



**REGENERASI PLANLET TEBU (*Saccharum officinarum* L.) SUT EVENT 02  
DAN PS 881 DENGAN PEMBERIAN 2,4-D DAN BAP MELALUI SOMATIK  
EMBRIOGENESIS**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**LAILY ILMAN WIDURI  
NIM 101510501042**

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



**REGENERASI PLANLET TEBU (*Saccharum officinarum* L.) SUT EVENT 02  
DAN PS 881 DENGAN PEMBERIAN 2,4-D DAN BAP MELALUI SOMATIK  
EMBRIOGENESIS**

**SKRIPSI**

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

**Oleh:**

**LAILY ILMAN WIDURI  
NIM 101510501042**

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

## PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang, saya persembahkan skripsi ini dengan penuh cinta kepada:

1. Bapak Sugiarto dan Ibunda Rusmi, terima kasih atas semua pengorbanan, cinta, kasih sayang, dan doa sepanjang masa yang tak mungkin terbalaskan dengan apapun, serta adinda Rizky Falah Sari yang senantiasa memberikan semangat dan motivasi, semoga Allah senantiasa merahmati kalian.
2. Alm. Kakek Soekarno dan Almh. Nenek Siti Kalimah yang banyak berjasa, semoga Allah berkenan melimpahkan kelapangan dan karuniaNya hingga di akhirat kelak.
3. Keluarga besar di Kota Kediri tak luput memberikan dukungan dan doa selama ini.
4. Sahabat – sahabat yang selalu menemani, membantu, dan berjuang dalam suka dan duka.
5. Semua bapak dan ibu guru dari Taman Kanak – Kanak hingga Perguruan Tinggi yang telah mendidik dan memberikan ilmunya.
6. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.

**MOTTO**

“Cukuplah Allah menjadi penolong kami dan Allah adalah sebaik-baik pelindung”  
(QS. Ali ‘Imron: 173)\*)



---

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

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Laily Ilman Widuri

NIM : 101510501042

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “**Regenerasi Planlet Tebu (*Saccharum officinarum* L.) SUT Event 02 dan PS 881 dengan Pemberian 2,4-D dan BAP Melalui Somatik Embriogenesis**” adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali jika pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada instansi manapun serta bukan jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isi sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 April 2015

Yang menyatakan,

Laily Ilman Widuri  
NIM. 10151050142

**SKRIPSI**

**REGENERASI PLANLET TEBU (*Saccharum officinarum* L.) SUT EVENT 02  
DAN PS 881 DENGAN PEMBERIAN 2,4-D DAN BAP MELALUI SOMATIK  
EMBRIOGENESIS**

Oleh

**LAILY ILMAN WIDURI**  
NIM 101510501042

**Pembimbing :**

Pembimbing Utama : Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP  
NIP.196504251990022002

Pembimbing Anggota : Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D  
NIP. 196005061987021001

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “ **Regenerasi Planlet tebu (*Saccharum officinarum* L.) SUT Event 02 dan PS 881 dengan Pemberian 2,4-D dan BAP Melalui Somatik Embriogenesis**”, telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian pada :

Hari : Kamis  
Tanggal : 30 April 2015  
Tempat : Ruang Sidang Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

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

Dosen Pembimbing Anggota,

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

Dosen Penguji,

Dr. Ir. Sholeh Avivi, M.Si  
NIP. 196907212000121002

Mengesahkan  
Dekan,

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

RINGKASAN

**“Regenerasi Planlet tebu (*Saccharum officinarum* L.) SUT *Event 02* dan PS 881 dengan Pemberian 2,4-D dan BAP Melalui Somatik Embriogenesis**”, Laily Ilman Widuri, 101510501042; 2015; Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman penghasil gula yang utama sehingga perlu ditingkatkan kualitas dan kuantitasnya. Upaya peningkatan kualitas dan kuantitas tebu diantaranya dengan perbanyak bibit yang sehat dalam skala besar secara kultur jaringan melalui somatik embriogenesis. Pembentukan somatik embrio yang optimal dipengaruhi oleh pemberian jenis zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi yang tepat.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium CDAST Universitas Jember dari bulan September 2014 sampai Februari 2015. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pengaruh 2,4-D tunggal dan kombinasi 2,4-D dan BAP terhadap induksi kalus tebu serta mengetahui hasil regenerasi terbaik pada tebu SUT *Event 02* dan PS 881 melalui somatik embriogenesis. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dan dilanjutkan uji kontras orthogonal terhadap parameter induksi kalus dengan faktor pertama dua macam varietas tebu dan faktor kedua yakni lima formulasi media induksi yang berbeda.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian 2,4-D tunggal dengan konsentrasi  $3 \text{ mgL}^{-1}$  dan  $4,5 \text{ mgL}^{-1}$  memberikan respon induksi kalus paling baik pada tebu SUT *Event 02* maupun PS 881. Hasil tahapan proliferasi setelah 2 minggu masa inkubasi didapatkan hasil adanya tahapan – tahapan SE yang terbentuk dari kedua tebu baik SUT *Event 02* maupun PS 881. Pemberian 2,4-D tunggal dengan konsentrasi  $3 \text{ mgL}^{-1}$  memberikan hasil terbaik untuk regenerasi planlet tebu SUT *Event 02* sedangkan pemberian kombinasi 2,4-D  $3 \text{ mgL}^{-1}$  + BAP  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  memberikan hasil terbaik untuk regenerasi planlet tebu varietas PS 881.

Kata kunci : *Induksi kalus, proliferasi, regenerasi, zat pengatur tumbuh*

## SUMMARY

**“Regeneration of Plantlets Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) SUT *Event 02* and PS 881 with the Addition of 2,4-D and BAP Through Somatic Embryogenesis”**, Laily Ilman Widuri, 101510501042; 2015; Agrotechnology Departement, Agriculture Faculty of Jember University.

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is the one of energy source for producing sugar. Due to its importance, the quality and quantity of sugarcane needs to be improved by producing healthy seed propagation in large scale using tissue culture techniques through somatic embryogenesis. The formation of somatic embryos influenced by the type of plant growth regulators (PGR) at appropriate concentration.

This research was conducted at the CDAST Laboratory University of Jember, started from September 2014 - February 2015. The aim of this study were to compare the effect of 2,4-D alone and the combination of 2,4-D and BAP on sugarcane callus induction and to know the best regeneration results in SUT *Event 02* and PS 881 variety through somatic embryogenesis. Research using completely randomized design (CRD) factorial and orthogonal contrast test on callus induction parameters with the first factor are two kinds of sugarcane varieties or genotype and the second factor are five different formulation induction mediums.

The results showed that the best respond of callus induction were obtained on medium containing 2,4-D alone at concentration 3 mgL<sup>-1</sup> and 4,5 mgL<sup>-1</sup> in both SUT *Event 02* and PS 881 variety. The results of the proliferation stage after 2 weeks of incubation showed the existence of stages SE formed from both cane either SUT *Event 02* and PS 881. The best regeneration of plantlets SUT *Event 02* were produced from medium containing 2,4-D alone at concentration 3 mgL<sup>-1</sup> whereas the best regeneration of plantlets PS 881 variety were produced from combination 2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mg L<sup>-1</sup>.

Key words : *Callus induction, proliferation, regeneration, plant growth regulator*

## PRAKATA

Puji syukur penulis kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan ridhonya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi yang berjudul “Regenerasi Planlet Tebu (*Saccharum officinarum* L.) SUT *Event 02* dan PS 881 dengan Pemberian 2,4-D dan BAP Melalui Somatik Embriogenesis” sebagai syarat untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pertanian.

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

1. Dr. Ir. Jani Januar, MT selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
2. Ir. Hari Purnomo, MSi., Ph.D., DIC selaku Ketua Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
3. Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP selaku Dosen Pembimbing Utama, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, ilmu, pengalaman, dukungan penuh, serta masukan dalam penyelesaian skripsi ini
4. Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Anggota dan Dr. Ir. Sholeh Avivi, M.Si sebagai dosen penguji yang senantiasa sabar memberikan bimbingan, saran dan masukan, bagi penulis.
5. Prof. Dr. Ir. Suharto, M.Sc selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan pengarahan dan arahan penulis selama masa perkuliahan.
6. Ir. Raden Soedrajad, MT selaku Ketua Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember
7. Ibunda Rusmi dan Ayahanda Sugiarto yang penulis hormati, serta adinda Rizkya Falah Sari yang penulis sayangi. Terima kasih tiada tara penulis ucapkan atas dukungan moril maupun materi yang diberikan dari awal sampai akhir. Penulis juga mempersembahkan karya tulis ini kepada keluarga besar di Kota Kediri.
8. Prof. Bambang Sugiharto selaku Kepala Laboratorium CDAST yang telah memberikan kesempatan dan tempat belajar sekaligus penelitian beserta teman - teman SUGAR GROUP, Phage Team dan Melinjo Group, seluruh dosen dan staff yang banyak membantu untuk menyelesaikan skripsi ini.

9. Teman – teman Agroteknologi 2010, “ASPG” kelas A, Keluarga F-SIAP, Rekan Asisten Laboratorium Hortikultura dan Horti Club Faperta Universitas Jember.
10. Pihak – pihak yang banyak membantu dari staff dari Litbang PTPN XI, teman dan kakak tingkat di Program Studi Magister Agronomi UNEJ, senior-senior di Gyeongsang National University (GNU) Jinju, dan pihak – pihak yang tidak dapat penulis sebut satu persatu.

Jember, 30 April 2015

Penulis

DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	v
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>SUMMARY</b> .....	ix
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1 Tanaman tebu ( <i>Saccharum officinarum</i> L.).....	5
2.2 Pengadaan bibit tanaman tebu unggul ( <i>Saccharum officinarum</i> L.) ..	6
2.3 Somatik embriogenesis tanaman tebu .....	6
2.4 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) .....	10
2.5 Hipotesis .....	12
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	13
3.1 Lokasi dan Waktu Percobaan .....	13
3.2 Bahan dan Peralatan .....	13
3.3 Rancangan Percobaan.....	13
3.4 Pelaksanaan Percobaan.....	14

3.4.1 Pembuatan Media .....	14
3.4.2 Persiapan Eksplan.....	14
3.4.3 Induksi Kalus .....	15
3.4.4 Proliferasi Kalus .....	15
3.4.5 Regenerasi Somatik Embrio .....	16
3.5 Parameter Pengamatan .....	16
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>17</b>
4.1 Hasil Penelitian.....	17
4.2 Pembahasan .....	21
4.2.1 Induksi Kalus .....	22
4.2.2 Proliferasi Kalus .....	28
4.2.3 Regenerasi Planlet .....	33
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>36</b>
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran .....	36
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>37</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>42</b>

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1	Perbandingan metode perbanyakan melalui organogenesis tidak langsung dan somatik embriogenesis pada tanaman tebu .....	10
2.	Komposisi media induksi kalus, proliferasi kalus, dan regenerasi embrio somatik.....	14
3.	Hasil analisis ragam pada parameter waktu induksi kalus dan persentase induksi kalus.....	17
4.	Hasil analisis kontras orthogonal pada waktu induksi kalus dan persentase induksi kalus .....	18
5.	Waktu pembentukan tunas, jumlah planlet, dan tinggi planlet hasil regenerasi tebu SUT <i>Event 02</i> dan PS 881 .....	20
6.	Tahapan regenerasi tebu SUT <i>Event 02</i> dan PS 881.....	22

**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1.	Kalus tebu embriogenik dan kalus tebu non embriogenik .....	8
2.	Histologi kalus tebu non embriogenik dan embriogenik.....	8
3.	Histologi morfologi tahapan – tahapan somatik embriogenesis pada tanaman tebu .....	9
4.	Struktur kimia 2,4-D dan BAP.....	11
5.	Waktu induksi kalus tebu SUT <i>Event 02</i> dan PS 881 pada lima macam komposisi media yang berbeda.....	18
6.	Persentase induksi kalus tebu SUT <i>Event 02</i> dan PS 881 pada lima macam komposisi media yang berbeda .....	19
7.	Induksi kalus tebu SUT <i>Event 02</i> pada 5 macam media yang berbeda pada 3 MST.....	23
8.	Induksi kalus tebu PS 881 pada 5 macam media yang berbeda pada 3 minggu setelah tanam .....	23
9.	Morfologi kalus tebu SUT <i>Event 02</i> .....	26
10.	Morfologi kalus tebu PS 881.....	26
11.	Morfologi kalus tebu SUT <i>Event 02</i> embriogenik dan non embriogenik.....	30
12.	Morfologi kalus tebu PS 881 embriogenik dan non embriogenik....	30
13.	Morfologi tahapan – tahapan somatik embriogenesis tebu SUT <i>Event 02</i> .....	31
14.	Morfologi tahapan – tahapan somatik embriogenesis tebu PS 881 .....	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
1.	Dokumentasi bahan percobaan dan kegiatan penelitian .....	42
2.	Stok Media MS.....	43
3.	Data waktu induksi kalus.....	44
4.	Data persentase induksi kalus .....	46
5.	Data waktu induksi tunas, jumlah planlet, dan tinggi planlet hasil induksi MS0 umur 5-6 minggu melalui organogenesis.....	48
6.	Data waktu pembentukan tunas hasil regenerasi.....	49
7.	Data jumlah planlet hasil regenerasi.....	49
8.	Data tinggi planlet hasil regenerasi .....	49
9.	Deskripsi varietas PS881 .....	50
10.	Deskripsi tebu SUT <i>Event 02</i> .....	53



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan salah satu tanaman perkebunan komersial bernilai ekonomi tinggi. Tanaman penghasil gula utama ini telah banyak dibudidayakan di seluruh dunia terutama di negara – negara tropis diantaranya Indonesia. Posisi geografis Indonesia di kawasan khatulistiwa pada dasarnya sangat menguntungkan untuk pengembangan budidaya tanaman tebu, didukung dengan agroekosistem, luas lahan dan juga tenaga kerja.

Tanaman tebu memiliki prospek yang cerah untuk dikembangkan karena tanaman ini tidak hanya diolah untuk menghasilkan gula, tapi juga dimanfaatkan sebagai bahan baku berbagai industri baik kimia, farmasi, pupuk, dan lain – lain. Namun, pesatnya perkembangan tanaman tersebut masih belum diimbangi dengan peningkatan produksi tebu (Departemen Perindustrian, 2009).

Menurut Indrawanto dkk., (2010) potensi produksi tebu di Indonesia masih belum maksimal. Rata – rata produktivitas tebu pada lahan sawah masih sekitar 95 ton/ha dan pada lahan tegal sekitar 75 ton/ha dengan rendemen berkisar 7,3 – 7,5% padahal potensi yang bisa dicapai dapat diatas 100 ton/ha untuk pertanaman di lahan sawah dan 90 ton/ha untuk pertanaman di lahan tegalan dengan rendemen diatas 10%. Salah satu kendala masih belum maksimalnya produksi tebu dan rendemen gula di Indonesia diantaranya kurangnya stok penyediaan bibit yang berkualitas dalam jumlah besar (Puslitbangun, 2012).

