

## INDUKSI KALUS DAN REGENERASI DUA VARIETAS TEBU (*Saccharum officinarum* L.) SECARA *IN VITRO*

### *Callus Induction and Plant Regeneration of Two Sugarcane Varieties (Saccharum officinarum L.) through In Vitro*

SRI SUHESTI<sup>1)</sup>, NURUL KHUMAIDA<sup>2)</sup>, G.A. WATTIMENA<sup>2)</sup>, MUHAMAD SYUKUR<sup>2)</sup>,  
ALI HUSNI<sup>3)</sup>, ENDANG HADIPOENTYANTI<sup>1)</sup>, dan RR. SRI HARTATI<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat  
Jalan Tentara Pelajar No. 3, Bogor16111

<sup>2)</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor  
Jalan Meranti Kampus IPB Dramaga, Bogor16680

<sup>3)</sup>Balai Besar Sumberdaya Genetik dan Bioteknologi Pertanian  
Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

<sup>4)</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan  
Jalan Tentara Pelajar No. 1, Bogor 16111

e-mail: nkhumaida@yahoo.com

(Diterima: 4-3-2015; Direvisi: 13-5-2015; Disetujui: 29-5-2015)

#### ABSTRAK

Perbanyakan tebu umumnya dilakukan secara vegetatif menggunakan setek. Teknik ini mempunyai keterbatasan memproduksi jumlah bibit dalam skala besar. Dalam rangka mendukung peningkatan produktivitas, maka perlu pemenuhan bibit tebu dalam skala besar. Kultur jaringan merupakan teknologi alternatif yang dapat dikembangkan untuk pemenuhan bibit dalam jumlah yang banyak. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan formulasi media terbaik untuk induksi kalus dan regenerasi tebu varietas Kidang Kencana dan PSJT 941. Penelitian dilakukan di Laboratorium Unit Pengelola Benih Unggul Pertanian, Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Bogor dari bulan Februari sampai September 2012. Penelitian terdiri dari tiga tahap, yaitu induksi kalus, regenerasi tunas dan perakaran, serta aklimatisasi. Bahan tanaman tebu yang digunakan adalah daun muda varietas Kidang Kencana dan PSJT 941 yang masih menggulung. Empat formulasi media digunakan pada tahap induksi kalus. Sementara itu, pada tahap regenerasi tunas dan perakaran menggunakan tujuh formulasi media. Aklimatisasi menggunakan media tanah steril dan kompos (2:1). Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang disusun secara faktorial, terdiri atas dua faktor dan diulang sepuluh kali. Faktor pertama adalah varietas dan kedua adalah formulasi media. Hasil penelitian menunjukkan media induksi kalus terbaik untuk varietas Kidang Kencana adalah 2,4-D 9 µM + Picloram 4,5 µM, sedangkan PSJT 941 adalah 2,4-D 13,5 µM. Media regenerasi dapat digunakan untuk menginduksi tunas sekaligus perakaran. Media regenerasi terbaik varietas Kidang Kencana dan PSJT 941 adalah IBA 2,46 µM + BAP 1,33 µM. Kedua varietas dapat diaklimatisasi di rumah kaca dengan tingkat keberhasilan tinggi (80-100%).

Kata kunci: *Saccharum officinarum*, tebu, kultur jaringan, organogenesis, perbanyakan

#### ABSTRACT

Generally, sugarcane propagation was done by vegetative cuttings. The technique had limitation of producing seeds in a large scale. In order to increase productivity of sugarcane, it is required to provide sugarcane seeds in large scale. Tissue culture is an alternative technique that can be developed to provide the seeds. The objective of this research was to

obtain the best formulations for callus induction and regeneration of Kidang Kencana and PSJT 941 varieties. The study was conducted in the Laboratory of Superior Farm Seeds Management Unit, Indonesian Agency for Agricultural Research and Development, Bogor from February until September 2012. The researches were carried out in three steps, namely callus induction, regeneration of shoots and roots, and acclimatization. Explant material used was young rolled leaves collected from two sugarcane varieties (Kidang Kencana and PSJT 941). Four media formulations used for callus induction, while seven media formulations used for shoots and roots regeneration. Acclimatization used sterile soil and compost (2:1). The experiment arranged in Factorial Completely Randomized Design with two factors and ten replications. The first factor was varieties and second factor was media formulations. The results showed that the best callus induction media for Kidang Kencana was 2,4-D 9 µM + Picloram 4,5 µM, while for PSJT 941 was 2,4-D 13,5 µM. Regeneration media could induce both shoots and roots. The best regeneration media for Kidang Kencana and PSJT 941 were IBA 2,46 µM + BAP 1,33 µM. They could be acclimatized successfully in green house with highly percentage (80-100%).

Key words: *Saccharum officinarum*, sugarcane, tissue culture, organogenesis, multiplication

#### PENDAHULUAN

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan salah satu komoditas perkebunan yang memiliki nilai ekonomi tinggi di dunia dan sangat potensial dikembangkan di negara yang beriklim tropis, seperti Indonesia. Peningkatan produksi tebu di Indonesia diharapkan dapat mendorong perekonomian negara dengan penambahan devisa. Hal ini disebabkan karena 65% produksi gula dunia berasal dari tebu. Selain itu, tebu banyak digunakan sebagai bahan industri farmasi, sumber bahan bakar (*biofuel*), dan produksi beberapa bahan kimia, seperti furfural, dekstran, pakan ternak, selulosa, dan alkohol (DIBAX *et al.*, 2013).

Produksi gula nasional mengalami kemerosotan dalam tiga dasawarsa terakhir ini. Oleh karena itu, perlu dilakukan upaya peningkatan produksi gula, salah satunya melalui pengembangan areal penanaman tebu. Perluasan areal penanaman harus didukung dengan penyediaan bibit yang bermutu dalam skala besar, sekitar 1,5 sampai 2 miliar bibit per tahun (MINARSIH *et al.*, 2013). Perbanyakannya umumnya dilakukan secara vegetatif melalui teknik konvensional dengan menggunakan setek. Di beberapa negara tropis, perbanyakannya menggunakan batang dengan 2 sampai 3 buku (nodus) (JALAJA *et al.*, 2008). Tetapi, metode tersebut memiliki banyak kekurangan, antara lain membutuhkan areal yang luas, tanaman induk dan tenaga yang banyak, tergantung pada musim tanam, serta kontaminasi patogen yang sulit dihindari (SUKMADAJA dan MULYANA, 2011). Selain itu, pembibitan tebu yang dilakukan secara bertingkat juga menyulitkan (MINARSIH *et al.*, 2013).

Teknik kultur jaringan saat ini dipercaya sebagai metode yang tepat dalam mengatasi permasalahan produksi bibit tanaman. Aplikasi kultur jaringan semakin meluas penggunaannya pada tanaman hortikultura, pangan, dan industri, terutama dalam penyediaan bibit secara massal, cepat, murah, dan bebas patogen (BEHERA dan SAHOO, 2009).

Kultur jaringan tebu untuk tujuan perbanyakannya bahan tanam telah banyak dilakukan. Di antaranya, melalui teknologi somatik embriogenesis tidak langsung dengan menggunakan daun menggulung (MEYER *et al.*, 2009; SNYMAN *et al.*, 2009), organogenesis tidak langsung menggunakan daun menggulung (BEHERA dan SAHOO, 2009; DIBAX *et al.*, 2013), meristem apikal (RAMGAREEB *et al.*, 2010; SUKMAJAJA dan MULYANA, 2011), organogenesis langsung menggunakan eksplan daun menggulung (LAKSHMANAN *et al.*, 2006), dan eksplan meristem apikal (DEVARUMATH *et al.*, 2007; RAMGAREEB *et al.*, 2010).

