



LAPORAN PENELITIAN  
DIK SUPLEMEN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
TAHUN ANGGARAN 2002

SELESAI

PAMERAN

-1 AUG 2004

**PENGARUH IRADIASI SINAR GAMMA Co60 TERHADAP  
PERKEMBANGAN EMBRIO SOMATIK TANAMAN TEBU  
(*Saccharum spp.*) IN VITRO**

Peneliti:

**Dra. EDY SETITI WIDA UTAMI, MS.**

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Dana DIK Suplemen Universitas Airlangga Tahun 2002

S.K Rektor Universitas Airlangga Nomor 4879/J03/PG/2001

Tanggal 7 Juni 2002

Nomor Urut: 19

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2002

BOTANIY - EMBRYOLOGY  
GAMMA RAYS

KKC  
KK  
580  
Uta  
P



LAPORAN PENELITIAN  
DIK SUPLEMEN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
TAHUN ANGGARAN 2002

**PENGARUH IRADIASI SINAR GAMMA Co60 TERHADAP  
PERKEMBANGAN EMBRIO SOMATIK TANAMAN TEBU  
(*Saccharum spp.*) IN VITRO**

Peneliti:

**Dra. EDY SETITI WIDA UTAMI, MS.**

**SELESAI**

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

3000 225033141

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Dana DIK Suplemen Universitas Airlangga Tahun 2002

S.K Rektor Universitas Airlangga Nomor 4879/J03/PG/2001

Tanggal 7 Juni 2002

Nomor Urut: 19

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS AIRLANGGA



\*022503141\*



# LEMBAGA PENELITIAN

- |  |                                       |  |
|--|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional         | 8. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional             | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722)      |  |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Puslit Olah Raga                   | 10. Puslit Kesehatan Reproduksi                  |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718)   | 8. Puslit Bioenergi                   |  |

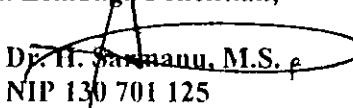
Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066  
E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

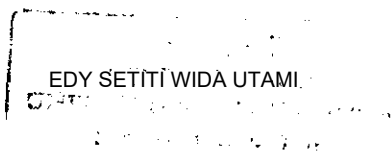
## IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. Judul Penelitian	: Pengaruh Iradiasi Sinar Gamma $Co^{60}$ Terhadap Perkembangan Embrio Somatik Tanaman Tebu (Saccharum sp) In Vitro
a. Macam Penelitian	: <input type="checkbox"/> Fundamental <input type="checkbox"/> Terapan <input type="checkbox"/> Pengembangan
b. Kategori Penelitian	: <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III
2. Kepala Poyek Penelitian	
a. Nama lengkap dan Gelar	: Dra. Edy Setiti Wida Utami, MS.
b. Jenis kelamin	: Perempuan
c. Pangkat/Golongan dan NIP	: Pembina (Gol. IV/a) 131 406 062
d. Jabatan Sekarang	: Staf Pengajar
e. Fakultas/Puslit/Jurusan	: FMIPA
f. Univ/Ins./Akademi	: Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu yang diteliti	: Embriologi Tumbuhan
3. Jumlah Tim Peneliti	: 1 (satu) orang
4. Lokasi Penelitian	: Fakultas MIPA Unair, RSUD, Dr. Soetomo Surabaya
5. Kerjasama dengan Instansi lain	
a. Nama Instansi	: -
b. A l a m a t	: -
6. Jangka waktu penelitian	: 5 (lima) bulan
7. Biaya yang diperlukan	: Rp. 4.000.000,00
8. Seminar Hasil Penelitian	
a. Dilaksanakan Tanggal	23 Desember 2002
b. Hasil Penelitian	( ) Baik Sekali (V) Baik ( ) Sedang ( ) Kurang

Surabaya, 23 Desember 2002

Mengetahui/Mengesahkan  
a.n. Rektor  
Ketua Lembaga Penelitian,

Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S.   
NIP 130 701 125



## RINGKASAN

PENGARUH IRADIASI SINAR GAMMA  $\text{Co}^{60}$  TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO SOMATIK TANAMAN TEBU (*Saccharum sp*) IN VITRO (Edy Setiti Wida Utami 2003, 37 halaman)

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan (1) bagaimana pengaruh iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dalam menginduksi terbentuknya kalus pada kultur pucuk batang tebu (*Saccharum spp*)?, (2) bagaimana perkembangan embrioid sel-sel kalus yang berasal dari suspensi kalus pucuk batang tebu (*Saccharum spp*) ?

Tujuan penelitian ini adalah (1) mengetahui pengaruh iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dalam menginduksi terbentuknya kalus pada kultur pucuk batang tebu (*Saccharum spp*) dan (2) mengetahui perkembangan embrioid yang berasal dari sel-sel kalus pucuk batang tebu (*Saccharum spp*).

Penelitian ini menggunakan eksplan pucuk batang tebu (*Saccharum spp*) yang diperoleh dari Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) Pasuruan. Media yang dipakai Murashige-Skoog (MS). Media MS digunakan untuk induksi dan proliferasi kalus.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan setiap perlakuan diulang 7 kali. Lima perlakuan tersebut adalah D0: eksplan tidak diradiasi; D100: eksplan diradiasi dengan sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dengan dosis 100 rad; D500: eksplan diradiasi dengan sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dengan dosis 500 rad; D1000: eksplan diradiasi dengan sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dengan dosis 1000 rad; dan D1500: eksplan diradiasi dengan sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dengan dosis 1500 rad. Variabel yang diamati adalah (1) lama waktu (hari) eksplan tebu membentuk kalus; (2) perkembangan embrioid yang berasal dari suspensi sel kalus tebu. Pengamatan terhadap induksi kalus dilakukan setiap hari sampai hari ke-30 terhadap lama waktu (hari) eksplan membentuk kalus. Pengamatan terhadap perkembangan embrioid dilakukan di bawah mikroskop cahaya.

Untuk mengetahui pengaruh iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  terhadap lama waktu eksplan membentuk kalus, data dianalisis menggunakan analisis varian. Apabila ada

pengaruh dilanjutkan dengan Uji LSD pada taraf signifikansi 5%. Dari hasil analisis varian diperoleh bahwa ada pengaruh perlakuan iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  terhadap lama waktu eksplan membentuk kalus. Berdasarkan uji LSD ada beda nyata antar perlakuan iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$ .

