6000. *Agron Indonesia*, 44(3): 322-328.
- Ru, Z., Y. Lai, C. Xui and L. Li. 2013. Polyphenol Oxidase (PPO) in Early Stage of Browning of *Phalaenopsis* Leaf Explants. *Agricultural Science*, 5(9): 57-65.
- Sajid, Z.A and F. Aftab. 2016. An Efficient Method For The Establishment Of Cell Suspension Cultures In Potato (*Solanum Tuberosum* L.). *Botany*, 48(5): 1993-1997.
- Shafey, N.M.E., E.S. Ahmed, M. Sayed, O. Hammouda and S.A. Khodary. 2016. Effect of Growth Regulators, Carbohydrates and Antioxidant Compound on Biomass, Flavonoid Accumulation and Enzyme Activity in Callus Cultures of *Rumex vesicarius* L. *Egypt J. Bot*, 56(3): 595-612.
- Sholeha, W., B. Sugiharto, D. Setyati dan P. Dewanti. 2015. Induksi Embriogenesis Somatik Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Dan Kinetin Pada Eksplan Gulungan Daun Muda Tanaman Tebu. *Ilmu Dasar*, 16(1):17-22.
- Strosse, H., R. Domergue, B. Panis, J.V Escalant and F. Cote. 2003. *Banana and Plantain Embriogenic Cell Suspensions*. Rome : International Plant Genetic Resource Institute.
- Sukmadjaja, D dan A. Mulyana. 2011. Regenerasi Dan Pertumbuhan Beberapa Varietas Tebu (*Saccharum Officinarum* L.) Secara *In Vitro*. *AgroBiogen*. 7(2): 106-118.
- Sumaryono dan I. Riyadi. 2005. Pertumbuhan biak kalus dan suspensi sel tanaman kina (*Cinchona ledgeriana* Moens). *Menara Perkebunan*, 73(1): 1-11.
- Suthar, R.S and Dr.K.R Shah. 2015. Optimization Of Callus And Cell Suspension Culture Of Capsicum Annum L. *Pharma and Bio Sciences*, 6(4): 664-671.
- Thomas, A.N.S. 1992. *Tanaman Obat Tradisional*. Yogyakarta : Kanisius.
- Tiel, K., G.A Enriquez, Y. Ceballo, N. Soto, A.D Fuentes, A. Ferreira, Y. Coll and M. Pujol. 2014. *Development Of A System For Rapid Plant Regeneration From In Vitro Sugarcane (Saccharum Officinarum L.) Meristematic Tissue*. *Biotechnology Aplicada*, 23(1): 23-26.

- Tolera, B., M. Diro and D. Belew. 2014. Effects of Gibberellic Acid and Kinetin on *In Vitro* Aseptic Shoot Tip Culture Establishment of Sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.) Varieties Grown In Ethiopian Sugar Estates. *Sciences*, 16(1): 496-504.
- Widuri, L.I., P. Dewanti dan B. Sugiharto. 2016. A Simple Protocol for Somatic Embriogenesis Induction of in vitro Sugarcane (*Saccharum Officinarum*. L.) by 2,4 D and BAP. *Biological Research*, 2(1): 1-9.
- Zivattieri, M.A., A.M Frederico, M. Lima, R. Sabino and B.A Schmitt. 2010. Induction Of Somatic Embryogenesis As An Example Of Stress-Related Plant Reactions. *Biotechnology*, 13(1): 1-9.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta : PT. Bumi Aksara.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi media MS

STOK	Senyawa Kimia	Gram	Dilarutkan dalam (ml)	Pengambilan
A	NH ₄ NO ₃	82,5	1000	20 ml
B	KNO ₃	95	1000	20 ml
C	CaCl ₂ .2H ₂ O	22	250	5 ml
D	H ₃ BO ₃	0,31	250	5 ml
	KH ₂ PO ₄	8,50		
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0013		
	Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,0125		
	KI	0,0415		
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	18,5	250	5 ml
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,43		
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0013		
	MnSO ₄ .7H ₂ O	0,7525		
F	Na ₂ .EDTA	1,86	250	5 ml
	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39		
Vitamin	Myo-inositol	0,02	100	5 ml
	Pyridoxine-HCl	0,008	100	
	Thiamin-HCl	0,08		
Karbon	Sukrosa	-	-	30 g/l
Agar	Agar	-	-	11 g/l

Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian



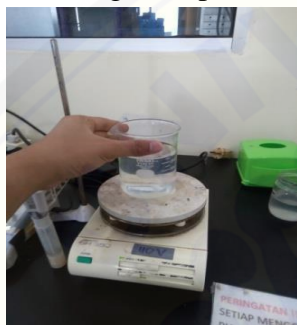
Pengambilan tebu BL sebagai eksplan



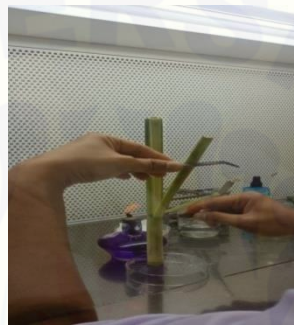
Pemotongan Ekplan sebelum sterilisasi



Pembuatan media Kultur Jaringan



Pengadukan dan pengukuran pH media



Sterilisasi eksplant (spindle leaf)



Pemotongan ekplan sebelum induksi



Penimbangan kalus sebelum kultur suspensi



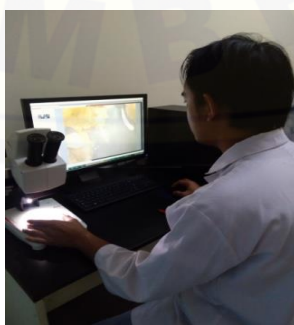
Memasukkan kalus kedalam media cair



Perlakuan Kultur suspensi



Penggojogan kalus menggunakan orbital shaker (100 rpm)

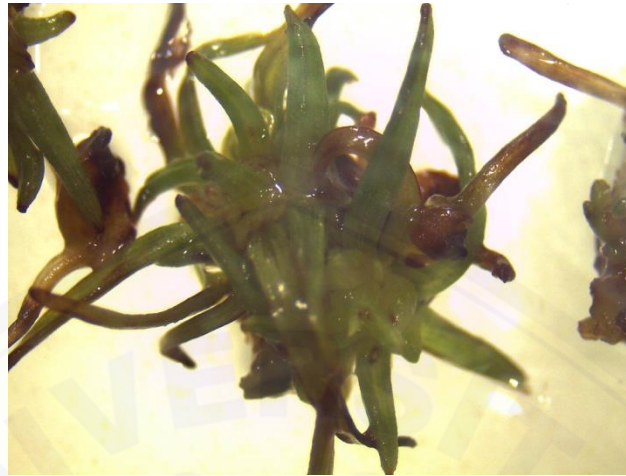


Pengamatan menggunakan mikroskop

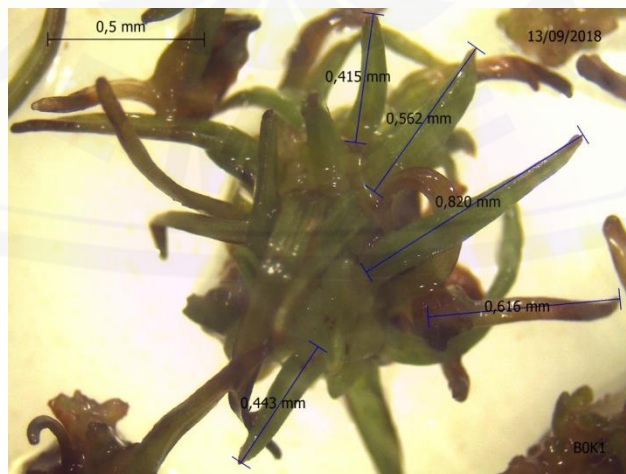
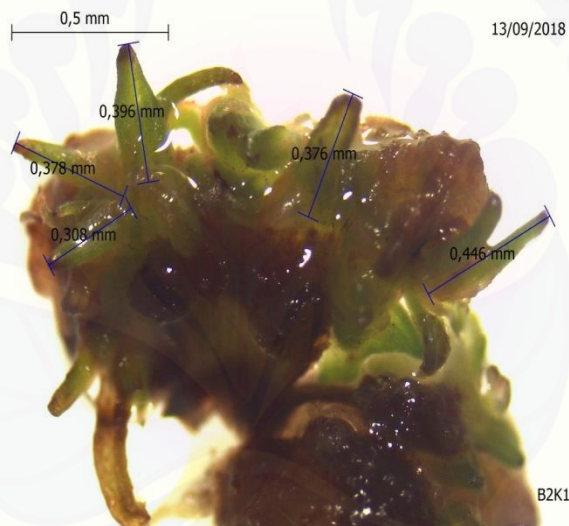