Regenerasi tebu secara umum telah berhasil dilakukan oleh SNYMAN *et al.* (2011). Penggunaan berbagai macam zat pengatur tumbuh (ZPT) telah banyak digunakan dalam kultur jaringan tebu, diantaranya 2,4-D, Picloram, dan Thidiazuron (TDZ) untuk induksi kalus tebu (ABU *et al.*, 2014; CHENGALRAYAN *et al.*, 2005). Untuk regenerasi tunas dan perakaran tebu banyak menggunakan IBA, NAA, IAA, Kinetin, dan BAP dengan berbagai macam konsentrasi (ABU *et al.*, 2014; MUSTAFA dan KHAN, 2012; ALI *et al.*, 2012; BEHERA dan SAHOO, 2009). Regenerasi tanaman melalui kultur jaringan bersifat spesifik. Artinya, formulasi media yang digunakan untuk meregenerasikan varietas tanaman tertentu belum tentu dapat digunakan untuk varietas lainnya (PURNAMANINGSIH, 2006). Setiap genotipe mempunyai respon yang bervariasi di dalam kultur *in vitro* (SNYMAN *et al.*, 2011). Setiap genotipe juga membutuhkan konsentrasi dan ratio ZPT yang tepat untuk meningkatkan efisiensi multiplikasi (KHAN *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2006).

Keberhasilan regenerasi tanaman tebu secara *in vitro* tergantung dari genotipe tanaman, sumber eksplan, dan

formulasi media (BEHERA dan SAHOO, 2009). Oleh karena itu, dibutuhkan pengetahuan dan penguasaan sistem regenerasi setiap varietas tebu secara *in vitro*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan media terbaik untuk perbanyak varietas tebu Kidang Kencana dan PSJT 941 melalui kultur jaringan.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Unit Pengembangan Benih Unggul Perkebunan, Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Bogor dari bulan Februari sampai dengan September 2012. Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun muda yang masih menggulung. Daun tersebut diambil dari bagian paling dalam pucuk tebu. Varietas yang digunakan adalah Kidang Kencana dan PSJT 941. Media dasar yang digunakan adalah Murashige Skoog (MS) (MURASHIGE dan SKOOG, 1962), sedangkan ZPT yang digunakan 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), asam 4-amino-3,5,6-trikloropikolinik (Picloram) (auksin), indolebutiric acid (IBA), naphthaleneacetic acid (NAA), benzylaminopurine (BAP), dan bahan organik kasein hidrolisat (CH). Sebagai sumber karbon digunakan gula 3%. Bahan pematat yang digunakan adalah *phytagel* 0,25%. Penelitian terdiri dari tiga kegiatan, yaitu (1) induksi kalus, (2) regenerasi tunas dan perakaran, serta (3) aklimatisasi.

### Induksi Kalus

Induksi kalus bertujuan untuk mendapatkan kalus embriogenik yang akan diregenerasikan menjadi tunas. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial dengan sepuluh ulangan. Faktor pertama adalah dua varietas tebu, yaitu Kidang Kencana dan PSJT 941. Faktor kedua adalah empat formulasi media, yaitu (1) 2,4-D 13,5  $\mu\text{M}$ ; (2) 2,4-D 9  $\mu\text{M}$  + Picloram 4,5  $\mu\text{M}$ ; (3) 2,4-D 4,5  $\mu\text{M}$  + Picloram 9  $\mu\text{M}$ ; dan (4) Picloram 13,5  $\mu\text{M}$ . Setiap ulangan terdiri dari lima eksplan sehingga terdapat 50 eksplan per perlakuan.

Eksplan disterilisasi dengan cara dicuci menggunakan sabun cuci piring cair (mengandung bahan aktif surfaktan). Eksplan yang telah bersih kemudian dibawa ke *Laminair Air Flow* (LAF) dan direndam dalam alkohol 95% selama  $\pm$  15 menit. Sterilisasi dilakukan dengan cara sterilisasi bakar, yaitu eksplan, berupa potongan daun yang masih menggulung, dicelup dalam alkohol 95% kemudian dilewatkan di atas api bunsen. Pelepeh daun kemudian dikupas per lapis. Pembakaran dan pengupasan setiap lapis pelepeh daun dilakukan kembali sebanyak tiga kali sampai diperoleh eksplan dengan diameter  $\pm$  1 cm. Eksplan kemudian dipotong dengan ukuran tebal  $\pm$  0,5 cm dan dikulturkan pada media sesuai perlakuan. Media dasar yang digunakan adalah MS dengan penambahan kasein hidrolisat 1 g/l, gula 3%, dan *phytagel* 0,25% dengan pH media 5,8. Kultur diinkubasi pada suhu 20-22°C dalam kondisi gelap sampai terbentuk kalus selama 12 minggu.

Subkultur dilakukan setiap empat minggu pada media yang sama sebanyak dua kali. Peubah yang diamati yaitu waktu inisiasi dan persentase eksplan membentuk kalus, persentase kalus embriogenik, diameter, bobot segar, dan visual kalus. Data dianalisis keragamannya dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) pada tingkat kepercayaan 95%. Jika terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilakukan analisis lanjut menggunakan Uji Duncan (*Duncan Multiple Range Test/DMRT*). Analisis menggunakan program SAS (*Statistical Analysis System*) 9.1.3.

### Regenerasi Tunas dan Perakaran

Regenerasi tunas dan perakaran bertujuan untuk meregenerasikan kalus yang diperoleh sehingga membentuk tunas dan akar. Kalus yang digunakan dihasilkan dari media induksi kalus terbaik. Penelitian menggunakan RAL yang disusun secara faktorial dengan sepuluh ulangan. Faktor pertama adalah dua varietas tebu (Kidang Kencana dan PSJT 941). Faktor kedua adalah tujuh formulasi media regenerasi, yaitu (1) MS0/kontrol; (2) IBA 2,46  $\mu$ M + BAP 0,44  $\mu$ M; (3) IBA 2,46  $\mu$ M + BAP 1,33  $\mu$ M; (4) IBA 2,46  $\mu$ M + BAP 2,22  $\mu$ M; (5) NAA 2,69  $\mu$ M + BAP 0,44  $\mu$ M; (6) NAA 2,69  $\mu$ M + BAP 1,33 $\mu$ M; dan (7) NAA 2,69  $\mu$ M + BAP 2,22  $\mu$ M. Setiap ulangan terdiri dari lima eksplan sehingga terdapat 50 eksplan per perlakuan.

Kultur diinkubasi pada suhu 20-22°C dalam terang dengan intensitas cahaya  $\pm$  2000 lux selama 16 jam per hari sampai terbentuk tunas dan akar selama 12 minggu. Subkultur dilakukan setiap empat minggu pada media yang sama sebanyak dua kali sub kultur. Peubah yang diamati yaitu waktu inisiasi tunas, persentase kalus membentuk tunas, jumlah dan tinggi tunas, serta persentase pembentukan akar. Data dianalisis dengan tingkat kepercayaan 95%. Jika terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilakukan analisis lanjut menggunakan Uji Duncan. Analisis menggunakan program SAS 9.1.3.

### Aklimatisasi

Aklimatisasi dilakukan pada planlet yang telah berakar sempurna. Penelitian menggunakan RAL yang disusun secara faktorial dengan 10 ulangan. Faktor pertama adalah dua varietas tebu (Kidang Kencana dan PSJT 941). Faktor kedua adalah asal media regenerasi dari percobaan sebelumnya, yaitu (1) MS0/kontrol; (2) IBA 2,46  $\mu$ M + BAP 0,44  $\mu$ M; (3) IBA 2,46  $\mu$ M + BAP 1,33  $\mu$ M; (4) IBA 2,46  $\mu$ M + BAP 2,22  $\mu$ M; (5) NAA 2,69  $\mu$ M + BAP 0,44  $\mu$ M; (6) NAA 2,69  $\mu$ M + BAP 1,33 $\mu$ M; dan (7) NAA 2,69  $\mu$ M + BAP 2,22  $\mu$ M. Setiap ulangan terdiri dari 3 unit percobaan sehingga terdapat 30 unit percobaan per perlakuan.