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa perlakuan iradiasi  $\text{Co}^{60}$  dengan dosis 100 rad mampu menginduksi pembentukan kalus tebu (*Saccharum spp*) lebih cepat dibanding perlakuan lain, perkembangan embrioid yang berasal dari suspensi sel kalus tebu sampai penelitian ini berakhir belum dapat teramati. Perlu dilakukan lebih lanjut untuk mengetahui dosis iradiasi  $\text{Co}^{60}$  yang tepat untuk meningkatkan diferensiasi kalus, diferensiasi akar, dan pertumbuhan akar. Selain itu perlu dilakukan penelitian perkembangan embrioid yang berasal dari sel kalus tebu yang diradiasi dengan konsentrasi dan jenis zat pengatur tumbuh yang berbeda.

(Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga : 4879/JO3/PG/2003 )

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Puji syukur kami panjatkan ke Hadirat Allah Subhanahu Wata'ala yang telah melimpahkan rahmat dan petunjukNya sehingga kami dapat menyelesaikan dan menyusun laporan penelitian berjudul Pengaruh Iradiasi Sinar Gamma Co<sup>60</sup> Terhadap Perkembangan Embrio Somatik Tanaman Tebu (*Saccharum spp*) *In Vitro*

Pada kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih kepada Pengelola DIK Suplemen Universitas Airlangga tahun 2002, Pimpinan Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Pimpinan dan Ketua Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Airlangga serta Kepala UPF Radiologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan. Tidak lupa kami ucapkan terima kasih kepada rekan-rekan dan semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyusunan laporan ini.

Kami menyadari, laporan ini masih jauh dari sempurna, untuk itu kritik dan saran kami harapkan, demi perbaikan untuk penelitian lebih lanjut.

Surabaya, 28 Februari 2003

Peneliti

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Rumusan Masalah	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Tebu	4
2.1.1. Klasifikasi dan morfologi tebu	4
2.1.2. Manfaat tanaman tebu	6
2.2. Kultur Jaringan Tanaman	6
2.2.1. Pengertian kultur jaringan tanaman	6
2.2.2. Perkembangan kultur jaringan tanaman	7
2.2.3. Manfaat kultur jaringan tanaman	8
2.3. Penggunaan dan Pengaruh Mutagen pada Tanaman	9
2.4. Embriogenesis <i>In Vitro</i>	11
2.5. Asal Embrioid dan Pembentukan Embrioid	12
2.6. Kultur Suspensi Sel	14
2.7. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Embriosomatik	16
2.7.1. Hilangnya potensi embriogenik	16
2.7.2. Faktor tumbuh	18
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	20
3.1. Tujuan Penelitian	20
3.2. Manfaat Penelitian	20

<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b>	21
4.1. Waktu Dan Tempat Penelitian	21
4.2. Bahan Penelitian	21
4.2.1. Bahan tanaman	21
4.2.2. Bahan kimia	21
4.3. Alat Penelitian	21
4.4. Cara Penelitian	21
4.4.1. Pembuatan media	21
4.4.2. Pembuatan larutan stok mikronutrien	22
4.4.3. Pembuatan larutan stok zat besi	22
4.4.4. Pembuatan larutan stok vitamin	22
4.4.5. Pembuatan larutan stok zat pengatur tumbuh	23
4.4.6. Pembuatan media MS untuk kultur pucuk batang tebu	23
4.4.7. Perlakuan dan penanaman eksplan	23
4.4.8. Suspensi sel dan inisiasi embrioid	24
4.5. Variabel Penelitian	25
4.6. Rancangan Penelitian	25
4.7. Pengamatan	26
4.8. Analisis Data	26
<b>BAB.V HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	27
5.1. Hasil Penelitian	27
5.2. Pembahasan	30
<b>BAB.VI. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	34
6.1. Kesimpulan	34
6.2. Saran	34
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	35
<b>LAMPIRAN</b>	



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 1. Urutan kejadian akibat radiasi	10
Gambar 2. Cara pengambilan eksplan pucuk batang tebu yang akan dikulturkan	24
Gambar 3. Kalus dari eksplan pucuk batang tebu ( <i>Saccharum spp</i> )	28
Gambar 4. Kalus tebu setelah disubkultur	28
Gambar 5. Struktur anatomi sel-sel kalus tebu	29
Gambar 6. Sel kalus tebu tunggal setelah digojog	29
Gambar 7. Hasil diferensiasi kalus tebu membentuk tunas	30

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Komponen Media Murashige and Skoog (MS).

Lampiran 2. Analisis Varian lama waktu (hari) eksplan tebu membentuk kalus dan Uji Duncan lama waktu (hari) eksplan tebu membentuk kalus

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang Penelitian

Tanaman tebu merupakan salah satu tanaman ekonomis yang menghasilkan bahan pangan komersial (Luc *et al*, 1995), dimana mulai dari pangkal sampai dengan ujung batangnya mengandung air gula dengan kadar 20%, yang bila diolah lebih lanjut akan menghasilkan kristal-kristal gula atau gula pasir (Anonim, 1992).

Kenaikan konsumsi gula dari tahun ke tahun terutama disebabkan karena meningkatnya jumlah penduduk yang menurut Gumbira dan Said (1996) diramalkan akan mencapai 8,5 milyar pada tahun 2020 serta meningkatnya jumlah industri yang memerlukan bahan baku berupa gula seperti kue dan roti, sirup, *soft drink*, permen, selai, buah dalam kaleng dan sebagainya (Anonim,1993a), sehingga penyediaan bibit tebu dalam skala besar yang diikuti dengan produktivitasnya menjadi tugas pemulia tanaman tebu untuk dapat memenuhinya.

Sementara itu di lain pihak, pengadaan bibit untuk dapat menghasilkan tanaman berkualitas tinggi dengan cara konvensional tampaknya sudah mendekati maksimal, sehingga penelitian yang berbasis bioteknologi diharapkan mampu menjawab permasalahan tersebut (Gumbira dan Said,1996).

Cara yang tepat untuk memenuhi pengadaan bibit dalam jumlah besar dan dalam waktu yang singkat adalah melalui teknik kultur jaringan tanaman (Wetherell,1982), di mana penggunaan metode kultur jaringan untuk perbanyakan tanaman tebu di Indonesia sudah dilakukan oleh P3GI (Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia) sejak tahun 1975 (Sastrowijono,1976). Pengadaan bibit tebu dengan cara kultur jaringan dimaksudkan untuk

mendapatkan bibit berkualitas tinggi yang tahan penyakit serta mempunyai kecepatan dan daya pertumbuhan yang baik (Anonim, 1993b).

Menurut Sastrowijono (1976), media tanam yang digunakan dalam kultur jaringan tebu di P3GI ialah media MS (Murashige dan Skoog) yang terdiri dari MS I dan MS II. Media MS I digunakan untuk menginduksi proses dediferensiasi eksplan tebu menjadi kalus, sedangkan media MS II digunakan untuk menginduksi proses regenerasi kalus tebu menjadi planlet.