Peningkatan produktivitas tebu yang maksimal salah satunya dilakukan melalui upaya perbanyak bibit yang sehat dalam skala besar yakni melalui kultur jaringan. Kultur jaringan tanaman menjadi metode alternatif yang banyak digunakan karena efisiensi waktu, tenaga, dan hasil yang didapatkan dibandingkan metode konvensional. Metode kultur *in vitro* ini juga banyak dikembangkan untuk produksi bibit tebu dalam kuantitas yang besar dan kualitas yang tinggi.

Beberapa varietas tebu yang sangat berpotensi dikembangkan untuk produksi bibit tebu dalam kuantitas besar dan kualitas yang tinggi diantaranya tebu SUT *Event 02* dan PS 881. Tebu SUT *Event 02* merupakan tebu rekayasa genetika dari varietas

Bulu Lawang yang telah dioverekspresi gen *SoSUT1* (Sugiharto and Safitri, 2011) sehingga diharapkan dapat berproduksi tinggi dan mampu menghasilkan rendemen yang tinggi saat panen sedangkan varietas PS 881 merupakan tebu yang memiliki potensi rendemen tinggi dengan kategori kemasakan awal giling, pertumbuhan cepat, dan secara nyata memiliki tingkat kemasakan lebih cepat dari pada PS 851, dan sedikit lebih awal dari PS 862 (P3GI, 2008). Kedua tebu ini perlu dikembangkan dan diperbanyak secara *in vitro* untuk mendapatkan bibit tebu yang berkualitas.

Bibit tebu berkualitas didapatkan dari tebu yang sehat dalam artian tidak mengandung penyakit dari golongan virus salah satunya yaitu *sugarcane mosaik virus* (SCMV) yang dapat menurunkan produksi tebu. Hasil studi sebelumnya telah dilakukan penelitian mengenai eliminasi virus SCMV secara *in vitro* pada tebu SUT *Event 02* dan varietas PS 881 melalui kemoterapi menggunakan senyawa antiviral dan terbukti positif bebas virus. Planlet tebu yang telah positif bebas virus dapat dijadikan bibit unggul yang berkualitas sehingga perlu diperbanyak dalam skala besar.

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

Regenerasi tanaman tebu bebas virus secara *in vitro* melalui teknik somatik embriogenesis (SE) sangat dipengaruhi dengan penambahan zat pengatur tumbuh. Pemberian jenis zat pengatur tumbuh dapat mengoptimalkan hasil pembentukan somatik embrio apabila diberikan dengan konsentrasi yang tepat. Penelitian regenerasi planlet tebu SUT *Event 02* dan PS 881 melalui somatik embriogenesis dengan pemberian beberapa kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP ini diharapkan dapat menjadi metode alternatif perbanyakan bibit tebu bebas virus yang efektif guna mendukung upaya peningkatan kuantitas dan kualitas produksi tanaman tebu.

## 1.2 Rumusan Masalah

Peningkatan kuantitas tebu secara kultur *in vitro* melalui perbanyakan bibit tebu secara somatik embriogenesis dipengaruhi oleh variasi komposisi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tepat dan macam varietas. Pemberian ZPT 2,4-D dan BAP memberikan respon yang berbeda – beda terhadap induksi kalus tanaman tebu. Oleh karena itu dibutuhkan konsentrasi ZPT 2,4-D maupun kombinasi 2,4-D dan BAP yang tepat untuk menghasilkan regenerasi pada planlet tebu SUT *Event* 02 dan PS 881 melalui somatik embriogenesis.

## 1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

### 1.3.1 Tujuan

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk :

1. Membandingkan pengaruh 2,4-D tunggal dan kombinasi 2,4-D dan BAP terhadap induksi kalus tebu SUT *Event* 02 dan PS 881 melalui somatik embriogenesis.
2. Mengetahui perbedaan pengaruh 2,4-D tunggal dan kombinasi 2,4-D dan BAP terhadap hasil regenerasi pada tebu SUT *Event* 02 dan PS 881 melalui somatik embriogenesis.

### 1.3.2 Manfaat

1. Penelitian ini dapat memberikan informasi bagi peneliti lain tentang protokol regenerasi planlet tanaman tebu SUT *Event* 02 dan PS 881 melalui penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kombinasi 2,4-D dan BAP dengan konsentrasi yang tepat.
2. Hasil penelitian ke depannya dapat dimanfaatkan sebagai acuan dalam perbanyakan bibit tebu SUT *Event* 02 dan PS 881 secara *in vitro* menggunakan bagian koleoptil dari tahapan somatik embriogenesis yang dapat dikembangkan lebih lanjut untuk produksi benih sintetik (*artificial seeds*) tanaman tebu guna mendukung upaya pengadaan bibit berkualitas dalam skala besar untuk peningkatan produksi tebu nasional.
3. Penelitian ini dapat menambah pengetahuan dan wawasan baru bagi peneliti untuk dapat mengembangkan pengetahuan tersebut pada masyarakat mengenai

protokol regenerasi tebu SUT *Event* 02 dan PS 881 dengan metode somatik embriogenesis.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.)

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman perkebunan semusim dari famili *graminae*. Tanaman ini memiliki nilai ekonomi tinggi dan berkembang dengan baik terutama di negara – negara berkembang beriklim tropis seperti Indonesia. Tanaman tebu memiliki sistematika sebagai berikut :

Kingdom : Plantae  
Sub Divisi : Angiospermae  
Kelas : Monocotyledone  
Ordo : Graminales  
Famili : Graminae  
Species : *Saccharum officinarum* L.

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) tumbuh baik di daerah tropik dan subtropika dengan batas garis isoterm 20° C yaitu antara 19° LU - 35° LS. Tanaman ini dapat tumbuh pada berbagai jenis tanah yang drainasenya baik dengan ketinggian paling ideal < 500 dpl. Kondisi wilayah yang baik untuk budidaya tanaman tebu adalah wilayah yang memiliki curah hujan antara 1.000 – 1.300 mm per tahun yang sekurang – kurangnya mengalami 3 bulan kering sedangkan suhu ideal yang mendukung berkisar 24° C - 34° C dengan perbedaan suhu antara siang dan malam tidak lebih dari 10° C.

Tanaman tebu memiliki morfologi yang khas yakni batang tanamannya beruas – ruas mulai dari bagian pangkal hingga pertengahan dengan tinggi mencapai 2 – 5 meter (Supriyadi, 1992). Tebu termasuk dalam kelompok tanaman bertulangan daun sejajar yang daunnya tersusun dari helaian daun pelepah dan helaian daun berbentuk garis sepanjang 1-2 meter dan lebar 4-7 cm dengan ciri ujung meruncing, bagian tepi bergerigi, dan permukaan daun kasap (Tim Penulis PS, 2000). Perakaran tanaman tebu tergolong serabut dan apabila berbunga akan muncul malai dengan panjang antara 50 – 80 cm dan buahnya berbentuk seperti malai padi dengan besar lembaga sepertiga panjang biji (Indrawanto dkk.,2010).

## 2.2 Pengadaan bibit tanaman tebu unggul (*Saccharum officinarum* L.)

Tanaman tebu memiliki prospek yang cerah namun pengembangannya masih belum diimbangi dengan upaya peningkatan produksi padahal kebutuhan tebu baik untuk gula konsumsi maupun industri semakin meningkat dari tahun ke tahun. Produksi tebu dan rendemen gula yang masih rendah diantaranya karena area lahan tebu masih banyak yang berasal dari bongkar ratoon yang dapat mengurangi output rendemen yang dihasilkan dan alasan terpenting lainnya adalah kurangnya stok penyediaan bibit yang berkualitas dalam skala besar (Puslitbangbun, 2012).

Upaya peningkatan produksi tebu dari segi penyediaan bibit unggul telah banyak dilakukan salah satunya dengan kultur jaringan. Aplikasi perbanyakan tanaman secara kultur jaringan melalui somatik embriogenesis dinilai menguntungkan karena jumlah propagula yang dihasilkan tidak terbatas dan dapat diperoleh dalam waktu yang singkat (Purnamaningsih, 2002).

## 2.3 Somatik embriogenesis tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.)

Kultur jaringan tanaman merupakan teknik menumbuhkembangkan bagian tanaman, baik berupa sel, jaringan maupun organ dengan cara mengisolasi bagian tersebut kemudian diinduksi dalam kondisi aseptik secara *in vitro* agar dapat tumbuh membentuk tanaman baru yang lengkap (Sukmadjaja dan Mulyana, 2011). Aplikasi teknik ini dapat dilakukan untuk mendapatkan bibit tanaman dalam jumlah besar dan dalam waktu relatif singkat (Marlina dan Rusnandi, 2007). Salah satu cara perbanyakan tanaman dengan aplikasi teknik kultur jaringan adalah melalui somatik embriogenesis.

Somatik embriogenesis merupakan proses pembentukan embrio yang berasal dari sel – sel somatik atau jaringan tanaman yang ditumbuhkan dalam kondisi *in vitro* dan diberi pengaruh hormon – hormon eksternal untuk mendukung pertumbuhan eksplan menjadi tanaman baru lengkap (Yuwono, 2008). Pembentukan embrio dari zigot berbeda dengan embrio yang terbentuk dari sel somatik. Zigotik embrio terbentuk dari hasil peleburan sel gamet jantan dan betina sedangkan pada somatik embrio terbentuk dari sel – sel somatik baik sel haploid maupun diploid yang

kemudian berdiferensiasi menjadi tanaman melalui fase – fase seperti proses terbentuknya embrio (Augé *et al.*, 1995).

Prinsip yang mendasari terbentuknya somatik embrio adalah fenomena totipotensi dan telah banyak diteliti pada kultur jaringan pada beberapa spesies tanaman angiospermae maupun gymnospermae (Santos *et al.*, 2006) termasuk pada beberapa varietas tanaman tebu (Raza *et al.*, 2012; Malabadi *et al.*, 2011).

Tahapan pembentukan somatik embriogenesis pada dasarnya dibagi menjadi dua tahapan, pertama tahapan diferensiasi sel untuk mendapatkan sel embriogenik yang kompeten dan proliferasi dari sel embriogenik tersebut, kedua sel embriogenik memperlihatkan kemampuan kompetensi embriogeniknya dan berdiferensiasi menjadi embrio somatik. Tahap induksi ini yang menentukan sel dan jaringan eksplan berada fase transisi antara proses diferensiasi sel menjadi embriogenik. Fase transisi ini eksplan masih memerlukan stimulus hormon secara eksogen (Jiménez, 2001).

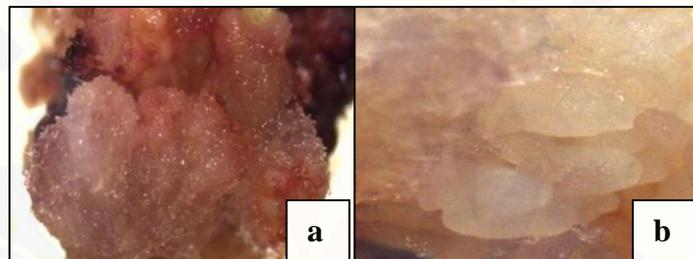
Somatik embriogenesis memiliki beberapa tahapan spesifik dimulai dari pembentukan massa pro embrionik (*pro embryonic masses*) diikuti pembentukan somatik embrio, pendewasaan, dan regenerasi (Hussein *et al.*, 2006; Purnamaningsih, 2011). Pembentukan embrio dari sel somatik dapat terjadi melalui dua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

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

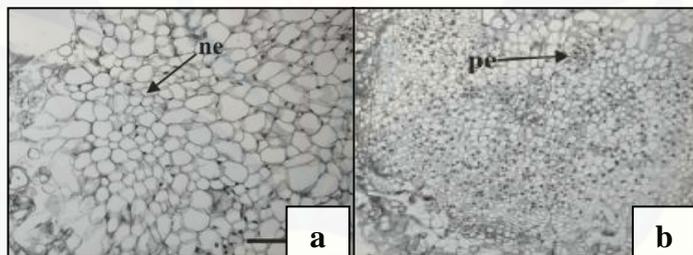
Kalus embriogenik merupakan memiliki tipe kalus yang dapat memproduksi somatik embrio setelah diberi perlakuan pada kondisi kultur (Hussein *et al.*, 2006). Kalus embriogenik memiliki ciri berwarna putih kekuningan, berstruktur remah dan

kering sedangkan kalus non embriogenik bestruktur kompak, basah, dan berwarna bening kecoklatan (Gambar 1).

Hasil pengamatan histologi Alcantara *et al.*, (2014) melaporkan bahwa kalus tebu non embriogenik (NE) yang memiliki ciri ukuran sel tampak besar, dengan nukleus yang umumnya tidak tampak sedangkan kalus tebu embriogenik mengandung pro-embrio (PE) dan memiliki ciri – ciri sitoplasma rapat, nukleolus tampak jelas, mengandung rasio nukelus dan sitoplasma yang tinggi yang mengindikasikan adanya zona meristematis yang dapat mengarahkan kepada pembentukan somatik embrio (Gambar 2).



**Gambar 1.** Kalus tebu non embriogenik (a) Kalus tebu embriogenik (b) (Hasil penelitian ini).

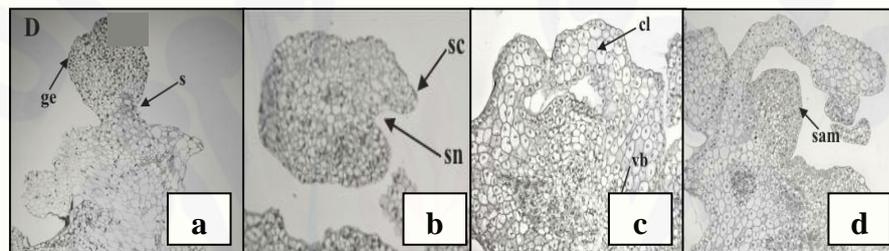


**Gambar 2.** Histologi kalus tebu non embriogenik dan embriogenik (a) NE memiliki ciri ukuran sel tampak besar, dengan nukleus yang umumnya tidak tampak (b) Histologi kalus tebu embriogenik dengan ciri – ciri adanya pro-embrio (PE), sitoplasma rapat, nukleolus tampak jelas (Alcantara *et al.*, 2014).

Kalus yang terbentuk dari jalur somatik embriogenesis selanjutnya akan membentuk unit yang menyerupai embrio (embryoid) yang memiliki dua calon meristem (bipolar) yang kemudian akan melewati tahap pematangan dan perkecambahan. Hal ini berbeda dengan kalus yang beregenerasi melalui jalur somatik organogenesis dimana kalus akan langsung membentuk tunas yang diawali dengan

pembentukan pusat meristematik (meristemoid) yang mengarah pada pembentukan organ (Sukmadjaja dan Mulyana, 2011).