Aklimatisasi dilakukan dengan cara plantlet dicuci bersih dengan air mengalir, kemudian ditanam dalam polibag dengan media tanam steril (tanah : pupuk kompos = 2:1) dan disungkup menggunakan plastik transparan. Sungkup dibuka setelah 2 minggu dan plantlet dipelihara selama 1 sampai 1,5 bulan sebelum dipindah tanam ke

lapang. Peubah yang diamati adalah persentase keberhasilan aklimatisasi. Keragaman data dianalisis pada tingkat kepercayaan 95%. Jika terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilakukan analisis lanjut menggunakan Uji Duncan. Analisis menggunakan program SAS 9.1.3.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Induksi Kalus

Respon awal terbentuknya kalus dari eksplan potongan daun tebu adalah membengkaknya daun yang disertai dengan munculnya kalus, terutama di sekitar daerah pemotongan daun. Hal ini kemungkinan disebabkan karena di sekitar areal pelukaan daun terbentuk kalus “cicatrisasi” sebagai respon alami jaringan tanaman yang terluka. Dengan adanya auksin dalam media maka terjadi peningkatan pembelahan dan pertumbuhan sel membentuk kalus.

Hasil analisis statistik pada peubah inisiasi kalus menunjukkan terdapat beda nyata antar perlakuan varietas, formulasi media induksi kalus, dan interaksi nyata antara varietas dan formulasi media (Tabel 1). Respon varietas tebu yang berbeda-beda untuk inisiasi pembentukan kalus pada beberapa formulasi media, diduga berkaitan dengan kemampuan sel dan jaringan setiap varietas untuk merespon ZPT yang diberikan. Hal ini sering disebut sebagai *genotype dependent* (GILL *et al.*, 2004; ABU *et al.*, 2014).

Sel dan jaringan varietas Kidang Kencana mempunyai kemampuan untuk membentuk kalus sekitar 14 sampai 16 hari setelah tanam. Inisiasi pembentukan kalus tercepat terdapat pada perlakuan 2,4-D 13,5  $\mu$ M; 2,4-D 9  $\mu$ M + Picloram 4,5  $\mu$ M; dan 2,4-D 4,5  $\mu$ M + Picloram 9  $\mu$ M. Respon inisiasi pembentukan kalus Kidang Kencana pada ketiga media tersebut berbeda nyata dengan perlakuan media induksi kalus yang hanya mengandung ZPT tunggal Picloram 13,5  $\mu$ M. Respon inisiasi pembentukan kalus pada varietas PSJT 941 terjadi sekitar 16 sampai 21 hari setelah tanam. Inisiasi kalus paling cepat terdapat pada media induksi kalus 2,4-D 13,5  $\mu$ M dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan 2,4-D 9  $\mu$ M + Picloram 4,5  $\mu$ M dan 2,4-D 4,5  $\mu$ M + Picloram 9  $\mu$ M, tetapi berbeda nyata dengan Picloram 13,5  $\mu$ M. Hal ini menunjukkan formulasi media yang mengandung 2,4-D, baik pada perlakuan tunggal maupun kombinasi dengan Picloram, memberikan pengaruh inisiasi kalus yang lebih cepat dibanding perlakuan tunggal Picloram, baik pada varietas Kidang Kencana maupun PSJT 941. Media induksi yang hanya mengandung Picloram 13,5  $\mu$ M memberikan pengaruh inisiasi kalus yang paling lama pada kedua varietas tebu yang digunakan.

Perlakuan media berpengaruh sangat nyata terhadap peubah persentase pembentukan kalus. Namun, hasil analisis statistik juga menunjukkan tidak ada pengaruh yang nyata antar varietas dan tidak terdapat interaksi antara media induksi kalus dengan varietas (Tabel 1). Formulasi perlakuan media induksi kalus yang mengandung 2,4-D

maupun kombinasi 2,4-D dan Picloram tidak memberikan pengaruh nyata terhadap persentase pembentukan kalus (92-99%). Dari ketiga perlakuan media induksi kalus tersebut, pengaruh yang berbeda nyata dengan hanya media yang mengandung Picloram saja menunjukkan pengaruh yang berbeda dan menghasilkan respon pembentukan kalus terendah (82%). Hal ini menunjukkan bahwa 2,4-D memberikan pengaruh lebih kuat dalam pembentukan kalus tebu pada kedua varietas dibandingkan dengan Picloram pada jumlah molekul yang sama (13,5 µM). Hasil ini sesuai dengan BHOJWANI dan RAZDAN (1996) yang menyatakan 2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman, serta sangat efektif untuk inisiasi kalus. Induksi kalus tebu ternyata efektif dengan menggunakan 2,4-D (GANDONOU *et al.*, 2005; ALI *et al.*, 2008). JALAJA *et al.* (2008) menjelaskan pembentukan induksi kalus tebu efektif pada penggunaan media yang mengandung auksin 2,4-D konsentrasi 1 sampai 6 mg/l.

Kalus yang terbentuk mempunyai penampilan embriogenik dan non embriogenik. Penggunaan ZPT yang tepat akan menginduksi pembentukan kalus embriogenik. Kalus embriogenik dicirikan dengan struktur kering, remah, dan berwarna putih susu atau krem, sedangkan non embriogenik dicirikan dengan struktur kalus kompak, basah, dan berwarna bening kecoklatan (GANDONOU *et al.*, 2005). Hasil analisis statistik menunjukkan formulasi media memberikan pengaruh yang sangat nyata pada pem-

bentukan kalus embriogenik. Hasil analisis statistik juga menunjukkan terdapat interaksi yang nyata antara perlakuan media dengan varietas. Tetapi, kedua varietas cenderung mempunyai respon yang sama dalam pembentukan kalus embriogenik. Gambar 1 memperlihatkan media pembentukan kalus embriogenik terbaik varietas Kidang Kencana adalah 2,4-D 9 µM + Picloram 4,5 µM, sedangkan untuk PSJT 941 adalah 2,4-D 13,5 µM. Media terbaik pada masing-masing varietas tersebut berbeda nyata dengan media perlakuan lainnya. Pembentukan kalus embriogenik antar varietas menunjukkan respon yang tidak berbeda nyata pada semua media yang digunakan, kecuali 2,4-D 9 µM + Picloram 4,5 µM. Rerata persentase pembentukan kalus embriogenik pada kedua varietas terbaik ditunjukkan pada perlakuan 2,4-D 9 µM + Picloram 4,5 µM (85%), diikuti 2,4-D 13,5 µM (84,5%), 2,4-D 4,5 µM + Picloram 9 µM (75%), dan paling rendah adalah Picloram 13,5 µM (55,25%). Hal ini menunjukkan penggunaan 2,4-D, baik secara tunggal maupun dikombinasikan dengan Picloram, memberikan pengaruh pembentukan kalus embriogenik yang secara nyata lebih tinggi dibanding Picloram secara tunggal pada kedua varietas. Hasil ini tidak sejalan dengan penelitian TAMBUNAN (2012) yang menyatakan respon eksplan nenas terhadap Picloram lebih baik dibandingkan dengan 2,4-D. Ini menunjukkan setiap jenis tanaman mempunyai respon yang berbeda terhadap ZPT tertentu dalam formulasi media yang digunakan.