Sementara itu, penelitian yang telah dilakukan oleh Utami dkk (2001) dalam upaya mendapatkan bibit tebu (*Saccharum sp*) yang berkualitas dengan perlakuan iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  pada dosis 1100 rad mampu menghasilkan tunas tebu yang banyak tetapi tunas-tunasnya tidak dapat memanjang (kerdil) dan perlakuan iradiasi menghambat diferensiasi kalus untuk membentuk akar. Untuk itulah penelitian tentang pengaruh iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dalam menginduksi terbentuknya kalus tebu perlu diteruskan mengingat budidaya tanaman tebu *in vitro* sampai terbentuk planlet didahului dengan tahap induksi kalus. Sedangkan untuk mengetahui mekanisme penghambatan pertumbuhan tunas tebu dan pembentukan akar dari kalus tebu yang diiradiasi dengan sinar gamma  $Co^{60}$  perlu dilakukan penelitian melalui perkembangan embrioid.

Menurut Ichikawa dan Ikushima (1967), pemberian iradiasi sinar gamma pada suatu tingkat dosis tertentu dapat merangsang pertumbuhan tanaman. Hal ini disebabkan hilangnya kemampuan sebagian sel pada meristem untuk membelah diri, menyebabkan aktivitas pembelahan sel-sel meristem yang lain meningkat. Prasetyorini *et al* (1992) telah mencoba memanfaatkan iradiasi sinar gamma dalam teknik kultur *in vitro* baik untuk menimbulkan mutasi, multiplikasi tunas, regenerasi kalus dan untuk induksi kalus.

Pemanfaatan iradiasi sinar gamma dalam induksi kalus didasari kenyataan bahwa setiap sel meristem yang digunakan sebagai eksplan mempunyai potensi untuk membelah diri. Pemberian iradiasi sinar gamma dapat menyebabkan perubahan fisiologis dari sel-sel tersebut, yang perubahannya tergantung pada radiosensitivitas sel-sel meristem penyusun eksplan dan dosis iradiasi yang diberikan. Hal ini akan menimbulkan perubahan potensi sel didalam eksplan untuk membentuk kalus.

Pemberian iradiasi yang dapat merangsang pembentukan tunas dilaporkan Pierik (1987), bahwa iradiasi dosis 100 rad mampu meningkatkan pembentukan tunas adventif pada kultur kalus *Anthurium andreaenum*. Menurut Tetelepta dan Hendratno (1966) efek yang sering dijumpai dengan perlakuan iradiasi sinar gamma adalah penghambatan dan stimulasi pertumbuhan. Pembungaan umumnya dihambat pada dosis rendah dan pada dosis tertentu dipercepat, tergantung spesies tanaman yang digunakan.

### 1.1. Rumusan Masalah

Penelitian ini dirancang untuk menjawab permasalahan:

- (1) Bagaimana pengaruh iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dalam menginduksi terbentuknya kalus pada kultur pucuk batang tebu (*Saccharum* sp)?
- (2) Bagaimana perkembangan embriosomatik sel-sel kalus yang berasal dari suspensi kalus pucuk batang tebu (*Saccharum* sp)?

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tebu.

##### 2.1.1. Klasifikasi dan morfologi tebu

Menurut Tjitrosoepomo (1988), dalam dunia tumbuh-tumbuhan, tebu mempunyai sistematika sebagai berikut:

- Divisio : Spermatophyta
- Sub divisio : Angiospermae
- Classis : Monocotyledoneae
- Ordo : Poales
- Familia : Poaceae
- Genus : *Saccharum*
- Species : *Saccharum officinarum*

Secara morfologi tanaman tebu dapat dibagi menjadi beberapa bagian, yaitu batang, daun, akar, dan bunga (Anonim, 1992).

Tebu mempunyai batang yang tumbuh tegak, tidak bercabang, dan terdiri atas ruas-ruas dengan panjang 10-30 cm yang dibatasi dengan buku-buku yang merupakan tempat kedudukan daun. Pada tiap-tiap buku terdapat mata tunas yang nantinya akan tumbuh menjadi bibit (Soebroto, 1972). Ruas batang tebu dapat berbentuk tong, kelos, konis terbalik atau cembung cekung (Anonim, 1992). Tinggi tanaman tebu dapat mencapai 2-6 m. Kulit batang tebu bersifat keras serta dapat berwarna hijau, kuning, ungu, merah tua atau kombinasinya. Pada batang tebu terdapat lapisan lilin yang berwarna putih keabu-

abuan di mana lapisan lilin ini banyak terdapat sewaktu batang masih muda (Steenis, 1992).

Daun tebu berseling kanan dan kiri, merupakan daun tidak lengkap, karena hanya terdiri dari pelepah dan helaian daun, tanpa tangkai daun (Anonim, 1992). Menurut Soebroto (1972), pelepah daun tebu memeluk batang, makin keatas makin sempit, pada pelepah terdapat bulu-bulu dan telinga daun. Helaian daun tebu berbentuk lanset, seperti pita dengan panjang 1-2 m dan lebarnya 4-7cm, ujung meruncing, bertepi rata dan kadang bergelombang serta berbulu keras di mana tulang daunnya berbentuk sejajar (Steenis, 1992).

Bunga tebu merupakan bunga majemuk yang tersusun atas malai dengan pertumbuhan terbatas. Sumbu utamanya bercabang-cabang makin keatas makin kecil, sehingga berbentuk piramid dengan panjang sampai 50-80 cm (Steenis, 1992). Menurut Soebroto (1972), dalam satu malai terdapat beribu-ribu bunga kecil. Setiap bunga mempunyai tiga daun kelopak, satu daun mahkota, tiga benang sari dan dua kepala putik. Bunga yang masak, benang sarinya panjang sehingga kepala sarinya menggantung keluar dari tajuk bunga.

Tebu mempunyai akar serabut yang panjangnya dapat mencapai satu meter. Sewaktu tanaman masih muda (bibit), terdapat dua macam akar, yaitu akar setek dan akar tunas. Akar setek berasal dari setek batangnya, tidak berumur panjang dan hanya berfungsi sewaktu masih muda. Akar tunas berasal dari tunas, berumur panjang dan tetap ada selama tanaman masih tumbuh (Anonim, 1992)

### 2.1.2. Manfaat tanaman tebu

Produk utama dari pengolahan tebu adalah gula putih. Namun ada produk samping dari pabrik gula dengan bahan baku tebu yang mempunyai nilai ekonomi penting, yaitu berupa tetes tebu, ampas tebu dan blotong (Anonim, 1992).