Tahapan perkembangan pembentukan somatik embrio pada dasarnya menyerupai zigotik embrio. Tahapan pada tanaman konifer meliputi globular, early cotyledonary, late cotyledonary embrio sedangkan pada tanaman dikotil meliputi globular, hati, torpedo, dan kotiledone. Tahapan pada tanaman monokotil berupa globular, scutellar, koleoptilar (Figuroa *et al.*, 2006), dan kotiledon (Malabadi *et al.*, 2011). Hasil pengamatan histologi tahapan – tahapan somatik embriogenesis pada tanaman tebu telah dilaporkan oleh Ho and Vasil (1983), Falco *et al.*, (1996) melalui kultur suspensi sel, Dibax *et al.*, (2012), dan Alcantara *et al.*, (2014) seperti yang tertera pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Histologi morfologi tahapan – tahapan somatik embriogenesis pada tanaman tebu (a) globular embrio (GE) dan suspensor (S) (b) Scutelum (SC) dan Scutelar node (SN) (c) Coleoptil (CL) dan *Vascular bundle* (VB) (d) *Shoot apical meristem* (SAM) (Alcantara *et al.*, 2014).

Metode somatik embriogenesis memiliki kelebihan diantaranya jumlah propagula yang dihasilkan tidak terbatas dan dapat diperoleh dalam waktu yang singkat. Embrio somatik juga dapat mempercepat keberhasilan peluang transformasi yang lebih tinggi dan dapat dijadikan bahan tanaman yang ideal untuk disimpan dan diregenerasikan menjadi bibit somatik (Purnamaningsih, 2002). Metode ini juga banyak dipilih untuk upaya konservasi dan regenerasi pada spesies tanaman langka *Nothapodytes foetida* (Khadke and Kuvalekar, 2013) dan cryopreservasi plasma nutfah pada beberapa spesies tanaman agroforestry termasuk diantaranya tanaman tebu (Vicient and Martinez, 1998).

Berikut ini merupakan tabel skema perbandingan metode regenerasi melalui jalur somatik embriogenesis dan somatik organogenesis tidak langsung pada tanaman tebu.

**Tabel 1.** Perbandingan metode perbanyakan melalui somatik organogenesis tidak langsung dan somatik embriogenesis tidak langsung pada tanaman tebu .

Somatik organogenesis tidak langsung	Somatik embriogenesis tidak langsung
<p>Eksplan planlet tebu</p> <p>↓</p> <p>Induksi kalus</p> <p>↓</p> <p>Regenerasi tunas</p> <p>↓</p> <p>Regenerasi akar</p> <p>↓</p> <p>Planlet</p> <p>↓</p> <p>aklimatisasi</p>	<p>Eksplan</p> <p>↓</p> <p>Induksi kalus</p> <p>↓</p> <p>Proliferasi kalus (Pendewasaan) dari struktur globular membentuk kotiledon dan promordia akar</p> <p>↓</p> <p>Perkecambahan(Regenerasi)</p> <p>↓</p> <p>Plantlet</p> <p>↓</p> <p>Hardening (aklimatisasi) (Purnamaningsih, 2011)</p>

#### 2.4 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

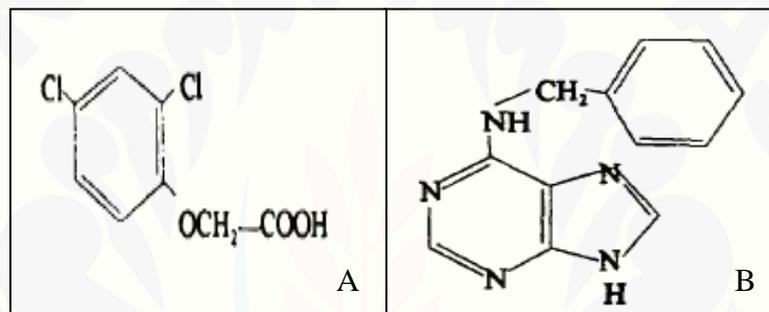
Kombinasi jenis media, zat pengatur tumbuh (ZPT) dan bagian eksplan yang digunakan sangat menentukan keberhasilan perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. Tanaman membutuhkan media kultur yang mengandung unsur hara makro, mikro, vitamin, dan sukrosa sebagai sumber energi (Marlina, 2009). Komposisi media dan rasio zat pengatur tumbuh yang digunakan juga perlu mendapat perhatian serius untuk menghasilkan planlet sebagaimana yang diharapkan, disamping faktor-faktor lain, seperti cahaya, suhu dan kelembaban (Rainiyati dkk .,2005).

Aplikasi eksogen dari zat pengatur tumbuh secara akan dapat mempengaruhi perkembangan dari regenerasi jaringan eksplan (Ali *et al.*, 2012). Zat pengatur tumbuh golongan auksin berperan penting dalam pertumbuhan sel, merangsang pertumbuhan kalus, pembentukan organ yang mengarah ke perakaran, dan diferensiasi jaringan vaskular, dan menginisiasi pembelahan sel.

Pemberian zat pengatur tumbuh golongan sitokinin dapat merangsang, multiplikasi tunas (Niaz and Quraishi, 2002), pembentukan tunas adventif, mematahkan dormansi tunas lateral, dan dapat bekerja secara sinergis bersama auksin

dalam proses pembelahan sel dimana auksin berperan dalam proses replikasi DNA sedangkan sitokinin mengontrol dalam proses mitosis dan sitokenesis sehingga keseimbangan level auksin dan sitokinin yang tepat diperlukan dalam kultur *in vitro* ( Gaspar *et al.*, 1996).

Menurut penelitian Naz *et al.*, (2008) pemberian kombinasi ZPT auksin dan sitokinin yakni auksin sintetik 2,4-D dan sitokinin sintetik BAP dapat mempengaruhi proses pembentukan embrio somatik langsung paling baik. Kombinasi auksin dan sitokinin juga dilaporkan paling efektif untuk menginduksi somatik embrio (Jahangir and Nasir, 2010). Berikut ini merupakan gambar struktur kimia dari 2,4-D dan BAP (Gambar 4.).



**Gambar 4.** Struktur kimia 2,4-D dan BAP (A) Struktur kimia 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (B) Struktur kimia Benzylaminopurine (Gaspar *et al.*, 1996).

Penambahan auksin 2,4-D saja memiliki potensi lebih untuk proses inisiasi kalus tebu (Ali and Iqbal, 2010). Pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D dengan konsentrasi yang tinggi ( $3-4 \text{ mgL}^{-1}$ ) dapat menghasilkan induksi kalus tebu yang paling baik jika dibandingkan dengan pemberian 2,4-D pada konsentrasi yang lebih rendah ( $1-1,5 \text{ mgL}^{-1}$ ) (Ali *et al.*, 2010). Regenerasi kalus tebu dapat diperoleh dengan mengurangi atau menghilangkan konsentrasi auksin dari media (Desai *et al.*, 2004).

Zat pengatur tumbuh BAP merupakan salah satu sitokinin sintetik yang banyak digunakan untuk penelitian tentang regenerasi tanaman tebu (Sadat *et al.*, 2011; Ikram and Memon, 2012; Alcantara *et al.*, 2014). Pemberian BAP dengan konsentrasi yang rendah dapat memicu hasil regenerasi tebu yang baik (Anjum *et al.*, 2012). Pemberian BAP dengan konsentrasi yang berbeda dapat memberikan efek yang signifikan terhadap persentase regenerasi kalus tebu (Nawaz *et al.*, 2013).

Penambahan BAP pada konsentrasi  $1 \text{ mgL}^{-1}$  pada media cair mampu memberikan hasil regenerasi tunas tebu tertinggi (Shah *et al.*, 2009). Niaz and Quraishi (2002) menambahkan bahwa pemberian BAP memberikan efek positif terhadap pembentukan tunas serta dapat meningkatkan pembentukan planlet tebu.

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

Penelitian Mustafa and Khan (2012) menyebutkan hal yang berbeda yakni menggunakan tanaman tebu hasil kultur *in vitro* mulai bagian dasar (basal) hingga ujung untuk regenerasi dan didapatkan hasil bahwa respon terbaik induksi dan proliferasi kalus berasal dari segmen pertama (bagian basal) tebu *in vitro* yang mengandung banyak sel meristematik.

## 2.5 Hipotesis

3. Terdapat perbedaan pengaruh antara 2,4-D tunggal dan kombinasi 2,4-D dan BAP terhadap induksi kalus tebu SUT *Event* 02 maupun PS 881 melalui somatik embriogenesis.
4. Terdapat perbedaan pengaruh antara 2,4-D tunggal dan kombinasi 2,4-D dan BAP terhadap hasil regenerasi pada tebu SUT *Event* 02 maupun PS 881 melalui somatik embriogenesis.

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Lokasi dan Waktu Percobaan

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium CDAST (*Center for Development of Advance Science and Technology*) Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Universitas Jember pada bulan September 2014 – Februari 2015.

#### 3.2 Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan adalah bagian basal tanaman tebu SUT *Event 02* dan PS 881 hasil kultur *in vitro* yang telah positif bebas virus dari Laboratorium CDAST Universitas Jember. Eksplan yang digunakan adalah tebu *in vitro* umur  $\pm$  1 bulan, stok media Murashige and Skoog, Vitamin Myo-inositol, Pyridoxin-HCl, Thiamin-HCl, zat pengatur tumbuh 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Benzylaminopurine (BAP), casein hidrolisat, prolin, sukrosa, phytigel, aquadest, NaOH, HCl, alcohol 70 % dan 96 %, tissue, dan kertas saring.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow* (LAF), autoclave, timbangan digital, magnetic stirer, pH meter, microwave, beaker glass, petridish, petridish disposable, sendok pengaduk, gelas ukur, mikropipet, tip, botol kultur, alat kultur (scalpel, pinset, gunting, bunsen), kamera digital, lup, dan mikroskop stereo.

#### 3.3 Rancangan Percobaan

Percobaan dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor dengan tiga kali ulangan. Faktor pertama genotipe / varietas tebu yang terdiri dari 2 taraf yakni genotipe SUT *Event 02* dan varietas PS 881. Faktor kedua yakni macam media yang terdiri dari 5 taraf sebagai berikut :

Kode	Komposisi media induksi kalus
A	MS 0 tanpa penambahan zat pengatur tumbuh
B	MS 0 + 2,4-D 3 mgL <sup>-1</sup>
C	MS 0 + 2,4-D 4,5 mgL <sup>-1</sup>
D	MS 0 + 2,4-D 3 mgL <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL <sup>-1</sup>
E	MS 0 + 2,4-D 4,5 mgL <sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL <sup>-1</sup>

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan ANOVA, apabila terdapat perbedaan diantara perlakuan dilanjutkan dengan pengujian kontras orthogonal (1DB).

### 3.4 Pelaksanaan Percobaan

Percobaan ini terdiri dari serangkaian kegiatan sbb :

3.4.1 Pembuatan media induksi kalus, proliferasi kalus, dan regenerasi embrio somatik .

**Tabel 2.** Komposisi media induksi kalus, proliferasi kalus, dan regenerasi embrio somatik.

Bahan kimia	Media Induksi kalus	Media Proliferasi	Media Regenerasi
Media dasar	MS	MS	MS
2,4-D ( $\text{mgL}^{-1}$ )	3 $\text{mgL}^{-1}$ dan 4 $\text{mgL}^{-1}$	1,5 $\text{mgL}^{-1}$	-
BAP( $\text{mgL}^{-1}$ )	1,5 $\text{mgL}^{-1}$	-	-
Casein hidrolisat ( $\text{mgL}^{-1}$ )	300 $\text{mgL}^{-1}$	300 $\text{mgL}^{-1}$	-
L-Prolin ( $\text{mgL}^{-1}$ )	-	560 $\text{mgL}^{-1}$	-
Sukrosa (g)	30 $\text{gL}^{-1}$	30 $\text{gL}^{-1}$	30 $\text{gL}^{-1}$
Phytigel (g)	2,5 $\text{gL}^{-1}$	2,5 $\text{gL}^{-1}$	2,5 $\text{gL}^{-1}$

Stok media dan ZPT (Lampiran 1.a) untuk media induksi, proliferasi, dan regenerasi diambil berdasarkan komposisi Tabel 2 selanjutnya dilarutkan dengan aquadest ke dalam beaker glass. Setelah itu larutan diukur derajat keasamannya dengan menggunakan pH meter. Larutan media tersebut kemudian ditambahkan phytigel sebanyak 2,5  $\text{gL}^{-1}$ . Selanjutnya media dipanaskan dalam microwave selama  $\pm$  3 menit lalu dimasukkan ke dalam botol dan ditutup. Media disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 120<sup>0</sup> C dan tekanan 17,5 psi selama 20 menit.

### 3.4.2 Persiapan Eksplan

Planlet tebu SUT *Event* 02 dan PS 881 didapatkan di Laboratorium CDAST dari hasil penelitian sebelumnya, yakni eliminasi virus SCMV pada tebu PRG SUT *Event* 02 asal varietas Bulu Lawang (BL) dengan antiviral ribavirin dan eliminasi

virus SCMV PS 881 dengan antiviral acyclovir dan telah dikonfirmasi bebas virus dengan menggunakan analisis DAS ELISA dan RT-PCR (Lampiran 1.b).

Planlet tebu SUT *Event 02* dan PS 881 disubkultur dan diperbanyak dalam media MS untuk mendapatkan tunas baru yang akan digunakan sebagai eksplan hingga jumlahnya mencapai  $\pm 100$  planlet. Tunas baru yang sudah berkembang menjadi planlet dengan umur  $\pm 1$  bulan, kemudian diseleksi sesuai dengan kriteria yakni sehat, segar, tinggi  $\pm 1-3$  cm. Tanaman yang memenuhi kriteria diambil dari botol kultur kemudian dibersihkan dari sisa media di dalam LAF. Setelah itu planlet tebu *in vitro* dipotong bagian basalnya dengan ukuran  $\pm 0,5$  cm dari atas pangkal. Bagian potongan yang digunakan sebagai eksplan adalah potongan segmen pertama pangkal planlet.

### 3.4.3 Induksi kalus

Eksplan yang sudah diambil bagian basalnya ditanam pada botol yang berisi media induksi dengan perlakuan ZPT yang telah ditentukan (Lampiran 1.c). Kultur diletakkan di kondisi gelap untuk menginduksi kalus pada suhu  $23^0 - 25^0\text{C}$  selama 5 minggu. Kegiatan subkultur dilakukan dalam rentang waktu 3 minggu sekali (Lampiran 1.d).

### 3.4.4 Proliferasi kalus

Kalus embriogenik yang terbentuk pada eksplan hasil induksi dipisahkan menjadi potongan yang lebih kecil kemudian ditanam pada media proliferasi dengan formulasi media yang telah ditentukan untuk memacu perkembangan tahapan embriogenesis. Kultur tetap diletakkan pada kondisi gelap seperti dalam tahapan induksi pada suhu  $23^0-25^0\text{C}$  selama 4 minggu. Pada tahapan ini dilakukan pengamatan morfologi kalus dan tahapan somatik embriogenesis baik dengan menggunakan lup maupun mikroskop (Lampiran 1.e).

### 3.4.5 Regenerasi somatik embrio

Somatik embrio yang sudah berkembang disubkultur dan ditanam di media regenerasi untuk pertumbuhan tunas dan akar. Pada tahapan ini tanaman tebu

ditransfer ke kondisi terang dengan penyinaran lampu selama 16 jam dan kondisi gelap 8 jam dalam ruang kultur jaringan pada suhu 23<sup>0</sup> - 25<sup>0</sup>C.