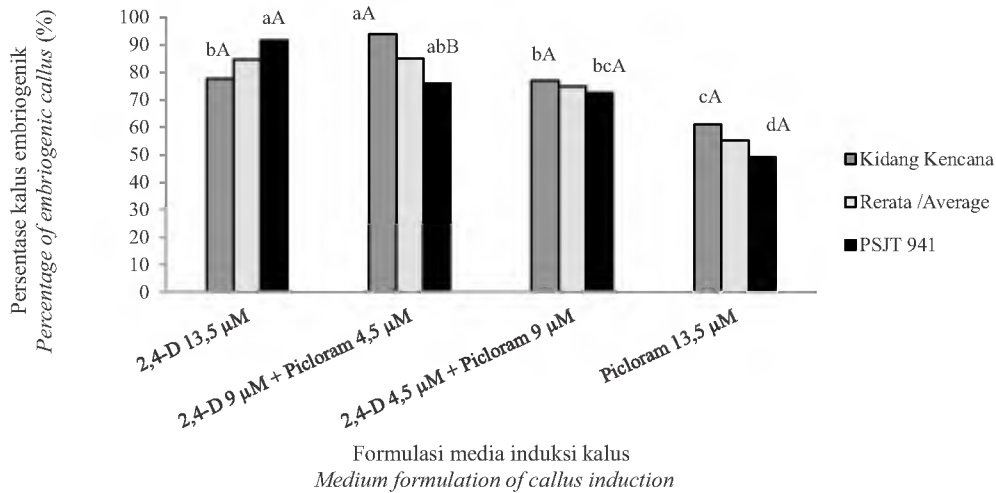
Tabel 1. Inisiasi dan persentase pembentukan kalus tebu varietas Kidang Kencana (KK) dan PSJT 941 pada beberapa formulasi media

Table 1. Initiation and percentage of callus formation on Kidang Kencana (KK) and PSJT 941 sugarcane varieties on several media formulations

Formulasi media <i>Media formulations</i>	Inisiasi kalus (hari) <i>Callus initiation (day)</i>		Rerata <i>Average</i>	Pembentukan kalus <i>Callus formation (%)</i>		Rerata <i>Average</i>
	KK	PSJT 941		KK	PSJT 941	
2,4-D 13,5 µM	13,89 bA	15,50 bA	14,69	96,00 A	096,00 A	96,00 a
2,4-D 9 µM + Picloram 4,5 µM	14,16 bB	15,92 bA	15,04	98,00 A	100,00 A	99,00 a
2,4-D 4,5 µM + Picloram 9 µM	14,74 abB	16,99 bA	15,86	90,00 A	094,00 A	92,00 a
Picloram 13,5 µM	15,97 aAb	20,95 aA	18,46	88,00 A	076,00 A	82,00 b
Rerata/ <i>Average</i>	14,69 abB	17,34 aA		93,00 A	091,50 A	

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada kolom yang sama dan angka yang diikuti oleh huruf besar yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan taraf 5%.

Note: Numbers followed by the same small letter on the same column and numbers followed by the same big letter on the same row are not significantly different according to the Duncan Test at 5%.



Keterangan: Diagram batang pada varietas yang sama yang diikuti oleh huruf kecil yang sama serta diagram batang pada media yang sama yang diikuti oleh huruf besar yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan taraf 5%.  
 Note: Bar on the same variety followed by the same small letter and bar on the same medium followed by the same big letter are not significantly different according to the Duncan Test 5%.

Gambar 1. Persentase kalus embriogenik dua varietas tebu pada berbagai formulasi media  
 Figure 1. Percentage of embryogenic callus on two sugarcane varieties on several media formulation

Pengamatan terhadap pertumbuhan kalus dilakukan pada kalus tebu yang terbentuk. Hasil analisis statistik menunjukkan diameter dan bobot segar kalus mempunyai respon yang sama, yaitu berbeda nyata antar varietas dan perlakuan media, serta terdapat interaksi yang nyata antar varietas dan media (Tabel 2). Hal ini menunjukkan setiap varietas mempunyai respon pertumbuhan yang berbeda pada setiap media induksi kalus yang berbeda. Varietas Kidang Kencana mempunyai respon pertumbuhan terbaik dengan perlakuan 2,4-D 9 µM + Picloram 4,5 µM, sedangkan PSJT 941 pada 2,4-D 13,5 µM. Kedua perlakuan ini berbeda nyata dengan lainnya. Pertumbuhan kalus varietas Kidang Kencana cenderung mempunyai pertumbuhan yang lebih baik daripada PSJT 941. Hal

tersebut ditunjukkan dengan peubah diameter dan bobot segar kalus yang lebih tinggi pada semua media perlakuan. Pertumbuhan kalus kedua varietas pada media dengan perlakuan tunggal 2,4-D 13,5 µM secara nyata lebih baik dibandingkan dengan Picloram 13,5 µM. Hal ini menunjukkan ZPT auksin 2,4-D 13,4 µM jauh lebih efektif untuk menginduksi kalus tebu dibanding dengan Picloram. Kondisi ini sesuai dengan pernyataan SHOEMAKER *et al.* (1991) dan WIDORETNO *et al.* (2003) yang menyatakan ZPT 2,4-D memiliki sifat yang lebih baik dibandingkan jenis auksin lainnya karena lebih mudah diserap sel tanaman, tidak mudah terurai, dan berfungsi mendorong aktivitas morfogenetik. Selain itu, 2,4-D juga merupakan auksin yang tahan terhadap fotooksidasi.

Tabel 2. Diameter dan bobot segar kalus tebu varietas Kidang Kencana (KK) dan PSJT 941 pada berbagai formulasi media  
 Table 2. Diameter and callus fresh weight on Kidang Kencana (KK) and PSJT 941 sugarcane varieties on several media formulations

Formulasi media Media formulations	Diameter kalus Callus diameter (cm)		Rerata Average	Bobot segar kalus Callus fresh weight (g)		Rerata Average
	KK	PSJT 941		KK	PSJT 941	
2,4-D 13,5 µM	2,21 aA	2,12 aB	2,16	1,85 bA	1,76 aA	1,80
2,4-D 9 µM + Picloram 4,5 µM	2,29 aA	1,97 bB	2,13	1,99 aA	1,37 bB	1,68
2,4-D 4,5 µM + Picloram 9 µM	1,97 bA	1,74 cA	1,85	1,42 cA	1,15 cB	1,28
Picloram 13,5 µM	1,23 cA	0,99 dB	1,11	0,87 dA	0,59 dB	0,73
Rerata/Average	1,92	1,70		1,53	1,22	

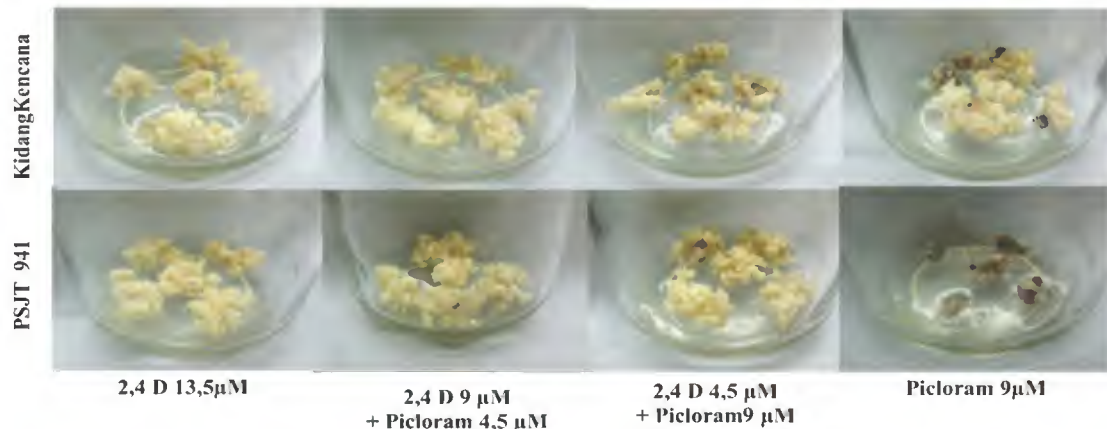
Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada kolom yang sama dan angka yang diikuti oleh huruf besar yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan taraf 5%.  
 Note: Numbers followed by the same small letter on the same column and numbers followed by the same big letter on the same row are not significantly different according to the Duncan Test at 5%.