Tetes tebu merupakan hasil samping yang diperoleh dari tahap pemisahan kristal gula. Di Indonesia, tetes tebu banyak digunakan sebagai bahan baku untuk monosodium glutamat (MSG), industri alkohol, ragi dan makanan ternak (Barnes, 1974).

Ampas tebu merupakan sisa yang berserat dari batang tanaman tebu. Ampas tebu tersebut dapat berfungsi sebagai bahan bakar pabrik gula, bahan baku pabrik kertas atau membuat berbagai macam papan berserat (Barnes, 1974). Blontong adalah hasil samping dari proses penjemihan, merupakan endapan dari sekumpulan kotoran nira. Blotong ini banyak dimanfaatkan sebagai pupuk (Anonim, 1992).

## 2.2. Kultur Jaringan Tanaman

### 2.2.1. Pengertian kultur jaringan tanaman

Menurut White (1963), kultur jaringan merupakan suatu usaha pembuatan irisan jaringan hidup (eksplan) yang ditumbuhkan dan dilipat gandakan dalam keadaan *in vitro*. Sedangkan menurut Brown dan Bertke (1969), kultur jaringan mencakup pembuatan potongan potongan kecil jaringan hidup yang ditumbuhkan dan diperbanyak secara *in vitro*.

Soeryowinoto (1991) menjelaskan bahwa kultur adalah budidaya dan jaringan adalah sekelompok sel yang mempunyai bentuk dan fungsi yang sama. Maka, kultur jaringan berarti membudidayakan suatu jaringan tanaman (eksplan) secara vegetatif



dengan menumbuhkannya di dalam suatu media pada keadaan steril atau suci hama menjadi tanaman baru (planlet) yang mempunyai sifat seperti induknya.

Teori yang melandasi pelaksanaan kultur jaringan tanaman menurut Hendaryono dan Ari (1994) adalah teori sel yang dikemukakan oleh Schleiden dan Schwann yang menyatakan bahwa sel mempunyai suatu kemampuan autonom yang berupa kemampuan totipotensi di mana setiap sel dapat tumbuh menjadi individu baru yang sempurna apabila ditempatkan dalam lingkungan yang sesuai.

#### 2.2.2. Perkembangan kultur jaringan tanaman

Percobaan tentang kultur jaringan tanaman diawali oleh penelitian yang dilakukan oleh Heberlandt 1902 di Jerman dengan mengisolasi jaringan palisade *Lamium purpureum* dan *Eichhornia crassipes* yang ditumbuhkan pada media Knop's untuk membuktikan kebenaran tentang teori totipotensi sel (Bhojwani dan Razdan, 1983). Selanjutnya, White pada tahun 1934 berhasil mengkulturkan akar tomat dan bersama dengan Nobercourt pada tahun 1939 berhasil mengkulturkan wortel dan tembakau (Juniarso, 1993). Aplikasi metode kultur jaringan tanaman untuk memperbanyak tanaman secara besar-besaran pertama kali dilakukan oleh Morel pada tahun 1960 dengan dihasilkan 4 juta bibit anggrek *Cymbidium* dari sebuah apikal meristem dalam waktu satu tahun (Arditti dan Ernst, 1992). Pelopor pertama di bidang kultur jaringan tanaman tebu adalah Nickell dari Hawaii pada tahun 1962 yang berhasil menumbuhkan jaringan parenkim dari ruas batang tebu jenis H 37-1933 (Sastrowijono, 1976). Sementara itu, Taiwan Sugar Research Institute mulai menerapkan teknik kultur jaringan tanaman tebu sejak tahun 1970 (Liu, 1971 dalam Soekarso, 1991), sedangkan Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia mulai melakukan penelitian di bidang kultur jaringan tanaman tebu sejak tahun 1975 (Sastrowijono, 1976).

### 2.2.3. Manfaat kultur jaringan tanaman

Manfaat yang diperoleh dari penggunaan teknik kultur jaringan tanaman bila dibandingkan dengan perbanyakan tanaman secara generatif dan vegetatif konvensional adalah :

- 1) Mampu memperbanyak tanaman seragam dalam jumlah besar dan dalam waktu yang singkat (Soeryowinoto, 1991).
- 2) Dapat menghasilkan tanaman baru yang bebas virus dari tanaman yang telah terinfeksi (Winata, 1988).
- 3) Dapat digunakan untuk menghasilkan varietas baru dari suatu tanaman (Rahardja, 1995).
- 4) Membantu pemulia tanaman untuk menghasilkan bibit unggul ( Rahardja, 1995)
- 5) Tidak tergantung iklim dan musim sehingga penanaman dapat dilakukan setiap saat (Soeryowinoto,1991).
- 6) Membantu perbanyakan tanaman langka untuk pelestariannya (Soeryowinoto,1991).

Krishnamurthi pada tahun 1974 merupakan orang pertama yang berhasil memperoleh tanaman tebu bebas penyakit melalui metode kultur jaringan tanaman (Soekarso, 1991). Sementara itu, Soeprapto (1987) *dalam* Soeryowinoto (1991) berhasil mendapatkan tanaman tebu bebas virus dari tanaman tebu kultivar POJ 3016 yang terserang hebat oleh virus mozaik melalui teknik kultur jaringan. Menurut Sastrowijono (1976), problem penyakit yang serius menyerang tanaman tebu di Indonesia terutama adalah penyakit Mozaik dan hama pengerek batang dan pucuk yang menyerang tanaman tebu jenis unggul. Sehubungan dengan hal tersebut, maka teknik kultur jaringan mendapatkan prioritas pertama untuk memperbaiki kelemahan jenis unggul tersebut agar tetap mencapai produksi yang optimal.