### **3.5 Parameter Pengamatan**

Percobaan ini dilakukan dengan melakukan analisis data secara kualitatif dan kuantitatif. Parameter pengamatan yang diamati sebagai berikut :

#### 3.5.1 Pengamatan induksi kalus

- a. Waktu induksi kalus
- b. Morfologi kalus
- c. Persentase induksi kalus

#### 3.5.2 Pengamatan proliferasi kalus

- a. Morfologi kalus embriogenik
- b. Morfologi tahapan – tahapan somatik embriogenesis

#### 3.5.3 Pengamatan regenerasi somatik embrio

- a. Waktu induksi tunas
- b. Jumlah planlet
- c. Tinggi planlet

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil penelitian

#### 4.1.1 Induksi Kalus

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pengaruh media menunjukkan nilai yang berbeda sangat nyata terhadap parameter waktu induksi kalus dan persentase induksi kalus, namun pengaruh varietas menunjukkan nilai berbeda tidak nyata dan tidak terdapat interaksi antara perlakuan varietas dan media terhadap pada kedua parameter seperti disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Hasil analisis ragam pada parameter waktu induksi kalus dan persentase induksi kalus

Parameter	Nilai F-Hitung		
	Faktor varietas	Faktor media	Interaksi varietas dan media
Waktu induksi kalus	0,10 ns	48,18 **	0,10 ns
Persentase induksi kalus	0,05 ns	24,33 **	0,11 ns

Keterangan : (\*)Berbeda nyata; (\*\*)Berbeda sangat nyata; (ns) berbeda tidak nyata

Hasil analisis ragam dari parameter yang berbeda sangat nyata selanjutnya diuji lanjut dengan uji kontras orthogonal (1DB). Hasil uji kontras ortogonal yang disajikan pada Tabel 4 menunjukkan bahwa media perlakuan A (kontrol) berbeda sangat nyata terhadap media perlakuan B,C,D, dan E (perlakuan penambahan ZPT) pada parameter waktu induksi kalus dan persentase induksi kalus. Taraf kelompok kontras pemberian ZPT 2,4-D tunggal dengan kombinasi ZPT 2,4-D dan BAP menunjukkan nilai yang berbeda sangat nyata pada parameter waktu induksi kalus dan persentase induksi kalus (Tabel 4).

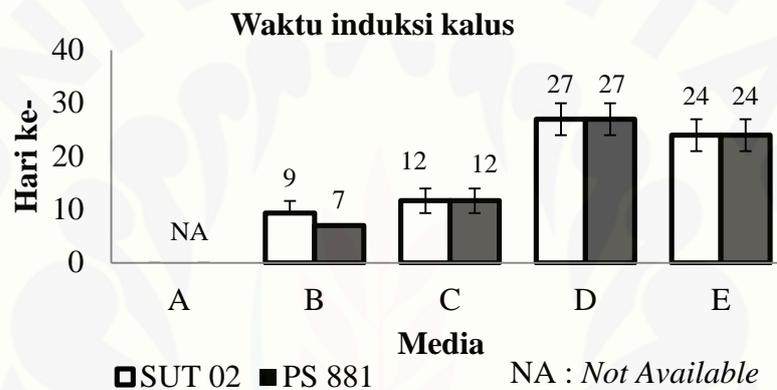
Kelompok perlakuan kontras 2,4-D tunggal dengan konsentrasi yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata terhadap parameter waktu induksi kalus namun berbeda tidak nyata terhadap parameter persentase induksi kalus. Kelompok kontras kombinasi 2,4-D dan BAP memiliki nilai yang berbeda tidak nyata pada parameter waktu induksi kalus namun menunjukkan nilai yang berbeda nyata terhadap parameter persentase induksi kalus (Tabel 4).

**Tabel 4.** Hasil analisis kontras orthogonal pada parameter waktu induksi kalus dan persentase induksi kalus

Kontras	Nilai F-hitung	
	Waktu induksi kalus	Persentase induksi kalus
A >> B,C,D,E	191,75**	77,74**
BC >> DE	185,61 **	110,68**
B >> C	4,68 *	0,00 ns
D >> E	3,44 ns	6,19*

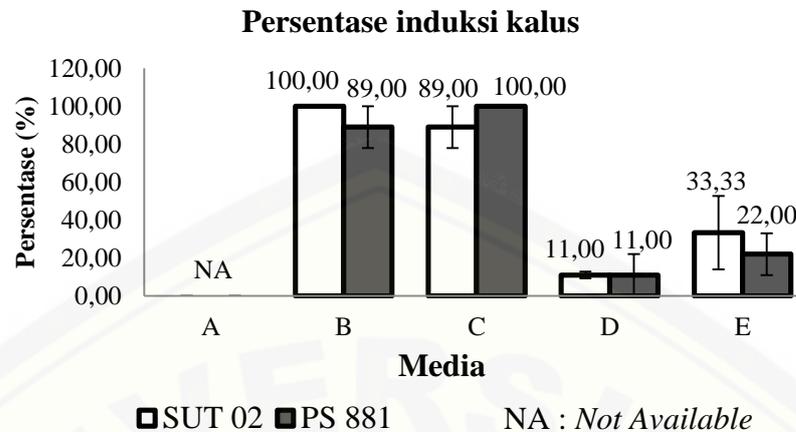
Keterangan: \*\*= Berbeda sangat nyata, \*=Berbeda nyata, ns=Berbeda tidak nyata

A= MS (kontrol), B= 2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup>, C= 2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup>, D=2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>, E= 2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>.



**Gambar 5.** Waktu induksi kalus tebu SUT *Event 02* dan PS 881 pada lima macam komposisi media yang berbeda.

Hasil analisis pada parameter waktu induksi kalus (Gambar 5) menunjukkan bahwa pembentukan kalus tercepat diamati dari kelompok perlakuan induksi 2,4-D tunggal yaitu media B (2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup>) dan media C (2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup>) pada tebu SUT *Event 02* dan PS 881. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan media kombinasi D (2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>) dan media E (2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>) menunjukkan respon pembentukan kalus namun waktu yang dibutuhkan lebih lambat dibandingkan dengan eksplan yang ditanam pada media yang hanya mengandung 2,4-D saja pada kedua tebu SUT *Event 02* dan PS 881.



**Gambar 6.** Persentase induksi kalus tebu SUT *Event 02* dan PS 881 pada lima macam komposisi media yang berbeda.

Respon yang baik terhadap parameter persentase induksi kalus ditunjukkan dengan pemberian 2,4-D tunggal pada kedua tebu SUT *Event 02* dan PS 881. Induksi kalus pada taraf 2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> dan 4,5 mgL<sup>-1</sup> merupakan rentang level yang optimum untuk menginduksi kalus tebu SUT *Event 02* dan PS 881. Namun nilai persentase induksi kalus pada kelompok perlakuan penambahan BAP yang dikombinasikan dengan dua level 2,4-D yang berbeda (Media D dan E) tidak menunjukkan hasil yang optimum pada kedua tebu SUT *Event 02* dan PS 881 dibandingkan dengan perlakuan 2,4-D tunggal (Gambar 6).

Hasil pengamatan kalus pada akhir tahap induksi menunjukkan bahwa kalus yang terdapat pada media B, C, dan E pada tebu SUT *Event 02* maupun tebu PS 881 dapat lolos dan dapat disubkultur ke tahap proliferasi. Eksplan pada media A tidak disubkultur di media proliferasi kalus dikarenakan mengalami organogenesis langsung sedangkan eksplan pada media D tebu SUT *Event 02* tidak lolos ke tahap proliferasi kalus dikarenakan kalus yang dihasilkan tidak berkembang sehingga tidak layak untuk dipindah ke tahap selanjutnya.

#### 4.1.2 Proliferasi kalus

Hasil pengamatan tahap proliferasi kalus, didapatkan struktur kalus embriogenik diawali dengan adanya pembentukan massa embrio yang disebut *pro embrio mass* (PEM) atau *pro globular* pada kalus embriogenik yang memiliki struktur

*glossy*, transparan, dan kering. *Pro embrio mass* (PEM) selanjutnya akan berkembang menjadi kalus embriogenik yang berbentuk nodular, *glossy*, remah, dan kering. Hasil tahapan proliferasi setelah 2 minggu masa inkubasi didapatkan hasil adanya tahapan – tahapan SE yang terbentuk yakni globular, scutellar, koleoptil, kotiledon, dan selanjutnya tunas dari kedua tebu baik SUT *Event 02* maupun PS 881.

#### 4.1.3 Regenerasi somatik embrio

Pengamatan tahap regenerasi dari hasil proliferasi diuji dengan menggunakan nilai mean  $\pm$  SE (Tabel 5) dengan rincian perhitungan seperti tertera pada.

**Tabel 5.** Waktu induksi tunas, jumlah planlet, dan tinggi planlet hasil regenerasi tebu SUT *Event 02* dan PS 881

Asal Media	Waktu induksi tunas (hari ke-)		Jumlah Planlet		Tinggi planlet (cm)	
	SUT 02	PS 881	SUT 02	PS 881	SUT 02	PS 881
	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE	Mean $\pm$ SE
A	5,50 $\pm$ 1,50	4,00 $\pm$ 0,00	7,00 $\pm$ 1,00	8,00 $\pm$ 1,00	3,14 $\pm$ 0,44	3,62 $\pm$ 0,21
B	11,05 $\pm$ 2,50	NA	35,5 $\pm$ 12,50	NA	2,53 $\pm$ 0,43	NA
C	43,50 $\pm$ 29,50	NA	20,5 $\pm$ 0,50	NA	0,79 $\pm$ 0,79	NA
D	NA	8,00 $\pm$ 5,70	NA	10,50 $\pm$ 3,50	NA	2,15 $\pm$ 0,74
E	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Keterangan: A= MS (kontrol), B= 2,4-D 3 mg L<sup>-1</sup>, C= 2,4-D 4,5 mg L<sup>-1</sup>, D=2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>, E= 2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>. NA : *Not Available*. Nilai pada media A merupakan hasil pengamatan eksplan yang mengalami organogenesis.

Hasil analisis menunjukkan bahwa planlet hasil somatik organogenesis langsung didapatkan dari asal media A pada tahap induksi kalus. Sedangkan planlet hasil somatik embriogenesis tidak langsung dari media proliferasi, didapatkan dari tunas yang berhasil lolos dan dapat tumbuh menjadi planlet sampai tahap regenerasi adalah tunas dari eksplan asal media induksi B dan C pada tebu SUT *Event 02* dan eksplan asal media induksi D pada tebu varietas PS 881. Waktu pembentukan tunas tebu PS 881 hasil somatik embriogenesis pada tahap regenerasi lebih cepat dibandingkan dengan tebu SUT *Event 02*. Hasil analisis jumlah dan tinggi planlet didapatkan nilai rata-rata terbaik pada planlet asal media induksi B yang menghasilkan

tinggi planlet rata – rata tertinggi tebu SUT *Event 02* disusul eksplan asal media induksi D pada tebu varietas PS 881.

## 4.2 Pembahasan

Garis besar hasil penelitian kultur *in vitro* dalam 3 tahap yakni induksi kalus, proliferasi kalus, dan regenerasi disajikan pada Tabel 6.

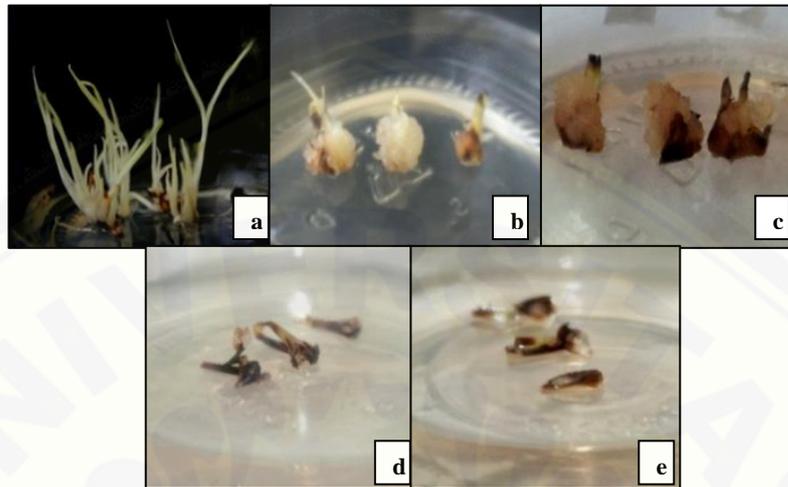
### 4.2.1 Induksi kalus

Tahap induksi awal sebelum pembentukan kalus diawali dengan terjadinya proses pembengkakan (*swelling*) pada bagian basal eksplan *in vitro* tepatnya disekitar daerah yang dilukai. Bagian basal eksplan *in vitro* mengandung banyak sel meristematik dan menghasilkan respon paling bagus terhadap induksi kalus (Mustafa and Khan, 2012). Proses pembengkakan mengindikasikan adanya respon proses pemanjangan sel yang sangat cepat pada eksplan ( Gill *et al.*, 2004).

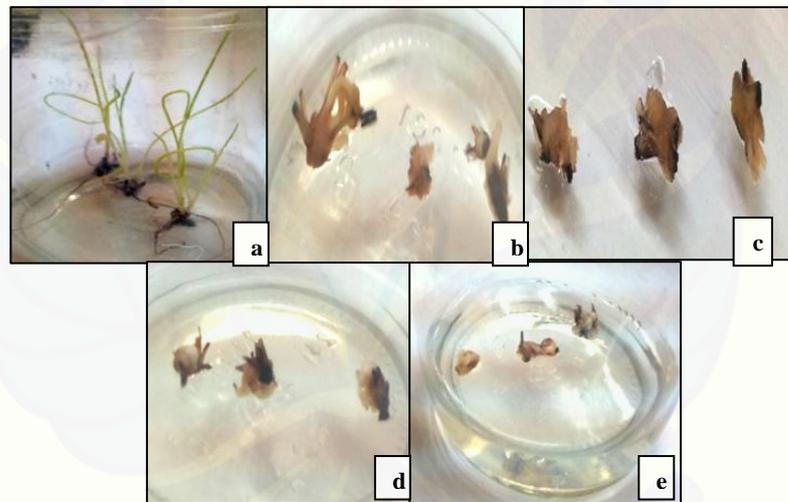
Pembengkakan (*swelling*) eksplan tebu *in vitro* muncul pada hari ke 2-4 setelah tanam. Hasil pengamatan induksi kalus dengan rentang waktu inkubasi 30 hari menunjukkan bahwa eksplan yang ditumbuhkan pada media kontrol (MS) tanpa penambahan ZPT ternyata tidak menunjukkan respon pembengkakan (*swelling*). Bagian meristem eksplan yang ditanam di media kontrol (MS) tumbuh menjadi tunas dan muncul akar hingga akhir pengamatan pada 30 hari setelah tanam karena mengalami organogenesis langsung sehingga data induksi kalus hasil induksi media kontrol tidak tersedia (*not available*).