ZPT kelompok auksin, seperti 2,4-D dan Picloram, sering digunakan untuk menginduksi kalus dalam kondisi ruang tanpa cahaya. Dalam ruang gelap, auksin tidak mudah terdegradasi sehingga mempercepat waktu inisiasi kalus pada eksplan. Pengaruh formulasi media induksi kalus terhadap tekstur dan struktur kalus dapat dilihat pada Gambar 2. Eksplan tebu yang dikulturkan dalam media induksi yang mengandung 2,4-D tunggal maupun kombinasi dengan Picloram mempunyai tekstur dan struktur kalus yang remah dan kering serta berwarna putih kekuningan (krem). Sementara itu eksplan tebu yang dikulturkan dalam media yang hanya mengandung Picloram sebagian besar membentuk kalus dengan tekstur yang kompak dan basah serta berwarna putih kecoklatan. Kalus dengan tekstur dan struktur remah, serta berwarna putih kekuningan cenderung bersifat embriogenik sehingga lebih mudah diregenerasikan dibanding dengan tekstur dan struktur kompak dan basah (Gambar 2). Adanya fenomena pencoklatan kalus akibat penggunaan media dengan Picloram tunggal, diduga karena adanya akumulasi ZPT tersebut dalam kalus yang diinkubasikan pada kondisi tanpa pencahayaan sehingga pertumbuhan kalus terhambat. Picloram juga merupakan agensia herbisida sehingga akumulasi senyawa tersebut akan bersifat toksik terhadap biakan. Selain itu, Picloram bersifat persisten di dalam sel ketika terakumulasi dan tidak dapat dimetabolismekan (ARTECA, 1996).

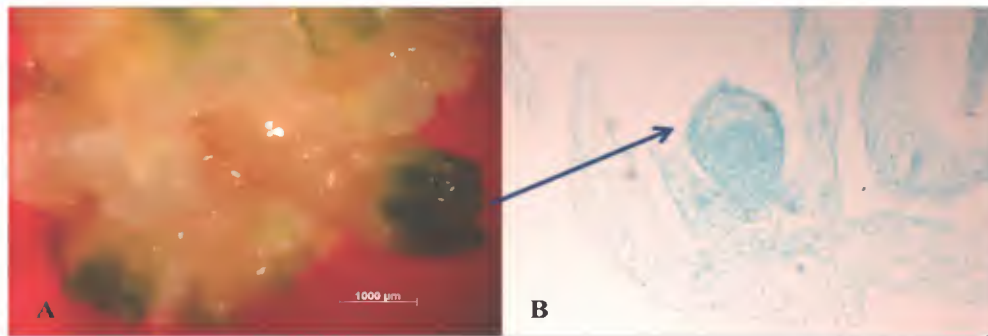
### Regenerasi Tunas dan Perakaran

Perlakuan induksi kalus menghasilkan kalus yang berbeda-beda sesuai dengan varietas dan formulasi media yang digunakan. Kalus yang digunakan pada tahap regenerasi tunas adalah embriogenik yang dihasilkan dari kedua varietas pada masing-masing formulasi media terbaik. Penggunaan kalus embriogenik berkaitan dengan struktur kalus yang mencerminkan kemampuan kalus untuk beregenerasi membentuk organ tanaman. Kalus embriogenik mempunyai kemampuan lebih tinggi untuk membentuk organ (tunas, daun, dan akar) daripada yang non embriogenik (GANDONOU *et al.*, 2005; ALI *et al.*, 2008).

Kalus umumnya berupa nodular, yaitu mengandung struktur yang tidak spesifik dan bentuknya agak mengerucut, seperti mata tunas. Kalus nodular ini selanjutnya berkembang menjadi bakal tunas dan akar. Hasil penelitian menunjukkan varietas yang digunakan mempunyai kemampuan beregenerasi melalui jalur organogenesis tak langsung. Diferensiasi kalus menjadi tunas diawali dengan pembentukan pusat aktivitas meristematik (*meristemoid*) yang mengarah pada pembentukan organ (Gambar 3A dan 3B) (ALI *et al.*, 2008). Pada sistem regenerasi secara organogenesis, organ tunas dan akar terbentuk secara terpisah, yang berarti bersifat unipolar (satu kutub).



Gambar 2. Penampilan kalus tebu varietas Kidang Kencana dan PSJT 941 pada beberapa media induksi kalus  
 Figure 2. Visual of Kidang Kencana and PSJT 941 varieties sugarcane callus on several callus induction medias



Gambar 3. Regenerasi kalus tebu melalui jalur organogenesis. Calon tunas dari kalus nodular (A) dan histologi jaringan (B)  
 Figure 3. Callus regeneration of sugarcane by organogenesis. Prospective shoots of callus nodular (A) and histology of tissue(B)

Hasil pengamatan terhadap peubah waktu inisiasi tunas menunjukkan terdapat beda nyata antar varietas dan formulasi media, serta ada interaksi yang nyata antar kedua faktor tersebut (Tabel 3). Inisiasi tunas berkisar antara 8 sampai 10 hari setelah sub kultur pada varietas Kidang Kencana. Sementara itu, inisiasi tunas pada varietas PSJT 941 cenderung lebih lama, berkisar 9 sampai 11 hari setelah sub kultur. Media regenerasi IBA 2,46  $\mu\text{M}$  + BAP 1,33  $\mu\text{M}$  memberikan respon inisiasi pembentukan tunas tercepat pada kedua varietas. Media regenerasi yang memberikan respon paling lama adalah IBA 2,46  $\mu\text{M}$  + BAP 0,44  $\mu\text{M}$  pada Kidang Kencana dan NAA 2,69  $\mu\text{M}$  + BAP 0,44  $\mu\text{M}$  pada PSJT 941. Semakin cepat kalus beregenerasi menjadi tunas maka akan semakin menguntungkan. Hal tersebut dikarenakan proses pertumbuhan tunas menjadi lebih awal dan dapat memperpendek masa kultur.

Hasil analisis statistik pada peubah persentase pembentukan tunas menunjukkan terdapat beda nyata antar varietas, antar formulasi media, serta terdapat interaksi nyata antar kedua faktor perlakuan tersebut (Tabel 3). Persentase pembentukan tunas pada kedua varietas terbaik pada media IBA 2,46  $\mu\text{M}$  + BAP 1,33  $\mu\text{M}$ , masing-masing sebesar 85% pada Kidang Kencana dan 82% PSJT 941.

Respon pembentukan tunas terendah terdapat pada IBA 2,46  $\mu\text{M}$  + BAP 0,44  $\mu\text{M}$  pada Kidang Kencana (68%) dan NAA 2,69  $\mu\text{M}$  + BAP 0,44  $\mu\text{M}$  PSJT 941 (64,3%).

Pada IBA 2,46  $\mu\text{M}$  + BAP 1,33  $\mu\text{M}$ , Kidang Kencana mempunyai respon yang lebih baik untuk regenerasi tunas, baik kecepatan inisiasi maupun persentase pembentukan tunasnya, dibanding PSJT 941. Pada media kontrol (MS0/tanpa penambahan ZPT), kalus tebu masih bisa beregenerasi walaupun tidak sebagai media terbaik. Menurut GEORGE *et al.* (2008), kandungan mineral media MS cukup tinggi sehingga dapat mencukupi kebutuhan unsur hara yang diperlukan dalam pertumbuhan biakan selama dalam kultur. Media dasar MS telah banyak dilaporkan efektif digunakan dalam kultur jaringan tanaman tebu (JALAJA *et al.*, 2008). Selain itu, di dalam jaringan tanaman tebu kemungkinan terdapat auksin dan sitokinin endogen yang memenuhi pertumbuhan tunas, walaupun jumlahnya terbatas, sehingga dengan penambahan ZPT tertentu, inisiasi dan presentase pembentukan tunas tebu menjadi lebih baik. Ini sesuai dengan pernyataan ALI *et al.* (2008) yang menyatakan penambahan ZPT dari golongan sitokinin, seperti BAP, sering digunakan untuk meningkatkan keberhasilan regenerasi membentuk tunas.