### 2.3. Penggunaan dan Pengaruh Mutagen pada Tanaman

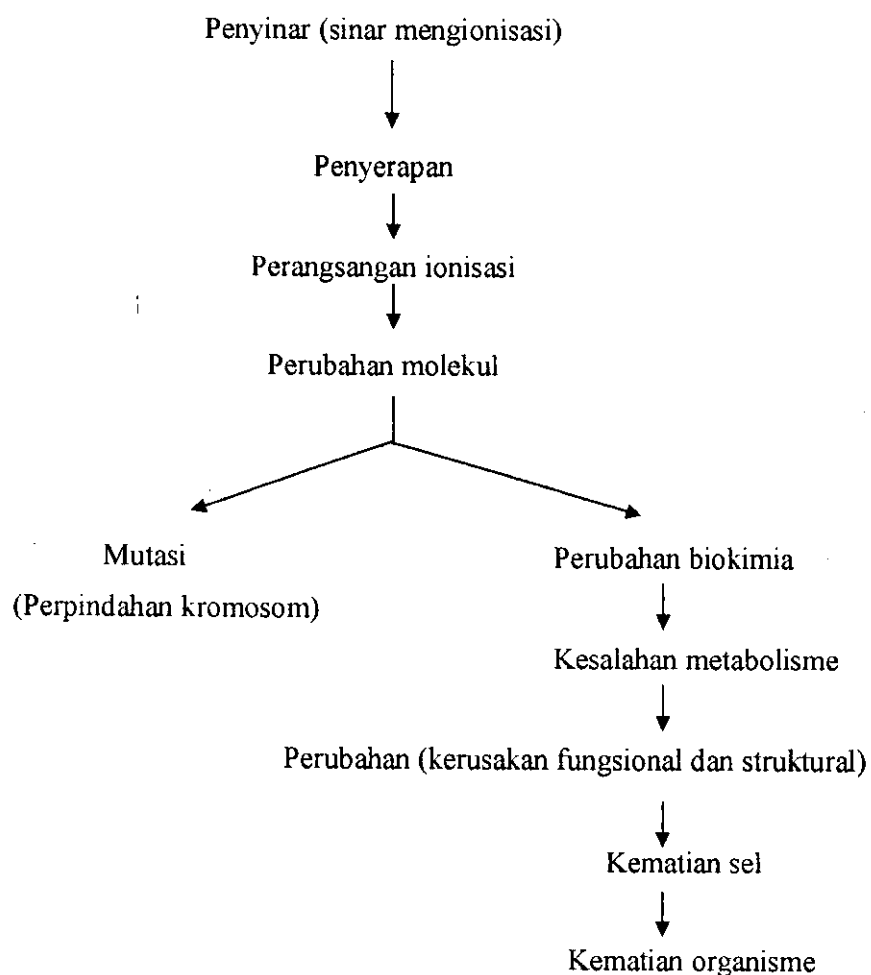
Iradiasi sinar gamma telah banyak dimanfaatkan untuk meningkatkan kesejahteraan umat manusia. Pemanfaatan tersebut meliputi bidang-bidang kedokteran dan pertanian. Dibidang pertanian, iradiasi sinar gamma selain digunakan untuk pemandulan insek jantan dalam rangka pengendalian hama, juga digunakan untuk sterilisasi bahan makanan dan pemuliaan tanaman. Dalam pemuliaan tanaman, biasa digunakan untuk mencari variates-variates baru yang lebih unggul. Dasar untuk melaksanakan pemuliaan tanaman ialah ketersediaan keragaman genetik. Keragaman genetik tersebut dapat diperoleh dengan beberapa cara, yaitu melalui:

- (1) Introduksi genotipe tanaman dari luar Indonesia,
- (2) Hibridisasi,
- (3) Kultur in vitro,
- (4) Mutasi fisik melalui radiasi maupun dengan zat-zat kimia yang bersifat mutagenik.

Mutasi dapat terjadi secara spontan maupun buatan, mutasi spontan atau alam jarang terjadi, sehingga perlu dilakukan mutasi buatan. Mutasi buatan dapat terjadi dengan cara perlakuan mutagen fisik maupun kimia. Mutagen fisik yang umum digunakan adalah dengan cara radiasi. Diantara berbagai macam iradiasi, sinar gamma, yang paling lazim digunakan untuk menginduksi mutasi pada tanaman. Mutagen kimia yang sering digunakan adalah tergolong *alkylating agent*, misalnya: di Etil Sulfat, di Metil Sulfat, Etil dan Nitroso Etil Uretan (Moebarokah,1972).

Mutasi atau perubahan yang bersifat genetik pada tanaman adalah akibat akhir dari proses interaksi antara radiasi dan materi genetik (kromosom dan makromolekul DNA) yang terdapat di dalam sel-sel bahan yang diradiasi. Ekspresi dan manifestasi dari mutasi terlihat pada perubahan sifat-sifat tanaman (biokimia, fisiologi morfologi). Perubahan

fisiologi pada tanaman secara visual dapat diamati dengan mudah, misalnya pada perkecambahan, kemampuan berbunga, kecepatan tumbuh. Besarnya perubahan fisiologi tergantung dari besarnya dosis radiasi yang digunakan dan akan meningkat pada batas tertentu (letalitas). Berikut gambaran urutan kejadian akibat radiasi (Willson & Morrison, 1966).



Gambar 1. Urutan kejadian akibat radiasi (Wilson & Morrison, 1966)

#### 2.4. Embriogenesis *In Vitro*

Embriogenesis meliputi perubahan bentuk pada fase-fase tertentu, dan perubahan progresif dari keadaan tidak terdiferensiasi menjadi terdiferensiasi. Embrio yang dihasilkan dari kultur jaringan disebut embrioid. Embrioid merupakan istilah yang umum untuk menyatakan suatu struktur bipolar yang dihasilkan secara aseksual. Permulaan terbentuknya embrioid dapat dilihat pada bentuk pertumbuhan yang membulat biasanya muncul dari eksplan atau kalus. Tiap embrioid yang terbentuk sebelumnya melalui urutan perkembangan sebagai berikut : 1) stadium pro-embrio, 2) stadium globuler, 3) stadium bentuk jantung, 4) stadium torpedo dan 5) planlet (George dan Sherrington, 1984 ; Katuuk, 1989).

Pada tumbuhan yang tidak mempunyai embrio zigotik, maka embrioid ini dapat berfungsi seperti embrio zigotik dalam hal menghasilkan tumbuhan baru (Raghavan, 1976). Embrioid dihasilkan dari bagian tepi kalus embriogenik. Menurut Dodds dan Roberts (1983), embrio somatik dapat diperoleh secara *in vitro* dari tiga sumber sel diploid yang dikulturkan, yaitu pada medium yang mengandung auksin tinggi, dan pemindahan kalus ke medium tanpa zat pengatur tumbuh dalam usaha untuk menginduksi pertumbuhan embrio bipolar dari inisial pro-embrio. Bila kondisinya sesuai, embrio akan dapat berkembang menjadi planlet. Biasanya persentase sel-sel eksplan yang berperan dalam pembentukan kalus hanya kecil. Sel-sel ini terletak pada lapisan permukaan atau sel-sel yang mengadakan kontak dengan media makanan. Kalus bersifat heterogen dan mungkin tersusun atas berbagai bentuk sel, termasuk inisial pro-embrio.

Embrio somatik dari kultur sel, jaringan dan organ, dapat terjadi secara langsung dan tidak langsung. Embrio terbentuk secara langsung meliputi pembentukan embrio

aseksual dari sel tunggal atau kelompok sel pada bagian jaringan eksplan tanpa melewati fase kalus.