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

Pengaruh macam media terhadap induksi kalus menunjukkan hasil pertumbuhan eksplan yang berbeda – beda pada tebu SUT *Event 02* dan PS 881 seperti yang ditampilkan pada Gambar 7 dan 8.



**Gambar 7.** Induksi kalus tebu SUT *Event 02* pada 5 macam media yang berbeda pada 3 MST.



**Gambar 8.** Induksi kalus tebu PS 881 pada 5 macam media yang berbeda pada 3 minggu setelah tanam. Keterangan : (a) MS ,(b) 2,4-D  $3 \text{ mgL}^{-1}$  (c) 2,4-D  $4,5 \text{ mgL}^{-1}$  (d) 2,4-D  $3 \text{ mgL}^{-1}$  + BAP  $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ , (e) 2,4-D  $4,5 \text{ mgL}^{-1}$  + BAP  $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ .

Hasil pertumbuhan eksplan media kontrol MS (Gambar 7.a) pada tebu SUT *Event 02* dan (Gambar 8.a) pada tebu PS 881 tidak mengalami tahapan pembentukan kalus dan mengalami organogenesis. Organogenesis secara langsung yang ditandai dengan tumbuhnya tunas dari eksplan karena adanya pembentukan pusat aktivitas

meristematik (meristemoid) yang mengarah pada pembentukan organ sedangkan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP merangsang pertumbuhan kalus yang berbeda – beda karakteristiknya.

Eksplan tebu SUT *Event 02* yang ditumbuhkan pada media induksi B dengan pemberian 2,4-D  $3 \text{ mgL}^{-1}$  (Gambar 7.b) selama 3 MST kalus yang terbentuk muncul dari bagian basal eksplan yang banyak mengandung sel – sel meristematik pada sekitar daerah yang dilukai pada saat penanaman demikian juga pada eksplan dalam media induksi C dengan pemberian 2,4-D  $4,5 \text{ mgL}^{-1}$  (Gambar 7.c). Hal yang berbeda ditunjukkan pada eksplan yang ditumbuhkan pada media induksi D dan E dengan kombinasi 2,4-D dan BAP (Gambar 7.d dan 7.e) dimana eksplan tidak menunjukkan pertumbuhan kalus yang optimal karena bagian eksplan basal *in vitro* mengalami pencoklatan (*browning*).

Hal serupa juga ditunjukkan dari hasil pertumbuhan tebu PS 881 dimana pada media induksi B dengan pemberian 2,4-D  $3 \text{ mgL}^{-1}$  (Gambar 8.b) maupun media induksi C dengan pemberian 2,4-D  $4,5 \text{ mgL}^{-1}$  (Gambar 8.c) selama 3 MST kalus muncul pada bagian basal eksplan *in vitro*. Kasus yang sama dengan tebu SUT *Event 02* ditemukan pada perlakuan media induksi D dan E dengan tebu PS 881 (Gambar 8.d dan 8.e) dimana eksplan terlihat hanya mengalami pembengkakan (*swelling*) yang menunjukkan perkembangan tidak optimal.

Pemberian 2,4-D tunggal pada tebu SUT *Event 02* dan PS 881 pada penelitian ini menunjukkan hasil terbaik dalam menginduksi kalus dibandingkan dengan kombinasi 2,4-D dan BAP yang tidak menghasilkan kalus pada tahap induksi seperti yang dilaporkan Anjum *et al.*, (2012).

Namun hasil tersebut berbeda seperti dilaporkan dalam penelitian Sukmadjaja dan Mulyana (2011) yang menyatakan bahwa media yang diberi tambahan 2,4-D dan BAP serta penambahan casein hidrolisat menghasilkan rata – rata pembentukan kalus mencapai 83-86%. Naz *et al.*, (2008) dan Jahangir and Nasir (2010) mendukung dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa kombinasi auksin sintetik 2,4-D dan sitokinin sintetik BAP dapat menghasilkan hasil pembentukan embrio somatik langsung paling baik.

Beberapa eksplan dalam media induksi yang diamati juga menunjukkan respon terjadinya perubahan warna eksplan menjadi kecoklatan (*browning*) baik dari tanaman tebu SUT *Event 02* maupun PS 881. Terjadinya *browning* pada eksplan mempengaruhi lamanya waktu induksi kalus dikarenakan senyawa fenol penyebab *browning* menghambat penyerapan nutrisi oleh eksplan sehingga menurunkan hasil pembentukan kalus pada eksplan ( Gill *et al.*, 2004).

Terhambatnya pembentukan kalus diindikasikan karena eksplan yang mengalami *browning* sehingga menghambat penyerapan nutrisi serta aktivitas enzim. Pencoklatan pada eksplan (*browning*) menyebabkan pembentukan kalus yang tidak sempurna sehingga menghasilkan nilai rata – rata lebih rendah dibandingkan kelompok media perlakuan 2,4-D tunggal.

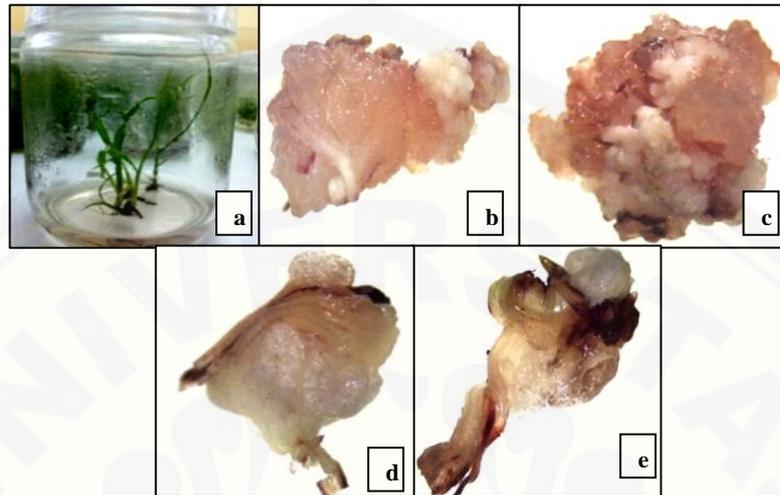
Penambahan nutrisi untuk merangsang somatik embriogenesis dilakukan dengan mensubkultur eksplan setelah berusia 3 minggu pada media induksi baru dengan cara mengambil bagian yang embriogenik pada *clumps* kalus dan memisahkan bagian yang tidak embriogenik maupun yang mengalami *browning*.

Media baru untuk subkultur juga diberi tambahan asam amino sebagai sumber nitrogen organik untuk meningkatkan keberhasilan somatik embriogenesis dan regenerasi pada tanaman tebu seperti yang dilaporkan oleh Asad *et al.*, (2009) dan memberikan efek positif terhadap regenerasi tanaman tebu liar asal kalus (*Saccharum spontaneum* L.) (Takahashi and Takamizo, 2013). Penambahan asam amino jenis casein hidrolisat 300 mgL<sup>-1</sup> dilaporkan berperan dalam menginduksi embrio somatik (Mayang *et al.*, 2011; Sukmadjaja dan Mulyana, 2011),

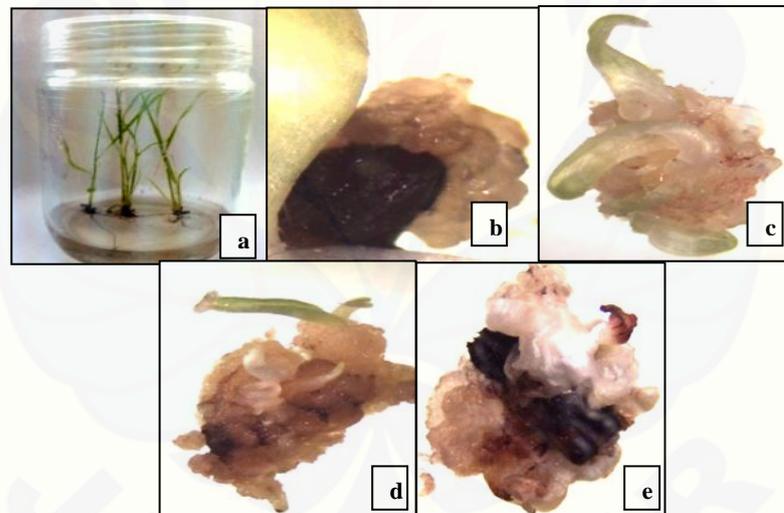
Pengamatan pada umur 5 minggu di media induksi, didapatkan hasil beberapa morfologi kalus. Kalus diamati secara mikroskopik untuk menyakinkan pembentukan somatik embrio. Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopik kalus embriogenik tebu SUT *Event 02* (Gambar 9) dan PS 881 (Gambar 10) yang terbentuk, macam media yang diberikan menghasilkan beberapa karakteristik kalus yang berbeda – beda. Pengamatan kalus pada tahap ini difokuskan pada pengamatan morfologi kalus embriogenik yang selanjutnya akan digunakan sebagai eksplan tahapan proliferasi.

Kalus embriogenik yang didapatkan dari hasil penelitian ini memiliki ciri - ciri berwarna putih kekuningan, berstruktur remah dan kering sedangkan kalus non

embriogenik bestruktur kompak, basah, dan berwarna bening kecoklatan seperti yang dilaporkan oleh Gandonou *et al.*,(2005).



**Gambar 9.** Morfologi kalus tebu SUT *Event 02*



**Gambar 10.** Morfologi kalus tebu PS881. Keterangan : (a) MS ,(b) 2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> (c) 2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup> (d) 2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>, (e) 2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>.

Morfologi kalus tebu SUT *Event 02* pada perlakuan kelompok 2,4-D tunggal yakni media B dan media C (gambar 9.b dan 9.c) memiliki karakteristik yang hampir sama yakni dalam satu *clump* (gumpalan) kalus terdapat beberapa macam kalus yang berbeda. Kalus yang didapatkan berwarna bening kecoklatan, transparan (*glossy*),

sebagian tampak kering remah, putih susu, ada yang tampak basah yang mengindikasikan tumbuhnya kalus yang embriogenik dan non embriogenik.

Berbeda dengan karakteristik yang ditunjukkan oleh kalus kelompok kombinasi 2,-4-D dan BAP (gambar 9.d) yakni media D (2,4-D  $3 \text{ mgL}^{-1}$  + BAP  $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ ) dimana kalus tampak berwarna putih, terlihat berserat, kasar, kompak, tidak remah dan *browning* pada beberapa sisi eksplan. Sedangkan kalus yang tumbuh pada media E (2,4-D  $4,5 \text{ mgL}^{-1}$  + BAP  $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ ) terlihat berwarna bening, pada ujung tampak putih licin, tidak transparan dan kompak serta beberapa bagian berwarna coklat kehitaman yang menunjukkan indikasi *browning* (Gambar 9.e).

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

Perkembangan kalus tebu PS 881 pada minggu ke-5 kalus berbeda dengan SUT *Event 02* (Gambar 10). Kalus tebu PS 881 berkembang sangat cepat sehingga lebih kompeten untuk memunculkan tunas terutama pada perlakuan media D (2,4-D  $3 \text{ mgL}^{-1}$  + BAP  $1,5 \text{ mgL}^{-1}$ ). Tanaman PS 881 lebih responsif untuk beregenerasi terhadap pemberian kombinasi 2,4-D dan BAP dibandingkan dengan SUT *Event 02*. Respon varietas berkaitan dengan kemampuan sel dan jaringan setiap varietas atau genotipe tanaman tebu dalam merespon inisiasi pembentukan kalus (Sukmadjadja dan Mulyana, 2011). Hal ini menunjukkan variasi perkembangan kalus pada tahap induksi dipengaruhi oleh perbedaan varietas atau genotipe tanaman (Figuroa *et al.*, 2006; Naz *et al.*, 2008; Gill *et al.*, 2014).

Kalus yang terbentuk dari tebu PS 881 di kelompok media induksi 2,4-D tunggal yakni B (2,4-D  $3 \text{ mgL}^{-1}$ ) tampak bening kecoklatan, basah, dan muncul dari bagian eksplan yang mengalami *browning* (Gambar 10.b) sedangkan pada media C

(2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup>) kalus tampak bening, *glossy*, sedikit kecoklatan dan memiliki beberapa calon tunas yang tumbuh pada *clump* kalus (Gambar 10.c).

Kalus yang terdapat pada kelompok media kombinasi 2,4-D dan BAP yakni media D (2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>) juga menunjukkan kalus dengan ciri – ciri tampak berwarna bening, remah, sedikit kecoklatan (Gambar 10.d) yang berbeda dengan kalus tebu pada media E (2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>) dimana terlihat berwarna bening, sebagian tampak putih licin, tidak transparan dan kompak serta beberapa bagian berwarna coklat kehitaman yang menunjukkan bagian yang *browning* (Gambar 10.e).

Hasil pengamatan kalus pada akhir tahap induksi menunjukkan bahwa kalus yang terdapat pada media B, C, dan E pada tebu SUT *Event 02* dapat lolos ke tahap selanjutnya, yakni tahap proliferasi. Hasil perkembangan eksplan pada media A tidak disubkultur ke media proliferasi kalus dikarenakan mengalami organogenesis langsung sedangkan media D tidak lolos ke tahap proliferasi kalus dikarenakan kalus yang dihasilkan tidak berkembang sehingga tidak layak untuk dipindah ke tahap selanjutnya.

Perkembangan tebu PS 881 pada minggu ke-5 kalus mengalami perkembangan sangat cepat dibandingkan tebu SUT *Event 02* sehingga lebih kompeten untuk memunculkan tunas terutama pada perlakuan media C (2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup>) dan D (2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>). Hasil induksi pada media B,C,D dan E kemudian di subkultur pada media proliferasi dengan memisahkan bagian tunas dan kalusnya untuk memaksimalkan pertumbuhan sel – sel embriogenik.

### 4.2.2 Proliferasi kalus

Sel embriogenik dari hasil induksi kalus selanjutnya distimulasi untuk membentuk embrio somatik dengan mensubkultur pada media proliferasi yakni media MS yang mengandung 2,4-D 1,5 mgL<sup>-1</sup> + prolin 560 mgL<sup>-1</sup>+ casein hidrolisat 300 mgL<sup>-1</sup>. Sel dalam tahap proliferasi pada penelitian ini disubkultur pada media kultur dengan konsentrasi 2,4-D lebih rendah seperti yang dilaporkan oleh Figueroa *et al.*, (2006); Jimenez, (2001) untuk mengoptimalkan pembentukan tahapan somatik embriogenesis (Ho and Vasil, 1983). Pemberian prolin ditambahkan pada media

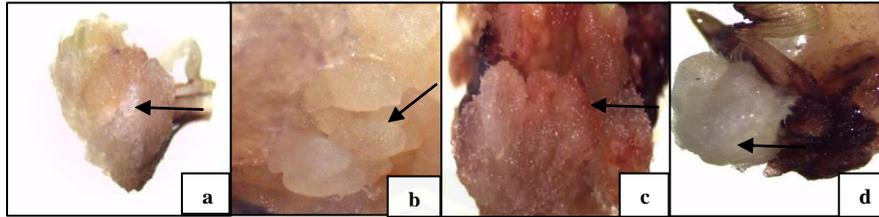
proliferasi untuk dalam meningkatkan somatik embriogenesis pada tebu (Gill *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2011).