Tabel 3. Inisiasi dan persentase pembentukan tunas tebu varietas Kidang Kencana (KK) dan PSJT 941 pada berbagai formulasi media regenerasi

Table 3. Initiation and formation of sugarcane shoot Kidang Kencana (KK) and PSJT 941 varieties on several media regenerated formulations

Formulasi media Media formulations	Inisiasi tunas (hari) Shoot initiation (day)		Rerata Average	Pembentukan tunas Shoot formation (%)		Rerata Average
	KK	PSJT 941		KK	PSJT 941	
MS0	09,24 bcA	09,6 deA	09,42	80,72 bA	74,40 cdB	77,56
IBA 2,46 $\mu\text{M}$ + BAP 0,44 $\mu\text{M}$	10,40 aA	10,28 bcA	10,34	68,00 eA	71,20 deA	69,60
IBA 2,46 $\mu\text{M}$ + BAP 1,33 $\mu\text{M}$	08,86 cA	09,12 eA	08,99	85,00 aA	82,00 aA	83,50
IBA 2,46 $\mu\text{M}$ + BAP 2,22 $\mu\text{M}$	10,24 aA	09,78 cdA	10,01	71,30 dB	77,60 bcA	74,45
NAA 2,69 $\mu\text{M}$ + BAP 0,44 $\mu\text{M}$	09,40 bB	11,40 aA	10,40	77,10 cA	64,30 fB	70,70
NAA 2,69 $\mu\text{M}$ + BAP 1,33 $\mu\text{M}$	09,26 bcB	10,44 bA	09,85	80,80 bA	68,70 eB	74,75
NAA 2,69 $\mu\text{M}$ + BAP 2,22 $\mu\text{M}$	09,98 aA	09,38 deB	09,68	75,30 cB	80,20 abA	77,75
Rerata/Average	09,63	10,00		76,89	74,06	

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada kolom yang sama dan angka yang diikuti oleh huruf besar yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan taraf 5%.

Note: Numbers followed by the same small letter on the same column and numbers followed by the same big letter on the same row are not significantly different according to the Duncan Test at 5%.

Proses regenerasi membentuk tunas sangat ditentukan oleh keseimbangan ZPT dalam formulasi media yang digunakan (SUKMADJAJA dan MULYANA, 2011). Hasil analisis statistik pada peubah jumlah tunas menunjukkan respon yang berbeda nyata antar formulasi media, varietas, serta terdapat interaksi antara varietas dan formulasi media. Jumlah tunas tertinggi pada kedua varietas terdapat pada media IBA 2,46 µM + BAP 1,33 µM, yaitu sebesar 26 tunas pada Kidang Kencana dan berbeda nyata dengan PSJT 941, yang hanya 22 tunas. Respon pada media terbaik kedua varietas ini berbeda nyata dengan formulasi media lainnya. Jumlah tunas terendah varietas Kidang Kencana terdapat pada perlakuan IBA 2,46 µM + BAP 0,44 µM, sedangkan jumlah tunas terendah PSJT 941 terdapat pada media NAA 2,69 µM + BAP 0,44 µM (Tabel 4).

Hasil analisis statistik pada peubah tinggi tunas menunjukkan respon yang berbeda nyata antar formulasi mediadan varietas, serta terdapat interaksi nyata antar kedua faktor tersebut. Varietas Kidang Kencana memberikan respon pertumbuhan tinggi tunas terbaik pada media IBA 2,46 µM + BAP 1,33 µM dan berbeda nyata dengan media perlakuan lainnya kecuali perlakuan IBA

2,46 µM + BAP 2,22 µM dan MS0. Varietas PSJT 941 mempunyai pertumbuhan tinggi tunas terbaik pada media IBA 2,46 µM + BAP 2,22 µM dan tidak berbeda nyata dengan respon pada media IBA 2,46 µM + BAP 1,33 µM. Respon pertumbuhan tinggi tunas terendah Kidang Kencana terdapat pada perlakuan IBA 2,46 µM + BAP 0,44 µM dan NAA 2,69 µM + BAP 0,44 µM, yang berbeda nyata dengan media perlakuan lainnya. Respon yang sama ditunjukkan oleh PSJT 941 pada kedua media tersebut (Tabel 4).

Formulasi media regenerasi dengan penambahan auksin dan sitokinin yang berbeda-beda menyebabkan perbedaan rasio antara auksin dan sitokinin sehingga memberikan respon yang berbeda-beda. Sitokinin akan memberikan respon lebih dominan pada daerah adaksial sehingga memacu pertumbuhan tunas, sedangkan auksin pada daerah abaksial sehingga memacu pertumbuhan akar. Formulasi media regenerasi yang digunakan mampu menginduksi pertumbuhan tunas dan pembentukan akar. Dalam media regenerasi, akar mulai terbentuk setelah dua bulan (Tabel 5).

Tabel 4. Jumlah dan tinggi tunas tebu varietas Kidang Kencana (KK) dan PSJT 941 pada berbagai formulasi media regenerasi

Table 4. Number and height of sugarcane shoot Kidang Kencana (KK) and PSJT 941 varieties on several media regenerated formulations

Formulasi media Media formulations	Jumlah tunas Shoot number		Rerata Average	Tinggi tunas Shoot height (cm)		Rerata Average
	KK	PSJT 941		KK	PSJT 941	
MS0	20,20 bA	15,26 cB	17,73	8,99 aA	8,51 bcB	8,75
IBA 2,46 µM + BAP 0,44 µM	10,28 eB	12,50 dA	11,39	4,81 dA	4,64 Ea	4,73
IBA 2,46 µM + BAP 1,33 µM	26 14 aA	22,18 aB	24,16	9,22 aA	8,80 abB	9,01
IBA 2,46 µM + BAP 2,22 µM	11,32 dB	15,96 cA	13,64	9,20 aA	9,00 aA	9,10
NAA 2,69 µM + BAP 0,44 µM	15,60 cA	9,86 eB	12,73	5,22 dA	4,50 eB	4,86
NAA 2,69 µM + BAP 1,33µM	19,90 bA	10,74 eB	15,32	8,50 bA	5,19 dB	6,84
NAA 2,69 µM + BAP 2,22 µM	14,80 cB	19,22 bA	17,01	8,07 cB	8,20 cA	8,13
Rerata/Average	16,89	15,10		7,72	6,98	

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada kolom yang sama dan angka yang diikuti oleh huruf besar yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan taraf 5%.

Note: Numbers followed by the same small letter on the same column and numbers followed by the same big letter on the same row are not significantly different according to the Duncan Test at 5%.

Tabel 5. Persentase pembentukan akar pada tunas tebu varietas Kidang Kencana (KK) dan PSJT 941 pada berbagai formulasi media regenerasi

Table 5. Root formation percentage of Kidang Kencana (KK) and PSJT 941 sugarcane varieties shoot on several media regenerated formulation

Formulasi media Media formulations	Pembentukan akar Root formation (%)		Rerata Average
	KK	PSJT 941	
MS0	87,80 aA	80,00 aB	83,90
IBA 2,46 µM + BAP 0,44 µM	70,60 cB	75,10 bA	72,85
IBA 2,46 µM + BAP 1,33 µM	85,90 aA	80,10 aB	83,00
IBA 2,46 µM + BAP 2,22 µM	75,00 bB	78,10 aA	76,55
NAA 2,69 µM + BAP 0,44 µM	62,50 dA	60,30 dA	61,40
NAA 2,69 µM + BAP 1,33µM	72,40 cA	68,20 cB	70,30
NAA 2,69 µM + BAP 2,22 µM	70,20 cA	70,00 cA	70,10
Rerata/Average	74,91	73,11 Ca	

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada kolom yang sama dan angka yang diikuti oleh huruf besar yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan taraf 5%.

Note: Numbers followed by the same small letter on the same column and numbers followed by the same big letter on the same row are not significantly different according to the Duncan Test at 5%.