Embriogenesis yang terbentuk secara tidak langsung tergantung dari keberadaan eksplan, proliferasi kalus, dan inisiasi pro-embrio (biasanya dalam medium yang mengandung auksin (2,4-D) dengan konsentrasi tinggi, misalnya 0,45 mg/l- 4,0 mg/l. Dan pemindahan kalus ke medium nutrisi tanpa zat pengatur tumbuh, bertujuan untuk induksi embrio bipolar dari inisial pro-embrio. Apabila kondisinya sesuai embrio akan berkembang menjadi planlet. Sel-sel pada eksplan yang berperan untuk membentuk kalus, biasanya terletak pada lapisan permukaan yang secara fisik kontak dengan medium nutrisi (Dixon, 1985). Kalus mungkin terdiri dari beberapa inisial pro-embrio, yaitu sel-sel embriogenik yang tunggal dan kelompok sel-sel embriogenik. Bila kalus ini dipindah ke medium yang mengandung auksin dengan konsentrasi rendah, selanjutnya akan terjadi embriogenesis, untuk menghasilkan embrio bipolar (Dixon, 1985).

## **2.5. Asal Embrioid dan Pembentukan Embrioid**

Pada kultur jaringan, sel-sel dalam masa agregasi yang tidak terdiferensiasi mempunyai kemampuan potensial untuk menghasilkan embrioid. Sel-sel embriogenik umumnya ditandai dengan sitoplasma yang pekat dan inti serta anak inti yang besar. Sel ini juga berbeda dengan sel-sel lainnya yang non embriogenik, yaitu ditandai dengan adanya densitas ribosom yang tinggi dan kenampakan retikulum endoplasmik yang jelas. Kemungkinan, sifat-sifat tersebut berkaitan dengan intensitas sintesis RNA sebagai langkah awal menuju embriogeni, tetapi hal ini memerlukan penelitian lebih lanjut (Raghavan, 1976).



Menurut Bhojwani dan Razdan (1983), bahwa kumpulan sel-sel meristematik itu mampu membentuk embrio, yang oleh Halperin dinamakan sebagai masa proembrionik atau oleh Mc William disebut kelompok embriogenik. Kelompok embriogenik tersusun oleh dua tipe sel yaitu : (1) sel-sel di bagian tengah dengan vakuola besar, inti sel kecil, jumlah ribosom dan retikulum endoplasmik sedikit, sedang mitokondria normal, sferosom sedikit atau tidak ada, aktifitas dehidrogenase rendah dan mempunyai sedikit amiloplas. (2) di bagian perifer terdiri atas sel-sel meristematis dengan ciri-ciri: sel dengan vakuola kecil, inti sel besar, densitas ribosom tinggi, retikulum endoplasmik banyak, mitokondria normal, aktivitas dehidrogenase tinggi dan mengandung amiloplas. Pada waktu kelompok embriogenik pecah akibat pemisahan sel-sel yang di tengah, maka sel-sel yang meristematis di bagian tepi akan lepas dari kelompok embriogenik, selanjutnya terbentuk kelompok embriogenik yang baru. Apabila kelompok embriogenik yang baru ini di pindahkan dalam medium tanpa auksin, maka embrio tidak berkembang menjadi dewasa, dan kelompok embriogenik dipertahankan dengan proliferasi dan fragmentasi (Bhojwani dan Razdan, 1983).

Menurut Dixon (1985), bahwa pembentukan embrio somatik dari kultur sel, jaringan dan organ, dapat terjadi secara langsung dan tidak langsung. Embrio somatik secara langsung mencakup pembentukan embrio aseksual dari sel tunggal atau kelompok sel pada bagian jaringan eksplan tanpa melalui fase kalus, seperti yang terjadi pada *Citrus* dari jaringan nuselus dapat terbentuk embrio (baik secara *in vivo* dan *in vitro*), dalam beberapa hal embrio muda yang dikultur memperlihatkan pertunasan. Embriogenesis secara langsung ini juga dijumpai dalam kultur kepala sari dan kultur protoplas. Akan tetapi hal ini jarang dijumpai bila dibandingkan embriogenesis secara tidak langsung.

Proses embriogenesis secara tidak langsung, diawali dari menempatkan eksplan dalam kultur, dilanjutkan dengan proses proliferasi kalus dan inisiasi pro-embrio. Proses embriogenesis terjadi di dalam medium yang mengandung auksin dengan konsentrasi tinggi. Untuk induksi pembentukan embrio bipolar yang berasal dari inisiasi pro-embrio, kultur dipindahkan dalam medium tanpa zat pengatur tumbuh. Apabila kondisinya sesuai, embrio akan berkembang menjadi planlet. Umumnya hanya kecil persentase sel-sel eksplan yang berperan dalam pembentukan kalus. Sel-sel ini biasanya terletak pada lapisan permukaan, atau jarang pada posisi kontak dengan medium nutrien. Kalus bersifat heterogen dan mungkin tersusun atas bermacam-macam sel termasuk inisial pro-embrio, mungkin berupa sel tunggal atau kelompok multi seluler. Pada saat kalus dipindahkan ke medium yang mengandung auksin pada kadar rendah, maka terjadi embriogenesis lebih lanjut untuk menghasilkan lebih banyak pro-embrio, dan inisial pro-embrio yang telah terbentuk sebelumnya, selanjutnya berkembang menjadi embrio bipolar yang tidak seragam (Dixon, 1985).

## 2.6. Kultur Suspensi Sel

Kultur suspensi terdiri atas kumpulan sel-sel tunggal dan agregat sel-sel yang tersebar dan berkembang dalam medium cair yang digojog pada alat penggojog (shaker). Selama pengulturan jumlah sel akan bertambah, sehingga pada suatu saat kultur akan mencapai jumlah sel maksimum. Bila disubkulturkan maka pertumbuhan kultur akan berlanjut (Katuuk, 1989)

Pembelahan sel dalam kultur suspensi, biasanya dapat diinisiasi dengan jalan meletakkan potongan kalus yang rapuh kedalam media cair yang bergoyang. Karena



goyangan, kalus akan terpisah menjadi potongan atau kelompok sel, bahkan menjadi individu sel yang mendapatkan bahan makanan secara maksimal.

Apabila semua persyaratan sudah terpenuhi, baik media maupun lingkungan selama satu pengulturan tanpa mengganti media, sel akan mengalami fase perkembangan sebagai berikut :

- 1) fase pembelahan sel yang lambat disebut lagfase, yaitu fase dimana sel membelah sangat lambat, terjadi sesudah satu atau dua hari pengulturan,
- 2) fase eksponensial, yaitu fase di mana sel membelah sangat cepat secara deret ukur,
- 3) fase linier, adalah fase dimana sel mulai lambat berkembang sebab mulai kehabisan makanan,
- 4) fase stationer, fase di mana jumlah sel akan tetap selama tidak ada subkultur,
- 5) fase penurunan dipercepat, adalah fase mengurangnya pertumbuhan dengan cepat, dan lama kelamaan mati.