Kalus yang ditumbuhkan pada media proliferasi kemudian diamati pertumbuhan kalusnya. Pengamatan morfologi kalus pada tahap proliferasi difokuskan untuk mengamati karakteristik kalus embriogenik yang akan berdiferensiasi menjadi tahapan – tahapan somatik embriogenesis. Hasil pengamatan morfologi kalus menunjukkan adanya karakteristik kalus embriogenik dan non embriogenik pada kedua tebu SUT *Event 02* dan PS 881. Perbedaan morfologi kalus pada kedua tebu dapat dilihat pada Gambar 11 dan Gambar 12.

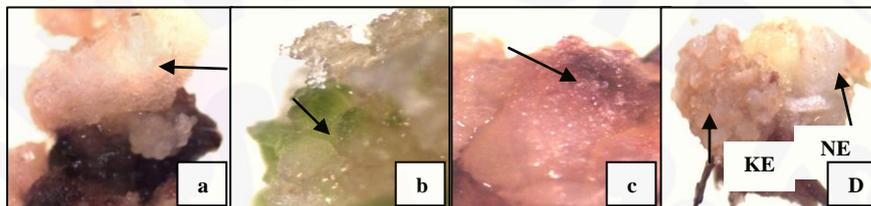
Pembentukan somatik embrio dihasilkan dari kalus embriogenik pada media proliferasi. Hasil pengamatan didapatkan kalus non embriogenik dengan ciri - ciri struktur kompak, putih atau putih susu, licin, tidak transparan, warna coklat cenderung kehitaman. Kalus non embriogenik tersebut tidak dapat berkembang menjadi kalus dan beregenerasi menjadi tanaman.

Beberapa kalus pada tebu PS 881 ditemukan memiliki stuktur yang embriogenik dan non embriogenik dalam satu *clump* kalus (Gambar 12.d). Kalus embriogenik (KE) memiliki struktur berbentuk nodular, bening, remah dan kering sedangkan kalus non embriogenik (NE) tidak memiliki struktur nodular, berwarna putih susu, kompak, dan tidak transparan.

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

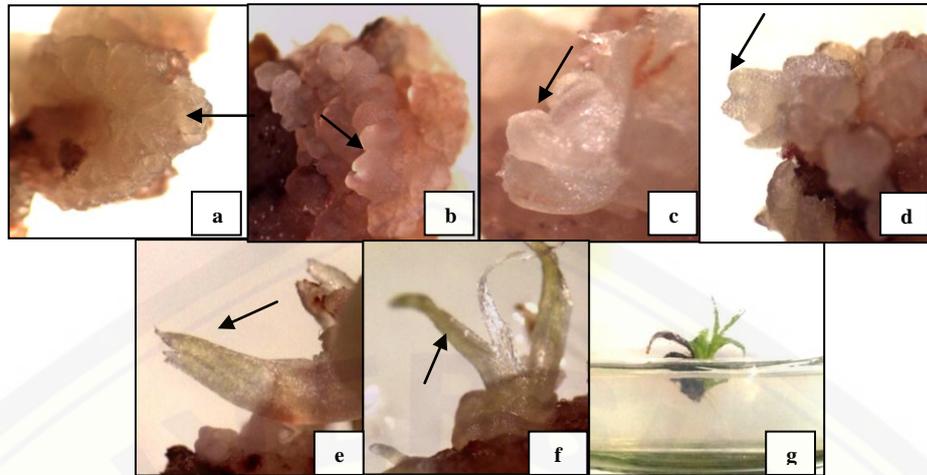


**Gambar 11.** Morfologi kalus tebu SUT *Event 02* embriogenik dan non embriogenik (a) *Pro Embryo Mass* (PEM) (b) Kalus embriogenik memiliki struktur berbentuk nodular, bening, remah dan kering (c) dan (d) Kalus non embriogenik tidak memiliki struktur nodular, basah, berwarna kecoklatan dan sebagian putih susu, kompak, dan tidak transparan.

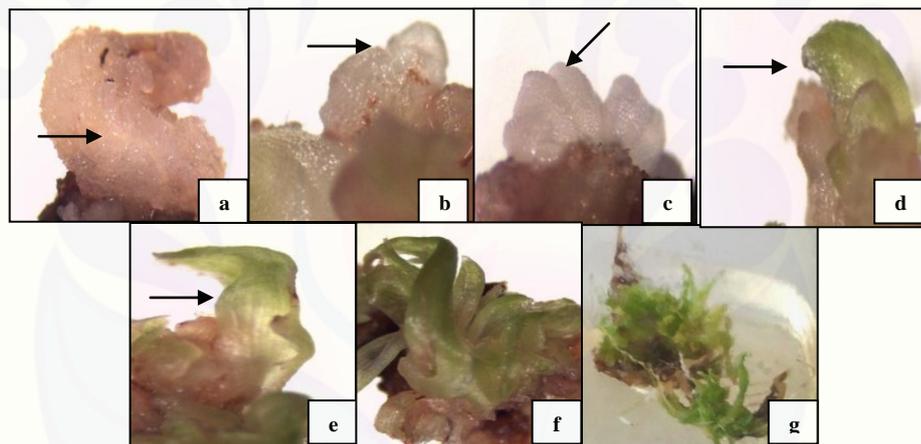


**Gambar 12.** Morfologi kalus tebu PS 881 embriogenik dan non embriogenik (a) *Pro Embryo Mass* (PEM) (b) Kalus embriogenik memiliki struktur berbentuk nodular dan bening hingga tampak *green spot* (c) Kalus non embriogenik memiliki struktur basah, berwarna kecoklatan (d) Kalus embriogenik (KE) memiliki ciri – ciri berbentuk nodular, bening, remah dan kering dan non embriogenik (NE) memiliki ciri – ciri tidak memiliki struktur nodular, berwarna putih susu, kompak, dan tidak transparan dalam satu *clump*.

Tahapan awal pembentukan massa embrio diawali dengan terbentuknya *pro embryo mass* (PEM) atau *pro globular* pada kalus embriogenik yang memiliki struktur *glossy*, transparan, dan kering (Gambar 11.a dan 12.a). *Pro embryo mass* (PEM) selanjutnya akan berkembang menjadi kalus embriogenik yang berbentuk nodular, *glossy*, remah, dan kering, serta transparan pada tebu SUT *Event 02* (Gambar 11.b) sedangkan pada tebu PS 881 ada sedikit perbedaan ciri – ciri yakni adanya *green spot* pada kalus embriogenik (Gambar 12.b).



**Gambar 13.** Morfologi tahapan – tahapan somatik embriogenesis tebu SUT *Event 02*.(a) *Pro embrio mass* (b) *Globular* (c) *Scutellar* (d) *Koleoptil* (e) *Kotiledon* (f) *Tunas* (g) *Tunas hasil regenerasi*



**Gambar 14.** Morfologi tahapan – tahapan somatik embriogenesis tebu PS 881.(a) *Pro embrio mass* (b) *Globular* (c) *Scutellar* (d) *Koleoptil* (e) *Kotiledon* (f) *Tunas* (g) *Tunas hasil regenerasi*

Tahapan masa inkubasi di media proliferasi memicu struktur pro embrio pada kalus embriogenik berkembang menjadi somatik embrio melalui tahapan – tahapan seperti terbentuknya embrio zigotik. Hasil tahapan proliferasi setelah 2 minggu masa inkubasi didapatkan hasil adanya tahapan – tahapan SE yang terbentuk dari kedua tebu baik SUT *Event 02* maupun PS 881. Morfologi tahapan – tahapan SE selanjutnya diamati secara mikroskopik hingga 4 minggu dengan menggunakan mikroskop stereo untuk memperjelas hasil pengamatan.

Tahapan somatik embriogenesis tanaman tebu SUT *Event 02* dan PS 881 meliputi globular, scutellar, koleoptilar dan kotiledon. Morfologi tahapan – tahapan somatik embriogenesis seperti globular, scutellar, dan koleoptil dapat diamati pada permukaan kalus embriogenik. Tahapan – tahapan somatik embriogenesis terjadi dalam waktu yang singkat dan kemampuannya menurun seiring lamanya durasi inkubasi pada medium (Roy *et al.*, 2011). Tahapan – tahapan SE yang didapatkan pada masa inkubasi dalam media proliferasi ditunjukkan pada Gambar 13 dan 14.

Tahapan globular muncul setelah adanya pembelahan sel yang ditandai dengan adanya stuktur nodular dan memiliki suspensor. Kalus nodular selanjutnya akan berkembang menjadi calon tunas terminal (*terminal leaf node*) yang berupa scutelum ditandai dengan adanya scutelar node. Scutelum terdiri dari banyak sel yang kaya sitoplasma dengan bentuk yang masih belum teratur. Perkembangan scutelum menjadi tahap selanjutnya yakni koleoptil ditandai dengan semakin meningkatnya lapisan sel hingga terbentuk koleoptil (Alcantara *et al.*, 2014).

Perkembangan koleoptil dari kalus dapat dijadikan sebagai bahan enkapsulasi untuk produksi benih sintetis tanaman tebu. Tahap koleoptil memiliki potensi untuk dijadikan sebagai bahan untuk enkapsulasi benih sintetis dikarenakan bersifat meristematik. Sifat meristematik berpotensi untuk mendukung perkembangan jaringan tanaman untuk menjadi tanaman yang lengkap.

Tahapan kotiledon merupakan hasil perkembangan dari tahap koleoptil yang didapatkan pada akhir tahap pendewasaan dimana koleoptil tampak terarah perkembangannya menjadi struktur yang lengkap dengan calon tunas dan akar atau bipolar (Purnamaningsih, 2002).

Kedua tebu SUT *Event 02* maupun PS 881 memiliki karakteristik tahapan – tahapan SE yang berbeda. Perbedaan yang menonjol dapat dilihat bahwa pada tebu PS 881 sudah muncul *green spot* pada saat perkembangan somatik embriogenesis meskipun masih berada pada tahap proliferasi di ruang gelap. Keberadaan *green spot* ini umumnya dapat menghasilkan calon daun dan batang yang dapat beregenerasi secara normal (Khan *et al.*, 2004).

Berbeda dengan tebu SUT *Event 02* yang belum menampakkan perkembangan *green spot*. Setelah dikeluarkan pada media inkubasi induksi dan regenerasi yang

tanpa cahaya pada tahap regenerasi, tebu SUT *Event 02* baru menunjukkan tanda – tanda perkembangan *green spot*. Calon tunas yang sudah tumbuh besar yang ditandai dengan kemunculan calon akar menjadi indikasi bahwa *clumps* tunas siap dipindahkan ke media regenerasi.

Hasil proliferasi asal media induksi B dan C tebu SUT *Event 02* dapat lolos sedangkan asal media induksi E tidak menunjukkan potensi yang baik untuk beregenerasi. Berbeda dengan tebu PS 881 didapatkan hasil bahwa eksplan yang berhasil lolos asal media induksi D. Kalus hasil proliferasi tebu PS 881 pada media B dan C tidak berkembang menjadi tahapan – tahapan somatik embriogenesis dan memiliki daya regenerasi kurang maksimal.

## 4.2.1 Regenerasi Planlet

Potensial regenerasi dari kalus spesifik sangat tergantung genotipe yang bersamaan dengan konsentrasi dan kombinasi komposisi media regenerasi (Behera and Sahoo, 2009) dimana tebu SUT *Event 02* maupun PS 881 memiliki ciri - ciri spesifik tersendiri. Setiap *clumps* kalus pada media proliferasi memiliki respon yang berbeda – beda terhadap pertumbuhan tunas baik dari tebu SUT *Event 02* maupun PS 881. Eksplan yang lolos pada tahap regenerasi tidak semua berasal dari kalus hasil tahap proliferasi. Calon tunas yang tumbuh hasil perkembangan kalus selanjutnya dapat dipindah ke media regenerasi. Media regenerasi yang digunakan hanya mengandung komposisi MS (Murashige and Skoog) tanpa penambahan zat pengatur tumbuh.

### 4.2.1.1 Regenerasi Planlet tebu SUT *Event 02*

Penelitian kali ini menghasilkan tanaman hasil regenerasi melalui dua jalur yang berbeda yakni somatik organogenesis langsung dan somatik embriogenesis tidak langsung. Berdasarkan hasil pengamatan tahap regenerasi dari jalur somatik embriogenesis tidak langsung, didapatkan hasil bahwa kalus yang berasal dari media induksi B (2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup>) tebu SUT *Event 02* menunjukkan potensi regenerasi terbaik dibandingkan asal media induksi lainnya. Kalus asal media induksi C (2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup>) dapat lolos hingga tahap regenerasi dan memiliki potensi membentuk kalus

embriogenik namun daya regenerasi lebih rendah dibandingkan kalus asal media induksi B sedangkan kalus asal media induksi D dan E tidak lolos hingga tahap regenerasi.

Berdasarkan hasil pengamatan parameter waktu induksi tunas didapatkan hasil bahwa nilai rata - rata waktu induksi tunas tercepat, jumlah planlet terbanyak, dan tinggi planlet terbaik dihasilkan tebu SUT *Event 02* asal media induksi B (2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup>). Waktu terbentuknya tunas yang cepat dari tahap koleoptil yang sudah muncul calon tunas asal media proliferasi menunjukkan bahwa eksplan memiliki sifat meristematik dan berada dalam kondisi optimum untuk berkembang pada tahap perkecambahan (regenerasi).

Hasil perhitungan rata – rata jumlah planlet menunjukkan bahwa hasil jumlah planlet terbanyak didapatkan dari asal media induksi B pada tebu SUT *Event 02* diikuti dengan planlet dari asal media C demikian juga dengan parameter jumlah planlet yang diamati pada planlet sudah memenuhi kriteria tinggi planlet minimal 1cm. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> optimum untuk perkembangan kalus pada tahap induksi sehingga memacu kemampuan kalus untuk beregenerasi lebih baik dalam waktu 9 minggu dibandingkan dengan pemberian konsentrasi 2,4-D 4,5 mgL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.1.1 Regenerasi Planlet tebu PS 881

Berdasarkan hasil pengamatan tahap regenerasi dari jalur somatik embriogenesis tidak langsung, perlakuan terbaik didapatkan dari kalus yang berasal dari D (2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup> + BAP 1,5 mgL<sup>-1</sup>). Respon tahap regenerasi tebu PS 881 pada dasarnya dihasilkan dari eksplan asal media D dan E. Eksplan asal media induksi E dapat lolos hingga tahap regenerasi namun pada rentang pengamatan 2,5 bulan waktu pengamatan tahap regenerasi, belum ada tanda – tanda pertumbuhan tunas baru sehingga data tidak tersedia (*not available*).

Kalus asal media induksi B (2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup>) dan C (2,4-D 3 mgL<sup>-1</sup>) pada tebu PS 881 hanya lolos hingga tahap proliferasi dan tidak dapat berlanjut ke tahap regenerasi dikarenakan memiliki daya regenerasi rendah karena perkembangan kalus

stagnan akibat *browning* dan sifat kalus yang sulit untuk beregenerasi menjadi calon tunas.