Hasil analisis statistik pada peubah persentase pembentukan akar menunjukkan respon yang berbeda nyata antar formulasi media, varietas, serta terdapat interaksi nyata antar kedua faktor perlakuan (Tabel 5). Varietas Kidang Kencana mempunyai persentase pembentukan akar lebih baik dibanding PSJT 941. Persentase pembentukan akar tertinggi Kidang Kencana terdapat pada media MS0 dan tidak berbeda nyata dengan IBA 2,46  $\mu$ M + BAP 1,33  $\mu$ M. Sementara itu, respon pertumbuhan akar tertinggi PSJT 941 terdapat pada IBA 2,46  $\mu$ M + BAP 1,33  $\mu$ M dan tidak berbeda nyata dengan MS0 dan IBA 2,46  $\mu$ M + BAP 2,22  $\mu$ M. Pertumbuhan akar terendah terdapat pada media NAA 2,69  $\mu$ M + BAP 0,44  $\mu$ M, baik pada Kidang Kencana maupun PSJT 941.

Akar kedua varietas tetap dapat terbentuk pada media dasar MS0 (kontrol) tanpa penambahan ZPT. Diduga, pada tunas tebu sudah terdapat auksin, baik endogen maupun akumulasi eksogen pada saat induksi kalus sehingga akar tebu tetap terbentuk, walaupun dalam media regenerasi tidak ada penambahan ZPT, terutama auksin. Adanya fenomena pembentukan akar yang cukup baik pada media kontrol ini sejalan dengan penelitian KARJADI dan BUCHORY (2008) pada bawang merah. Pertumbuhan akar planlet bawang merah lebih baik pada media MS tanpa ZPT atau dengan penambahan ZPT pada konsentrasi rendah. Kemungkinan, hal tersebut disebabkan karena auksin secara alami disintesis pada jaringan apikal meristem yang kemudian ditransportasikan secara basipetal ke bagian bawah untuk memacu pembentukan dan pertumbuhan akar. Hasil ini berbeda dengan penelitian SUKMADAJA dan MULYANA (2011) pada kultur jaringan tanaman tebu. Pada penelitian tersebut dijelaskan persentase pembentukan akar tebu paling sedikit pada media MS0 dibanding yang diberi

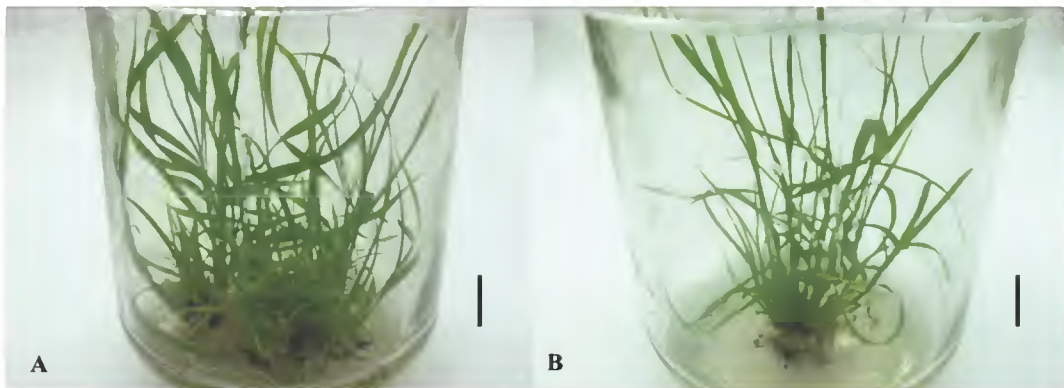
auksin (NAA dan IBA). Ini menunjukkan bahwa setiap genotipe tanaman mempunyai respon yang berbeda-beda terhadap pemberian ZPT dalam media. Pertumbuhan dua varietas tebu pada media regenerasi terbaik dapat dilihat pada Gambar 4.

Regenerasi kalus menjadi planlet merupakan hal penting dalam perbanyak tanaman. Regenerasi kalus umumnya melalui tahapan kalus nodular, calon tunas dan akar, selanjutnya membentuk tunas dan akar, akhirnya menjadi tanaman utuh. Planlet yang telah membentuk akar sempurna kemudian diaklimatisasi di rumah kaca. Planlet yang diaklimatisasi harus beradaptasi pada kondisi lingkungan baru.

#### Aklimatisasi

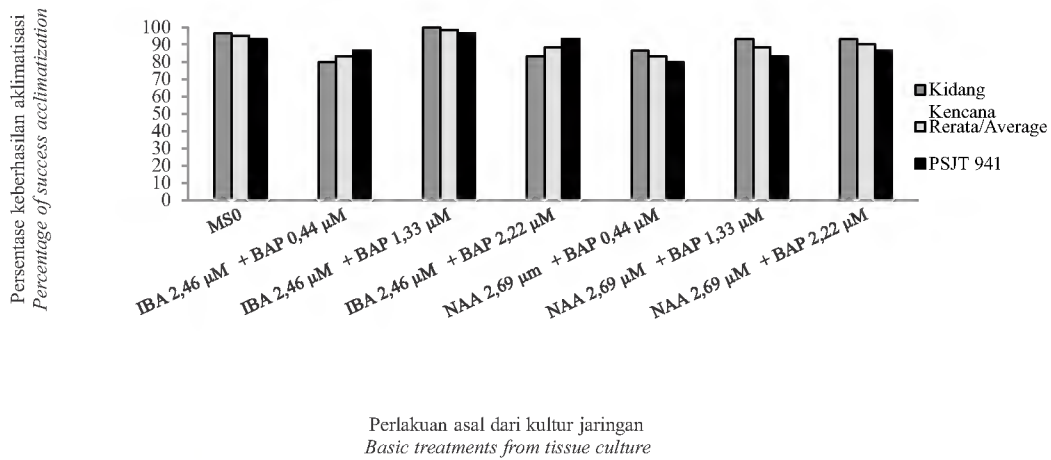
Hasil analisis statistik terhadap peubah persentase keberhasilan aklimatisasi menunjukkan tidak ada beda nyata antar varietas, antar asal media kultur jaringan, dan tidak terdapat interaksi yang nyata antar varietas dan asal media. Persentase keberhasilan aklimatisasi sekitar 80-100% (Gambar 5).

Hasil pengamatan menunjukkan planlet yang berukuran lebih besar dan mempunyai perakaran yang sempurna mampu beradaptasi lebih baik pada lingkungan luar. Planlet yang mempunyai ukuran 8-10 cm siap untuk diaklimatisasi di rumah kaca. Ini sesuai dengan penelitian KHAN *et al.* (2008) yang mendapatkan planlet tanaman tebu yang berhasil diaklimatisasi dengan ukuran 8-10 cm. Tanaman tebu hasil aklimatisasi yang mempunyai pertumbuhan yang baik selanjutnya siap dipindah tanam di lapang (Gambar 6).

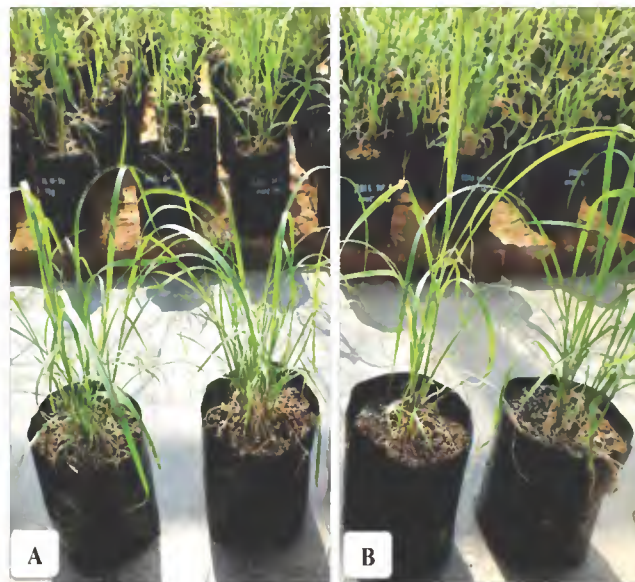


Gambar 4. Pertumbuhan dua varietas tebu Kidang Kencana (A) dan PSJT 941 (B) pada media regenerasi terbaik (IBA 2,46  $\mu$ M + BAP 1,33  $\mu$ M)

Figure 4. Growth of two Kidang Kencana (A) and PSJT 941 (B) sugarcane varieties on the best regeneration media (IBA 2,46  $\mu$ M + BAP 1,33  $\mu$ M)