Bentuk pertumbuhan semacam ini disebut *Batch*, yang berarti pertumbuhan sel hanya dibatasi oleh adanya zat hara yang ada dalam media, sehingga pada suatu saat bila media sudah kehabisan zat hara pertumbuhan akan terhenti.

Steward *dalam* Raghavan (1976) menekankan suatu argumen bahwa isolasi sel untuk memisahkan dari pengaruh sel-sel disekitar pada jaringan yang belum terorganisasi diperlukan untuk mendorong sel tersebut cenderung mengekspresikan sifat embriogeniknya. Sel yang terisolasi menjadi semakin mempunyai persamaan dengan zigot, selanjutnya berkembang seperti zigot menjadi embrio. Steward *dalam* Wareing dan Phillips (1981) membuktikan bahwa salah satu persyaratan untuk menghasilkan embrio dari kultur suspensi sel adalah pada sel tersebut harus ditempatkan secara terpisah dari

kelompok sel di sekitarnya, dan akhirnya dapat tumbuh secara independen. Apabila sel-sel berada dalam kelompok sel, maka perkembangan setiap sel mungkin akan terhambat. Dengan demikian sel-sel yang tumbuh secara berkelompok dalam kalus tidak dapat membentuk embrio tetapi apabila kemudian dipisahkan ke dalam kultur, sel akan membentuk embrio. Sebaliknya aktivitas sel-sel kalus menjadi terhambat lagi apabila terjadi diferensiasi. Tidak diketahui bagaimana sel itu menjadi bagian dari system jaringan, tetapi beberapa pengendalian terhadap tiap sel dipengaruhi oleh sel-sel disekitarnya melalui plasmodesmata yang menghubungkan protoplas sel-sel yang berbatasan (Wareing dan Phillips, 1975).

## **2.7. Faktor-Faktor yang mempengaruhi Embriosomatik**

### **2.7.1. Hilangnya potensi embriogenik**

Menurut Bhojwani dan Razdan (1983), ada tiga hipotesis yang diajukan untuk menerangkan hilangnya potensi organogenik dan atau embriogenik pada kultur kalus dan suspensi sel. Hipotesis tersebut adalah:

#### **(1) Hipotesis Genetik**

Menurut hipotesis ini, bahwa adanya perubahan dalam inti sel, termasuk ploiploidi, aneuploidi dan mutasi kromosom yang umumnya terjadi dalam sel-sel kultur menyebabkan penurunan organogenesis atau embriogenesis dalam kultur yang diperpanjang. Hilangnya potensial morfogenik secara genetik ini bersifat irreversibel (Bhojwani dan Razdan, 1983).

#### **(2) Hipotesis Fisiologi**

Dalam beberapa hal penurunan potensial morfogenik mungkin disebabkan perubahan keseimbangan hormonal di dalam sel atau jaringan, atau perubahan sensitivitas sel terhadap senyawa pengatur tumbuh dari luar. Dalam hal ini, sel berhenti berdeferensiasi menjadi organ dan embrio, tetapi potensi untuk membentuk embrio masih tetap ada. Sesuai dengan hipotesis ini, maka pada keadaan ini dapat dilakukan perbaikan terhadap potensial bawaannya dengan memodifikasi perlakuan pada jaringan tertentu dengan memberikan perlakuan dingin atau merubah susunan medium (Bhojwani dan Razdan, 1983).

### (3) Hipotesis Kompetitif

Hipotesis ini merupakan kombinasi dua hipotesis yang lain. Menurut penelitian Smith dan Street *dalam* Bhojwani dan Razdan (1983) pada sel-sel wortel, ada dua proses yang mungkin terlibat pada penurunan potensial dan akhirnya potensial embriogenesis hilang selama sub-kultur yang diperpanjang. Pertama, sel menjadi lebih sensitif terhadap penghambatan ekspresi totipotensinya oleh auksin. Kedua, dengan bertambahnya waktu, lini sel baru menjadi berkurang potensi embriogeniknya, yang disebut *instabilitas* sitologi pada sel-sel yang dikulturkan. Hal ini tidak ada perubahan kromosom, tetapi hanya terjadi sedikit mutasi, translokasi dan kehilangan informasi genetik. Menurut hipotesis ini, apabila tipe sel non embriogenik akan bertambah, dan komponen embriogenik secara bertahap akan berkurang. Apabila sudah sampai pada tahap di mana kultur tidak mengandung sel-sel embriogenik, maka perbaikan potensial embriogenesis tidak mungkin dilakukan. Akan tetapi apabila kultur mempunyai sedikit sel-sel embriogenik yang tidak dapat mengekspresikan totipotensinya karena pengaruh inhibitor dari sel-sel non embriogenik yang lebih unggul, maka masih mungkin

untuk memperbaiki kultur, dengan merubah komposisi medium yang secara selektif dapat mendorong ploriferasi pada sel yang totipoten (Bhojwani dan Razdan, 1983).

### 2.7.2. Faktor Tumbuh

Zat pengatur tumbuh dalam kultur jaringan tumbuhan tinggi secara *in vitro* terutama auksin maupun sitokinin berperan meningkatkan perbesaran sel atau pembelahan sel. Hal ini sangat tergantung pada tipe eksplan dan jenis tumbuhan yang dikulturkan (Pierik, 1987). Pernyataan ini diperkuat oleh Wareing dan Philips (1981) yang menyatakan bahwa zat pengatur tumbuh mempunyai peranan dalam pertumbuhan dan perkembangan. Zat pengatur juga mempengaruhi proses koordinasi pada semua fase pertumbuhan dan perkembangan, misalnya pembelahan sel, pemanjangan akar, pemasakan buah, menghilangkan dormansi serta menunda penuaan.

Auksin dan sitokinin merupakan dua golongan zat pengatur tumbuh yang penting dalam kultur jaringan. Warieng dan Phillips (1981) menegaskan bahwa bila beberapa zat pengatur tumbuh diberikan pada saat yang bersamaan maka akan berinteraksi dalam mempengaruhi pertumbuhan atau perkembangan yang lebih baik dibanding bila zat pengatur tumbuh berada sendirian.