Respon pertumbuhan tanaman yang baik pada media regenerasi dicirikan dengan kemampuan tanaman untuk menghasilkan tunas – tunas baru. Hal tersebut menunjukkan bahwa tanaman mampu tumbuh dengan baik. Hasil pengamatan pada tahap regenerasi menunjukkan bahwa waktu induksi tunas tebu PS 881 pada asal media induksi D lebih cepat dibandingkan perlakuan terbaik dari tebu SUT *Event 02* yakni 8 hari masa inkubasi di media regenerasi.

Namun untuk parameter jumlah planlet PS 881 lebih sedikit dibandingkan dengan tebu SUT *Event 02* dikarenakan karakteristik dari tebu PS 881 sendiri yang cenderung menghasilkan banyak tunas baru yang kecil – kecil namun belum bisa dihitung sebagai planlet dikarenakan belum memenuhi kriteria minimal. Pertumbuhan planlet hasil regenerasi PS 881 juga tidak seragam dari pengamatan tinggi planlet, dimana hal ini merupakan perbedaan spesifik kondisi eksplan bersamaan dengan pengaruh genotipe dan kombinasi komposisi media yang diberikan (Behera and Sahoo, 2009).

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan data yang telah dianalisis dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

5. Pemberian 2,4-D tunggal dengan konsentrasi  $3 \text{ mgL}^{-1}$  dan  $4,5 \text{ mgL}^{-1}$  memberikan respon induksi kalus paling baik pada tebu SUT *Event 02* maupun PS 881.
6. Pemberian 2,4-D tunggal dengan konsentrasi  $3 \text{ mgL}^{-1}$  memberikan hasil terbaik untuk regenerasi planlet tebu SUT *Event 02* sedangkan pemberian kombinasi 2,4-D  $3 \text{ mgL}^{-1}$  + BAP  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  memberikan hasil terbaik untuk regenerasi planlet tebu varietas PS 881.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, ada beberapa saran dapat dijadikan sebagai bahan perbaikan, diantaranya adalah sebagai berikut:

1. Kalus hasil proliferasi dapat dioptimalkan pertumbuhannya dengan mensubkultur pada media cair untuk mengurangi resiko *browning* akibat subkultur dan untuk merangsang pertumbuhan *single cell* yang dapat mengoptimumkan pembentukan somatik embriogenesis.
2. Penggunaan eksplan basal *in vitro* perlu disiapkan dalam jumlah banyak untuk menghasilkan kalus lebih banyak dan optimal sehingga hasil somatik embrio yang dihasilkan lebih banyak.

DAFTAR PUSTAKA

- Auge, R., J. Boccon-Gibod., H. Vidalie., R. Jalouzot., G. Beauchesne., D.G. Strullu., L. Decourtye., and R. Minier. 1995. *In Vitro Culture and Its Applications in Horticulture*. Science Publishers, Inc. USA.
- Ali, S., J. Iqbal., and M.S. Khan. 2010. Genotype Independent *In Vitro* Regeneration System in Elite Varieties of Sugarcane. *Pak. J. Bot.* 42(6):3783-3790.
- Ali, S and J. Iqbal. 2010. Facile Regeneration Through Adventive / Somatic Embryogenesis from *In Vitro* Cultured Immature Leaf Segments of Elite Varieties of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Biologia (Pakistan)*. 56(1&2):55-62.
- Ali, S., M.S. Khan, and J. Iqbal. 2012. *In Vitro* Direct Plant Regeneration From Cultured Young Leaf Segment of Sugarcane (*Saccharum officinarum*L.). *J. Anim. Plant Sci.* 22(4):1107-1112
- Alcantara, G.B., R. Dibax., R.D. Oliveira., J.C.B. Filho., and E. Daros. 2014. Plant Regeneration and Histological Study of the Somatic Embryogenesis of Sugarcane (*Saccharum* spp). Cultivar RB855156 and RB72454. *Acta. Sci. Agron.* 36(1):63-72.
- Anjum, N., S. Ijaz., I.A. Rana., T.M.Khan., I.A.Khan., M.N. Khan., G. Mustafa., F.A.Joiya., and A. Iqbal. 2012. Establishment of an *In Vitro* Regeneration System as a Milestone for Genetic Transformation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) against *Ustiligo scitaminea*. *Bioscience Methods.* 3(2):7-20.
- Asad, S., M. Arshad., S. Mansoor., and Y. Zafar. 2009. Effect of Various Amino Acid on Shoot Regeneration of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *African J. Biotech.* 8(7):1214-1218.
- Behera, K.K and Sahoo. 2009. Rapid *In Vitro* Micro propagation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.CV-Nayana) Trough Callus Culture. *Nature Science.* 7(4):1-10.
- Departemen Perindustrian. 2009. *Roadmap Industri Gula*. Direktorat Jendral Industri Agro dan Kimia.
- Desai, N.S., P. Suprasanna., and V.A. Bapat. 2004. Simple and Reproducible Protocol for Direct Somatic Embryogenesis form Cultured Immature Inflorescence Segments of Sugarcane (*Saccharum* spp.). *Current Science.* 87(6):764-768.
- Dibax, R., G.B. Alcantara., M.P. Machado, J.C.B. Filho., and R.A. Oliveira. 2012. Protocol Optimization and Histological Analysis of *In Vitro* Plant Regeneration of RB92579 and RB93509 Sugarcane Cultivars. *Ciencia Rural*

*Santa Maria*. Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) Laranjeiras, PR, Brasil.

- Falco, M.C., B.M.J. Mendes., and A. T. Neto. 1996. Cell Suspension Culture of Sugarcane; Growth, Management, and Plant Regeneration. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 8(1):1-6.
- Figuroa, F.R.Q., R.R. Herera., R.M.G. Avalos., V.M.L. Vargas. 2006. Embryo Production Through Somatic Embryogenesis Can Be Used to Study Cell Differentiation in Plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 86:285-301.
- Gandonou, Ch., T. Errabii, J. Abrinii, M. Idaomari, F. Chibi, and N.S. Senhaji. 2005. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). *African J. Biotechnol.* 4(11):1250-1255.
- Gaspar, T., C. Kevers., C. Penel., H. Greppin., D. M. Reid., and T. A. Thorpe. 1996. Plant Hormones and Plant Growth Regulators In Plant Tissue Culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32:272-289.
- Gill, N. K., R. Gill, and S S Gosal. 2004. Factor Enhancing Somatic Embriogenesis and Plant Regeneration in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Indian J Biotechnol.* 3:119-123.
- Hussein, S., R. Ibrahim., A. L. P. Kiong. 2006. Somatic Embryogenesis: An Alternative Method for In Vitro Micropopagation. *Iranian Journal of Biotechnology.* 4(3):156-161.
- Ho, WJ and I. K. Vasil. 1983. Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). The Morphology and Physiology of Callus Formation and the Ontogeny of Somatic Embryos. *Protoplasma.* 118:169-180.
- Ikram-ul-Haq and S. Memon. 2012. Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum*. L) cultivar CPF-237. *Afr. J. Biotechnol.* 11(15): 3704-3708.
- Indarwanto, C., Purwono., Siswanto., M. Syakir., dan W. Rumini. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Tebu*. Eska Media. Jakarta.
- Islam, Md.A., Md. E. Haque., S. Md. M. Alam., Md. A. Islam., Md. Khalekuzzaman.,B. Sikdar. 2013. Morphological and Histological Observation of Embryogenic Calli Derived from Immature Embryo of BRR1 Dhan28 (*Oryza sativa* L.) Variety. *Plant Biology.* 3(5):21-27.

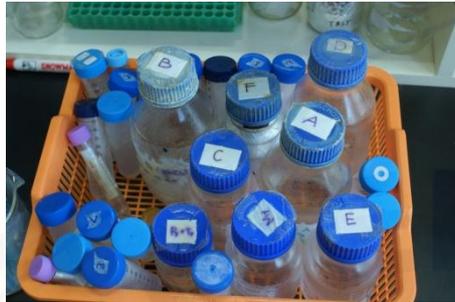
- Jahangir, G.Z and I.A. Nasir. 2010. Various Hormonal Supplementations Active Sugarcane Regeneration *In-Vitro*. *J. Agr. Sci.* 2(4):231-237.
- Jiménez,V.M. 2001. Regulation of *In Vitro* Somatic Embryogenesis with Emphasis on the Role of Endogenous Hormones. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13(2):196-223.
- Khadke, S and A. Kuvalekar. 2013.Direct Somatic Embriogenesis and Plant Regeneration From Leaf and Stem Eksplan of *N. foetida* : A Critically Endangered Plant Species. *Int. J. Plant, Animal, and Enviromental Sciences.*3.(1):257-264.
- Malabadi R.B., G.S. Mulgund., K. Nataraja., and S.V. Kumar. 2011. Induction of Somatic Embryogenesis in Different Varieties of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Research in Plant Biology.* 1(4):39-48.
- Marlina, N dan D. Rusnandi. 2007. Teknik Aklimatisasi Planlet Anhurium pada Beberapa Media Tanam. *Teknik Pertanian.*12(1):38-40.
- Marlina, Nina. 2009. Teknik Perbanyak Lili dengan Kultur Jaringan. *Teknik Pertanian.*14.(1):6-8.
- Mayang, R.B., D. Hapsoro., dan Yusnita. 2011. Regenerasi *In Vitro* Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.): Induksi dan Proliferasi Kalus, serta Induksi Tunas. *Agrotropika.* (16)2:52-56.
- Mustafa, G and M.S. Khan. 2012. Reproducible *In vitro* Regeneration System for Purifying Sugarcane Clones. *Afr. J. Biotechnol.* 11(42):9961-9969.
- Nawaz, M., I. Ullah., N. Iqbal., M. Z. Iqbal., and M.A. Javed. 2013. Improving In Vitro Leaf Disk Regeneration System of Sugarcane (*Saccharum officinarum*L.) with Cocurrent Shoot / Root Induction from Somatic Embryos. *Turk.J.Biol.* 37:726-732.
- Naz, S., A. Ali., and A. Siddique. 2008. Somatic Embryogenesis and Planlet Formation in Different Varieties of Sugarcane (*Saccharum officinarum*L.) HSF-243 and HSF-245. *Sarhad J. Agric.* 24(4):593-598.
- Niaz, F and A. Quraishi. 2002. Effect of Growth Regulators on the Regeneration Potential of Two Sugarcane Cultivars SPF 213 and CPF 237. *Pak. J. Biol. Sci.* 5(10):1081-1083.
- Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia. 2008. *Deskripsi Varietas Tebu PS 881*. SK Pelepasan Tebu Klon PSBM 88-113 No. 1368/kpts/SR.120/10/2008.
- Puslitbangbun. 2012. *Upaya Pencapaian Swasembada Gula Nasional 2014*. <http://www.litbang.deptan.go.id/berita/one/1185/> diakses 6 September 2013.

- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Agriobio*. 5(2):51-58.
- Rainiyati., A. Chozin., Sudarsono., dan I. Mansyur. 2005. Produksi Bibit Pisang Raja Nangka (*Musa sp*) secara kultur jaringan dengan eksplan anakan dan bunga. *Agronomi*. 9(1):27-31.
- Ramadhan, F. 2014. Eliminasi Virus SCMV ( *Sugarcane Mozaik Virus*) dengan Kemoterapi Ribavirin pada beberapa Event Tebu PRG. SKRIPSI. Fakultas Pertanian. Universitas Jember.
- Raza, S., S. Qamarunisa., M. Hussain., I. Jamil., S. Anjum., A. Azhar., and J.A. Qureshi. 2012. Regeneration Sugarcane via Somatic Embryogenesis and Genomic Instability in Regenerated Plants. *J. Crop Sci. Biotech*. 15(2):131-136.
- Roy, M., M.Hossain., A. Biswas., M.K. Biswas., and R. Islam. 2011. Plant Regeneration through Somatic Embriogenesis from Leaf Sheath Derived Callus Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) var ISD-16. *Plant Tissue Cult. & Biotech*. 21(2):143-149.
- Takahashi, W and T. Takamizo. 2013. Plant Regeneration from Embryogenic Calli of the Wild Sugarcane (*Saccharum spontaneum* .L) Clone “Glagah Kloet”. *Bull NARO Inst Livest Grassl Sci*. 13(23-32).
- Sadat, S., M.S. Hoveize. M. Mojadam., and S. K. Marashi. 2011. The Study Induction and Regeneration Potential of Sugarcane Varieties SP70-1143 and CP76-331. *World Appl. Sci. J*. 13 (5): 1106-1111.
- Santos K.G.B., J. E.A. Mariath., M.C.C. Moco., and M.H.B. Zanettini. 2006. Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.: Ontogeny of Somatic Embryos. *Int. J. Brazilian Archieves of Biology and Technology*. 49(1):49-55.
- Shah, A.H., N. Rashid., M. S. Haider., F. Saleem., M. Tahir., and J. Iqbal. 2009. An Efficient, Short, and Cost- Effective Regeneration System for Transformation Studies of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Pak. J. Bot*. 41(2): 609-614.
- Sugiarto, B and H. Safitri. 2011. A Comparison Studi for *Agrobacterium*- mediated transformation Method in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Ilmu Dasar*. 12(2):140-141.
- Sukmadjaja, D dan Mulyana, A. 2011. Regenerasi dan Pertumbuhan Beberapa Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) secara *In Vitro*. *AgroBiogen*. 7(2):106-118.