Gambar 5. Persentase keberhasilan aklimatisasi tebu varietas Kidang Kencana dan PSJT 941  
Figure 5. Percentage of success acclimatization of Kidang Kencana and PSJT 941 sugarcane varieties



Gambar 6. Aklimatisasi varietas tebu Kidang Kencana (A) dan PSJT 941 (B)  
Figure 6. Acclimatization of Kidang Kencana (A) and PSJT 941 (B) sugarcane varieties

### KESIMPULAN

Media induksi kalus terbaik untuk Kidang Kencana adalah media 2,4-D 9 µM + Picloram 4,5 µM, sedangkan pada PSJT 941 adalah 2,4-D 13,5 µM. Media regenerasi dapat digunakan untuk menginduksi tunas sekaligus perakaran. Media regenerasi terbaik varietas Kidang Kencana dan PSJT 941 adalah IBA 2,46 µM + BAP 1,33 µM. Kedua varietas dapat diaklimatisasi di rumah kaca dengan tingkat keberhasilan tinggi 80-100%.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan yang telah memberikan dana penelitian melalui anggaran APBN Tahun 2012 untuk kegiatan penelitian ini. Terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Mia Kosmiatin, M.Si. atas bantuannya selama proses penelitian dan penulisan serta Sdr. Mulyana sebagai teknisi yang telah membantu dalam pelaksanaan kegiatan penelitian di laboratorium dan rumah kaca.

DAFTAR PUSTAKA

- ABU, G., F. MEKBIB, and A. TEKLEWOLD. 2014. Effect of genotype on *in vitro* propagation of elite sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties of ethiopian sugar estates. *Int. J. Tech. Enhancements and Emerging Engineering Research*. 2(6): 123-128.
- ALI, A., S. NAZ, F.A. SIDDIQUI, and J. IQBAL. 2008. Rapid clonal multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum*) through callogenesis and organogenesis. *Pak. J. Bot.* 4(11): 123-138.
- ALI, S., M.S. KHAN, and J. IQBAL. 2012. *In vitro* direct plant regeneration from cultured young leaf of segments of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *J. Animal and Plant Sciences* 22(4): 1107-1112.
- ARTECA, R.N. 1996. *Plant Growth Substances*. Chapman and Hall. New York. 332p.
- BEHERA, K.K. and S. SAHOO. 2009. Rapid *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) through callus culture. *Nature Science*. 7(4): 1-10.
- BHOJWANI, S.S. and M.K. RAZDAN. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. A Revised Edition Elsevier Science. Amsterdam. The Netherlands. 767p.
- CHENGALRAYAN, K., A. ABOUZID, and M. GALLO-MEACHER. 2005. *In vitro* regeneration of plants from sugarcane seed-derived callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 41(4): 477-482.
- DEVARUMATH, R.M., R.B. DOULE, P.G. KAWAR, S.B. NAIKEBAWANE, and Y.S. NERKAR. 2007. Field performance and RAPD analysis to evaluate genetic fidelity of tissue culture raised plants *viv-a-vis* conventional setts derived plants of sugarcane. *Sugar Tech*. 9(1): 17-22.
- DIBAX, R., G.B.D. ALCANTARA, M.P. MACHADO, J.C.B. FILHO, and R.A.D. OLIVEIRA. 2013. Protocol optimization and histological analysis of *in vitro* plant regeneration of 'RB92579' and 'RB93509' sugarcane cultivars. *Ciencia Rural*. 43(1): 49-54.
- GANDONOU, C.H., 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.
- GEORGE, F.E., M.A. HALL, and G.J. DE KLERK. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3<sup>rd</sup> Edition Volume 1. The Background. Springer Publisher. Dordrecht. Netherlands. 501p.
- GILL, K.N., R. GILL, and S.S. GOSAL. 2004. Factors enhancing somatic embryogenesis and plant regeneration sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Indian J. Biotech*. 3: 119-123.
- JALAJA, N.C., D. NEELAMATHI, and T.V. SREENIVASAN. 2008. Micropropagation for quality seed production in sugarcane in Asia and the Pacific. *FAO, APCoAB and APAARI*. Pp.i-x + 46.
- KARJADI, A.K. dan A. BUCHORY. 2008. Pengaruh komposisi media dasar, penambahan BAP, dan pikloram terhadap induksi tunas bawang merah. *J.Hort*. 18(1):1-9.
- KHAN, I.A., M.U. DAHOT, S. YASMIN, A. KHATRI, N. SEEMA, and M. NAQVI. 2006. Effect of sucrose and growth regulators on the micropropagation of sugarcane clones. *Pak. J. Bot.* 38: 961-967.
- KHAN, S.A., H. RASHID, M.F. CHAUDHARY, Z. CHAUDHARY and A. AFROZ. 2008. Rapid micropropagation of three elite sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. *African J. Biotechnol.* 7(13): 2174-2174.
- LAKSHMANAN, P., R.J. GEIJSKES, L. WANG, A. ELLIOT, C.P.L. GROF, N. BERDING, and G.R. SMITH. 2006. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cell Rep.* 25: 1007-1015.
- MEYER, G.M., M. BANASIAK, T.T. NTOYI, T.L. NICHOLSON, and S.J. SNYMAN. 2009. Sugarcane plants from temporary immersion culture, acclimating for commercial production. *Acta Hort.* 812: 323-327.
- MINARSIH, H., I. RIYADI, SUMARYONO, dan A. BUDIANI. 2013. Mikropopagasi planlet tebu menggunakan Sistem Perendaman Sesaat (SPS). *Menara Perkebunan*. 81(1): 1-8.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plantarum*. 15: 473-497.
- MUSTAFA, G. and M.S. KHAN. 2012. Reproducible *in vitro* regeneration system for purifying sugarcane clones. *African J. Biotechnol.* 11(42): 9961-9969.
- PURNAMANINGSIH, R. 2006. Induksi kalus dan optimasi regenerasi empat varietas padi melalui kultur *in vitro*. *J. AgroBiogen*. 2(2): 74-80.
- RAMGAREEB, S., S.J. SNYMAN, T. VAN ANTWERPEN, and R.S. RUTHERFORD. 2010. Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 100: 175-181.
- SHOEMAKER, R.C., L.A. AMBERGER, R.G. PALMER, L. OLGLESBY, and J.P. RANCH. 1991. Effect 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean (*Glycine max* (L.) Merr) *in vitro*. *Cell. Dev. Biol.* 27: 84-88.
- SINGH, N., A. KUMAR, and G.K. GARG. 2006. Genotype dependent influence of phytohormone combination and subculturing on micropropagation of sugarcane varieties. *Indian J. Biotech* 5: 99-106.
- SNYMAN, S.J., G.M. MEYER, A.C. KOCH, M. BANASIAK, and M.P. WATT. 2011. Applications of *in vitro* culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 47:234-249. DOI: 10.1007/s11627-011-9354-7.
- SNYMAN, S.J., G.M. MEYER, M. BANASIAK, T.L. NICHOLSON, T. VAN ANTWERPEN, P. NAIDOO, and J.D. ERASMUS. 2009.

- Micropopagation of sugarcane via NovaCane: preliminary steps in commercial application. *Sugar Cane Int.* 27(6): 245-247.
- SUKMADAJA, D. dan A. MULYANA. 2011. Regenerasi dan pertumbuhan beberapa varietas tebu (*Saccharum officinarum* L.) secara in vitro. *Jurnal AgroBiogen.* 7(2): 106-118.
- TAMBUNAN, I.R. 2012. Pengembangan Metode Organogenesis dan Embriogenesis Somatik pada Nenas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) serta Deteksi Dini untuk Mereduksi Keragaman Somaklonal (Disertasi). Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. 185 hlm.
- WIDORETNO, W., E.L. ARUMNINGTYAS, and SUDARSONO. 2003. *In vitro* methods for inducing somatic embryos of soybean and planlet regeneration. *Hayati.* 10(1): 19-24.