Pengukuran tinggi tunas

Lampiran 3. Perhitungan jumlah dan panjang Koleoptil Menggunakan Aplikasi LAS EZ



Sebelum menggunakan aplikasi LAS ES



Setelah menggunakan aplikasi LAS ES

Lampiran 4. Data rata rata Jumlah Koleoptil

1. Jumlah Koleoptil

No	Perlakuan	Jumlah Koleoptil			Rata Rata	Standart Deviasi
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1	A (B0K0)	9	6	5	6.66667	2.08
2	B (B1K0)	16	14	17	15.6667	1.53
3	C (B2K0)	26	24	21	23.6667	2.52
4	D (B0K1)	26	22	25	24.3333	2.08
5	E (B0K2)	13	20	15	16	3.61
6	F (B1K1)	24	27	30	27	3
7	G (B1K2)	0	0	0	0	0
8	H (B2K1)	16	15	11	14	2.65
9	I (B2K2)	22	20	24	22	2

Lampiran 5. Data Rata rata Panjang Koleoptil

2. Panjang Koleoptil

No	Perlakuan	Ulangan 1			Rata rata
		1	A (B0K0)	0.152	
2	B (B1K0)	0.348	0.282	0.315	0.3048
3	C (B2K0)	0.596	0.693	0.211	0.5388
4	D (B0K1)	0.415	0.616	0.719	0.6264
5	E (B0K2)	0.623	0.193	0.472	0.4522
6	F (B1K1)	0.832	1.166	0.359	0.7252
7	G (B1K2)	0	0	0	0
8	H (B2K1)	0.308	0.376	0.446	0.3808
9	I (B2K2)	0.384	0.307	0.154	0.4236

Panjang Koleoptil					
Ulangan 2					Rata rata
0.156	0.23	0.251	0.232	0.24	0.2218
0.373	0.394	0.339	0.23	0.174	0.302
0.625	0.445	0.532	0.685	0.363	0.53
0.79	0.691	0.846	0.443	0.596	0.6732
0.581	0.399	0.38	0.53	0.284	0.4348
0.395	0.849	0.791	0.761	0.356	0.6304
0	0	0	0	0	0
0.286	0.406	0.246	0.281	0.247	0.2932
0.319	0.509	0.226	0.854	0.279	0.4374

Ulangan 3					Rata rata	Rata Rata	Standart Deviasi
0.326	0.373	0.183	0.156	0.23	0.2536	0.237067	0.01594
0.422	0.279	0.216	0.188	0.324	0.2858	0.297533	0.01026
0.318	0.495	0.594	0.499	0.476	0.4764	0.515067	0.03377
0.331	0.321	0.731	1.458	0.398	0.6478	0.649133	0.02343
0.307	0.316	0.412	0.437	0.346	0.3636	0.416867	0.04694
0.823	0.58	0.979	0.546	0.238	0.6332	0.662933	0.05394
0	0	0	0	0	0	0	0
0.234	0.263	0.315	0.336	0.439	0.3174	0.330467	0.04524
0.288	0.358	0.362	0.307	0.313	0.3256	0.395533	0.06096

Lampiran 6. Data Rata rata Jumlah Tunas

No	Perlakuan	Jumlah Tunas			Rata Rata	Standart Deviasi
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1	A (B0K0)	6	7	4	5.66667	1.52753
2	B (B1K0)	11	15	17	14.33333	3.05505
3	C (B2K0)	20	21	25	22	2.64575
4	D (B0K1)	24	18	21	21	3
5	E (B0K2)	15	16	20	17	2.64575
6	F (B1K1)	23	21	27	23.66667	3.05505
7	G (B1K2)	0	0	0	0	0
8	H (B2K1)	11	13	16	13.33333	2.51661
9	I (B2K2)	23	20	22	21.66667	1.52753

Lampiran 7. Data Rata rata tinggi tunas

No	Perlakuan	Tinggi Tunas			Rata Rata	Standart Deviasi
		Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3		
1	A (B0K0)	4	4.5	3.9	4.13333	0.32146
2	B (B1K)	6.4	7.6	6.4	6.8	0.69282
3	C (B2K0)	7.5	6.5	7.2	7.06667	0.51316
4	D (B0K1)	7.3	5.7	6.3	6.43333	0.80829
5	E (B0K2)	7	6.2	7.1	6.76667	0.49329
6	F (B1K1)	6.5	7.9	7.2	7.2	0.7
7	G (B1K2)	0	0	0	0	0
8	H (B2K1)	7.5	6.8	6.5	6.93333	0.51316
9	I (B2K2)	9.4	7.8	8.7	8.63333	0.80208