- Supriyadi, Ahmad. 1992. *Rendemen Tebu Liku - Liku Permasalahannya*. Kanisius. Yogyakarta.
- Tahir, S.M., K. Victor., and S. Abdulkadir. 2011. The Effect of 2, 4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2, 4-D) Concentration on Callus Induction in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*. 19 (2): 213-217.
- Tiel, K., G.A. Enriquez., A.D. Fuentes., A. Ferreira., Y. Coll., and M. Pujol. 2006. Development of A System for Rapid Plant Regeneration from In Vitro Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Meristematic Tissue. *Biotecnologia Aplicada*. 23(1):22-24.
- Tim Penulis PS. 2000. *Pembudidayaan Tebu di Lahan Sawah dan Tegalan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Vicient, C.M and F.X. Martinez. 1998. The Potential Uses of Somatic Embryogenesis in Agroforestry Are Not Limited to Synthetic Seed Technology. *Revista Brasileira Fisiologia Vegetal*. 10(1):1-12
- Yuwono, T. 2008. *Bioteknologi Pertanian*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi bahan percobaan dan kegiatan penelitian



a. Stok Media MS dan ZPT



b. Planlet tebu SUT *Event 02* (kiri) dan PS 881 (kanan).



c. Eksplan basal tebu *in vitro*



d. Kegiatan subkultur planlet tebu



e. Kegiatan pengamatan mikroskopik

**Lampiran 2. Stok Media MS yang dimodifikasi**

<b>Stok</b>	<b>Jenis Bahan Kimia</b>	<b>Gram</b>	<b>Dilarutkan dalam (ml)</b>	<b>Pengambilan (ml)</b>
<b>A</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,50	1000	20
<b>B</b>	KNO <sub>3</sub>	95,00	1000	20
<b>C</b>	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	22,00	250	5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,31	250	
	KH <sub>2</sub> .PO <sub>4</sub>	8,50		
<b>D</b>	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0013		5
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,0125		
	KI	0,0415		
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	18,50	250	
<b>E</b>	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,43		5
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0013		
	MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7525		
<b>F</b>	Na <sub>2</sub> EDTA	1,86	250	5
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,39		
	Mio-inositol	0,02	100	
<b>Vitamin</b>	Thiamine HCl	0,008	100	5
	Pyridoksi HCl	0,08	100	
<b>Sukrosa</b>		30		
<b>Phytigel</b>		2,5		

**Lampiran 3. Data waktu induksi kalus**

**Parameter : Waktu induksi kalus**

**Desain : RAL Faktorial 2x5**

Varietas	Ul	Media					Jumlah	Rata - rata
		A	B	C	D	E		
SUT 02	1	0	7	7	21	21	56	11,20
	2	0	7	14	30	21	72	14,40
	3	0	14	14	30	30	88	17,60
	Σ	0	28	35	81	72	216	43,20
	x	0,00	9	12	27	24	72	14,40
PS881	1	0	7	7	21	21	56	11,20
	2	0	7	14	30	21	72	14,40
	3	0	7	14	30	30	81	16,20
	Σ	0	21	35	81	72	209	41,80
	x	0,00	7	12	27	24	70	13,93
TOTAL		0	49	70	162	144	425	141,7

**Sidik Ragam**

SK	DB	JK	KT	F Hitung		F Tabel	
						0,05	0,01
Perlakuan	9	3034,17	337,13	21,47			
Varietas	1	1,63	1,63	0,10	ns	4,35	8,10
Media	4	3026,00	756,50	48,18	**	2,87	4,43
A >> B,C,D,E	1	3010,42	3010,42	191,75	**	4,35	8,10
BC >> DE	1	2914,08	2914,08	185,61	**	4,35	8,10
B >> C	1	73,50	73,50	4,68	*	4,35	8,10
D >> E	1	54,00	54,00	3,44	ns	4,35	8,10
Varietas x media	4	6,53	1,63	0,10	ns	2,87	4,43
Error	20	314,00	15,70				
Total	29	3348,17	115,45				

Keterangan : \*\*= Berbeda sangat nyata, \*=Berbeda nyata, ns=berbeda tidak nyata  
CV= 0,27 %

**Uji lanjut dengan kontras orthogonal**

**Tabel dua arah**

Perlakuan	Varietas		Jumlah perlakuan
	SUT 02	PS 881	
A	0	0	0
B	28	21	49
C	35	35	70
D	81	81	162
E	72	72	144
Jumlah	216	209	425

**Ma  
trik  
s  
kon  
tra  
s  
ort  
ogo**

**nal terhadap pengaruh macam media**

Kontras	Jumlah perlakuan					$L_i$	$\Sigma k^2 y$
	A	B	C	D	E		
	0	49	70	162	144		
A $\times\times$ B,C,D,E	4	-1	-1	-1	-1	-425	20
BC $\times\times$ DE	0	1	1	-1	-1	-187	4
B $\times\times$ C	0	1	-1	0	0	-21	2
D $\times\times$ E	0	0	0	1	-1	18	2

**Perhitungan jumlah kuadrat**

JK A  $\times\times$  B,C,D,E = 3010,42  
 JK BC  $\times\times$  DE = 2914,08  
 JK B  $\times\times$  C = 73,50  
 JK D  $\times\times$  E = 54,00

**Lampiran 4. Data persentase induksi kalus**

**Parameter : Persentase induksi kalus**

**Desain : RAL Faktorial 2x5**

Varietas	Media	1	2	3	JUMLAH	RATA2
SUT 02	A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	B	100	100	100	300,0	100,0
	C	100	100	67	267,0	89,0
	D	33	0,0	0,0	33,0	11,0
	E	0,0	67	33	100,0	33,3
PS 881	A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	B	100	100	67	267,0	89,0
	C	100	100	100	300,0	100,0
	D	33	0,0	0,0	33,0	11,0
	E	0	33	33	66,0	22,0
Total		466,0	500,0	400,0	1366,0	455,3

**Data hasil transformasi  $\sqrt{(x+0,5)}$**

Varietas	UI	Media					Jumlah	Rata - rata
		A	B	C	D	E		
SUT 02	1	0,71	10,02	10,02	5,79	0,71	27,25	5,45
	2	0,71	10,02	10,02	0,71	8,22	29,68	5,94
	3	0,71	10,02	8,22	0,71	5,79	25,45	5,09
	$\Sigma$	2,13	30,07	28,27	7,20	14,71	82,38	16,48
	x	0,71	10,02	9,42	2,40	4,90	27,46	5,49
PS881	1	0,71	10,02	10,02	5,79	0,71	27,25	5,45
	2	0,71	10,02	10,02	0,71	5,79	27,25	5,45
	3	0,71	8,22	10,02	0,71	5,79	25,44	5,09
	$\Sigma$	2,12	28,27	30,07	7,20	12,29	79,95	15,99
	x	0,71	9,42	10,02	2,40	4,10	26,65	5,33
TOTAL		4,25	58,34	58,34	14,40	27,00	162,33	54,11

**Sidik ragam**

SK	DB	JK	KT	F Hitung		F Tabel	
						0,05	0,01
Perlakuan	9	417,27	46,36	10,87			
Varietas	1	0,20	0,20	0,05	ns	4.35	8.10
Media	4	415,20	103,80	24,33	**	2.87	4.43
A >> B,C,D,E	1	331,71	331,71	77,74	**	4.35	8.10
BC >> DE	1	472,26	472,26	110,68	**	4.35	8.10
B >> C	1	0,00	0,00	0,00	ns	4.35	8.10
D >> E	1	26,43	26,43	6,19	*	4.35	8.10
Varietas x media	4	1,87	0,47	0,11	ns	2.87	4.43
Error	20	85,34	4,27				
Total	29	502,61	17,33				

Keterangan : \*\*= Berbeda sangat nyata, \*=Berbeda nyata, ns=berbeda tidak nyata  
CV= 0,38 %

**Uji Lanjut Dengan Kontras Orthogonal**

**Tabel dua arah**

Perlakuan	Varietas		Jumlah perlakuan
	SUT 02	PS 881	
A	2,10	2,12	4,22
B	30,07	28,27	58,34
C	28,27	30,07	58,34
D	7,20	7,20	14,40
E	14,71	12,28	26,99
Jumlah	82,35	79,94	162,29

Kontras	Jumlah perlakuan					Li	Σk <sup>2</sup> y
	A	B	C	D	E		
	4,25	58,34	58,34	14,40	27,00		
A >> B,C,D,E	4	-1	-1	-1	-1	141,08	20
BC >> DE	0	1	1	-1	-1	75,28	4
B >> C	0	1	-1	0	0	0,00	2
D >> E	0	0	0	1	-1	-12,59	2
JK A >> B,C,D,E =	331,71		JK B >> C =		0,00		
JK BC >> DE =	472,26		JK D >> E =		26,43		

**Lampiran 5.** Data waktu induksi tunas, jumlah planlet, dan tinggi planlet hasil induksi MS0 umur 5-6 minggu melalui somatik organogenesis

1. Data waktu pembentukan tunas (hari ke-)

Varietas	Media	1	2	Jumlah	Rata2	STDEV	SEM
SUT 02	A	4	7	11	5,5	2,12	1,50
PS 881		4	4	8	4	0	0

2. Data jumlah planlet

Varietas	Media	1	2	Jumlah	Rata2	STDEV	SEM
SUT 02	A	6	8	14	7	1,41	1
PS 881		9	7	16	8	1,41	1

3. Data tinggi planlet (cm)

Varietas	Media	1	2	Jumlah	Rata2	STDEV	SEM
SUT 02	A	2,7	3,58	6,28	3,14	0,62	0,44
PS 881		3,4	3,83	7,23	3,61	0,30	0,21

**Lampiran 6.** Data waktu pembentukan tunas hasil regenerasi (hari ke-)

Varietas	Media	1	2	JUMLAH	RATA2	STDEV	SE
SUT 02	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	B	9,00	14,00	23,00	11,50	3,54	2,5
	C	14,00	73,00	87,00	43,50	41,72	29,5
	D	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	E	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PS 881	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	B	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	C	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	D	8,00	8,00	16,00	8,00	0,00	5,7
	E	54,00	54,00	108,00	54,00	0,00	0

**Lampiran 7.** Data jumlah planlet hasil regenerasi

Varietas	Media	1	2	JUMLAH	RATA2	STDEV	SE
SUT 02	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	B	48	23	71	35,5	17,68	12,5
	C	21	20	41	20,5	0,71	0,5
	D	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	E	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PS 881	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	B	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	C	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	D	14	7	21	10,5	4,95	3,5
	E	NA	NA	NA	NA	NA	NA

**Lampiran 8.** Data tinggi planlet hasil regenerasi (cm)

Varietas	Media	1	2	JUMLAH	RATA2	STDEV	SE
SUT 02	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	B	2,1	2,96	5,06	2,53	0,60811	0,43
	C	1,57	0	1,57	0,785	1,11	0,79
	D	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	E	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PS 881	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	B	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	C	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	D	1,24	3,05	4,29	2,145	1,28	0,74
	E	NA	NA	NA	NA	NA	NA

**Lampiran 9. Deskripsi varietas PS 881**

**DESKRIPSI TEBU VARIETAS PS 881**

**SK Pelepasan**

Nomor : 1368/kpts/SR.120/10/2008

Tanggal : 8 Oktober 2008

Tentang : Pelepasan Tebu Klon PSBM 88-113

**Asal persilangan**

persilangan dari BQ 33 polycross

**Sifat-sifat morfologis**

1. Batang

- Bentuk ruas : tersusun lurus, berbentuk konis sampai silindris
- Warna batang : hijau kecoklatan
- Lapisan lilin : tebal mempengaruhi warn ruas
- Teras dan lubang : kecil
- Alur mata : tidak ada

2. Daun

- Helai daun : hijau
- Warna daun : segitiga daun warna hijau kecoklatan
- Warna pelepah daun : hijau agak kecoklatan
- Ukuran lebar daun : lebar dengan helaian tegak
- Telinga daun : ada, tinggi, kedudukan serong
- Bulu bid. punggung : ada jarang, kedudukan rebah
- Daun tua : mudah lepas

3. Mata

- Letak mata : pada pangkal pelepah daun
- Bentuk mata : bulat, melebar pada tengah mata
- Sayap mata : berukuran sama lebar, dengan tepi sayap rata
- Rambut jambul : tidak ada
- Pusat tumbuh : di atas tengah-tengah mata
- Ukuran : sedang sampai besar

### Sifat-sifat agronomis

#### 1. Pertumbuhan

- Perkecambahan : sedang
- Kerapatan batang : sedang
- Diameter batang : sedang
- Pembungaan : sedang
- Kemasakan : awal
- Kadar sabut : 13,47 %

#### 2. Potensi hasil

- Hasil tebu (ku/ha) :  $949 \pm 241$
- Rendemen (%) :  $10,22 \pm 1,64$
- Hablur gula (ku/ha) :  $95,80 \pm 26,30$

#### 3. Ketahanan Hama dan Penyakit

- Penggerek batang : toleran
- Penggerek pucuk : toleran
- Blendok : tahan
- Leaf scorch : tahan
- Luka api : toleran
- Mosaik : tahan

#### 4. Kesesuaian lokasi

Cocok untuk tipologi lahan tegalan beriklim C2 (Oldeman) dengan jenis tanah Inceptisol, Vertisol dan Ultisol

### Perilaku varietas

Varietas PS 881 sebelumnya dengan nama seri PSBM 88-113, merupakan keturunan hasil persilangan polycross BQ 33 pada tahun 1988. Setelah diseleksi sejak dini di wilayah Bungamayang, dan diuji adaptasi di wilayah Jawa Timur ternyata cocok dikembangkan pada lahan dengan spesifik lokasi Inceptisol, Vertisol dan Ultisol dengan tipe iklim C2 (Oldeman).

Potensi rendemen yang tinggi dengan kategori kemasakan awal giling, dengan pertumbuhan cepat dengan kadar sabut sekitar 13-14%. Secara nyata kemasakan varietas PS 881 lebih cepat dari pada PS 851, dan sedikit lebih awal dari PS 86

Sebagai varietas masak awal, yang penting bahwa selama tanaman telah berumur 8 bulan atau lebih, maka pada bulan Mei-Juni harus sudah ditebang. Sifat pembungaan adalah sedang, oleh karena itu jadwal tebang terhadap varietas ini harus lebih pasti.

### **Keterangan lain**

Nama peneliti : Hermono Budhisantosa, Eka Sugiyarta dan Mirzawan PDN

Pemilik Varietas : Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI)

Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia Jalan Pahlawan No 25 Pasuruan 67126  
Telp. (0343) 421086, Fax (0343) 421178 Email: isri@telkom.net,  
sugarresearch.institute@gmail.com [www.sugarresearch.org](http://www.sugarresearch.org)

## Lampiran 10. Deskripsi tebu SUT *Event 02*

### TEBU SUT *EVENT 02*

#### Asal Genotipe

Planlet tebu SUT *Event 02* didapatkan dari tanaman tebu (*Saccharum spp. Hybrid*) varietas Bulu Lawang produk rekayasa genetika hasil transformasi gen *SoSUT1* yang sudah dikonfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* dalam genome tanaman menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Hasil transformasi didapatkan tebu salah satunya tebu SUT *Event 02*. Hasil tebu transforman ini selanjutnya dikembangkan menjadi tebu transgenik bebas virus melalui proses kemoterapi dengan menggunakan senyawa antiviral sehingga didapatkan planlet tebu bebas virus SCMV.

#### Teknik Eliminasi Virus

Eliminasi virus SCMV dilakukan pada planlet dari hasil propagasi tunas lateral tebu PRG *overekspresi* gen *SoSUT1* *Event 02*. Planlet yang sudah siap diuji disubkultur dalam media antiviral mengandung ribavirin dengan berbagai konsentrasi selama 6 minggu. Tanaman yang sudah diinkubasi dalam media yang mengandung antiviral kemudian diuji dengan menggunakan DAS ELISA.

#### Perbanyak tebu PRG *overekspresi* gen *SoSUT1* *Event 02*

Planlet tebu yang sudah diuji dengan DAS ELISA diperbanyak dengan mensubkultur planlet pada media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Subkultur dilakukan 2 minggu sekali untuk mensuplai kecukupan kebutuhan unsur hara yang diperlukan tanaman.

#### Kriteria eksplan untuk regenerasi tebu SUT *Event 02*

Tunas baru yang sudah berkembang menjadi planlet dengan umur  $\pm 1$  bulan, kemudian diseleksi sesuai dengan kriteria yakni sehat, segar, tinggi  $\pm 1-3$  cm (Ramadhan, 2014).