Perkembangan embrio somatik secara *in vitro* pada wortel berlangsung melalui dua tahap, masing-masing memerlukan medium yang berbeda. Pada langkah pertama bertujuan untuk memacu pembelahan sel-sel embriogenik diperlukan medium dengan auksin. Umumnya golongan auksin yang dipergunakan adalah 2,4-D sebesar 0,5 – 1,0 mg/l. Dalam medium proliferasi, kalus dapat terdiferensiasi menjadi kelompok sel meristematis yang disebut *embryonic clumps* (EC). Pada subkultur yang berulang-ulang pada medium proliferasi, EC akan memperbanyak diri tanpa membentuk embrio dewasa. Pada langkah

kedua adalah perkembangan embrio yang tidak memerlukan auksin. Jika EC dipindahkan kedalam medium dengan kadar auksin rendah, kedalam medium tanpa auksin, maka EC akan berkembang menjadi embrio. Auksin dalam konsentrasi tinggi justru dapat meracuni jaringan, sedangkan keberadaan sitokinin dapat memacu perkembangan embrio sehingga menjadi dewasa (Bhojwani dan Razdan, 1983).

Peranan auksin dalam embriogenesis juga didukung oleh suatu penelitian tentang perilaku jaringan kalus *Citrus sinensis*. Mula-mula kalus *nucellar* pada *Citrus sinensis* membutuhkan IAA dan kinetin untuk pertumbuhan diferensiasi embrio (Bhojwani dan Razdan, 1983).

Penelitian yang dilakukan oleh Halperin dan Wetherell dalam Raghavan (1976), memperlihatkan perlunya auksin dan sitokinin untuk embriogeni. Pada penelitian selanjutnya efisiensi pembentukan embrioid lebih tinggi dengan adanya 2,4 D saja. Sebaliknya penelitian lain menunjukkan, bahwa pembentukan tidak pernah menampakkan peran auksin, atau dengan memperkecil konsentrasi auksin dalam medium, akan efektif dengan memindahkan jaringan dari konsentrasi auksin yang tinggi ke konsentrasi yang rendah, atau ke dalam medium yang mengandung anti auksin (Raghavan, 1976). Subkultur kalus yang berulang akan mengakibatkan hilangnya potensi embriogenik.

Sitokinin berperan penting dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis, khususnya jika ditambahkan bersama auksin. Peranan sitokinin dalam embriogenesis, agak kabur karena adanya hasil-hasil penelitian yang bertentangan. Meskipun zeatin merangsang embriogenesis pada suspensi sel wortel selama subkultur yang bebas auksin, tetapi proses ini dihambat oleh penambahan kinetin maupun bensil adenine. Pengaruh penghambatan sitokinin eksogen mungkin akibat dari kenaikan sitokinin endogen pada perkembangan embrioid (Dodds dan Robert, 1983).

## **BAB III**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **3.1. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui:

- (1) Pengaruh iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dalam menginduksi terbentuknya kalus pada kultur pucuk batang tebu (*Saccharum sp*) *In Vitro*.
- (2) Perkembangan embrioid kalus tebu (*Saccharum sp*) yang berasal dari suspensi sel-sel kalus pucuk batang.

#### **3.2. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran pengaruh iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dalam menginduksi pembentukan kalus dan perkembangan embrio somatik tanaman tebu (*Saccharum sp*) *In Vitro* sehingga dapat memperjelas pemanfaatan iradiasi sinar gamma tersebut dalam teknik kultur *in vitro*.

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juli 2002 sampai bulan Februari 2003 di bagian Kultur Jaringan Tumbuhan, Laboratorium Biologi Reproduksi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Airlangga Surabaya.

Radiasi eksplan dilakukan di bagian UPF Radiologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

#### **4.2. Bahan Penelitian**

##### **4.2.1. Bahan tanaman**

Digunakan tanaman tebu (*Saccharum* sp); eksplan yang dipakai adalah pucuk batang tebu yang diperoleh dari P3GI Pasuruan.

##### **4.2.2. Bahan kimia**

Bahan kimia yang digunakan meliputi bahan kimia penyusun media Murashige dan Skoog (MS)(1962); 2,4 D; Kinetin.

#### **4.3. Alat Penelitian**

Alat utama yang digunakan adalah: *Laminar Air Flow Cabinet* untuk menanam eksplan dan sub kultur kalus, *autoclave* untuk sterilisasi alat dan media, skalpel, pinset, jarum ose, pesawat teletherapy  $\text{Co}^{60}$ , type Alycon II P<sub>1</sub> untuk radiasi eksplan tebu.

#### **4.4. Cara Penelitian**

##### **4.4.1. Pembuatan media**

Pembuatan Media Murashige dan Skoog dilakukan menurut cara Dodd & Robert (1982), dengan cara mencampur komponen-komponen yang dibutuhkan seperti pada lampiran 1. Pada pembuatan media ini, perlu disediakan larutan stok mikronutrien, zat besi, vitamin, zat pengatur tumbuh.

#### 4.4.2. Pembuatan larutan stok mikronutrien

Dilakukan dengan membuat persediaan dalam 200 ml, yaitu menimbang dan melarutkan bahan-bahan mikronutrien kedalam 100 ml akuades kemudian ditambahkan akuades sampai 200 ml dan disimpan dalam lemari es. Untuk pembuatan 11 media digunakan 5 ml larutan stok mikronutrien.

#### 4.4.3. Pembuatan larutan stok zat besi

Dilakukan dengan membuat persediaan dalam 200 ml, yaitu menimbang  $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dan dilarutkan dalam 50 ml akuades, kemudian sedikit demi sedikit ditambahkan  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  sambil diaduk di atas pengaduk magnetik dan dipanaskan sampai warnanya menjadi jernih. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar 200 ml, ditambah akuades sampai tanda batas. Kemudian larutan disimpan dalam lemari es. Untuk pembuatan 11 media ditambahkan 5 ml larutan stok zat besi.

#### 4.4.4. Pembuatan larutan stok vitamin

Dilakukan dengan membuat larutan persediaan dalam 200 ml. Vitamin yang diperlukan ditimbang dan dilarutkan ke dalam 50 ml akuades. Larutan di pindahkan kedalam labu takar 100 ml dan ditambah akuades sampai tanda batas. Kemudian larutan disimpan dalam lemari es. Untuk pembuatan 11 media ditambahkan 10 ml larutan persediaan vitamin.



#### 4.4.5. Pembuatan larutan stok zat pengatur tumbuh 2,4 D dan Kinetin

Dibuat dengan menimbang zat pengatur tumbuh 10 mg dalam gelas piala 100 ml, kemudian dilarutkan dengan menambah beberapa tetes asam klorida 1 N. Larutan dipindahkan kedalam labu takar 100 ml dan ditambah akuades sampai tanda batas.

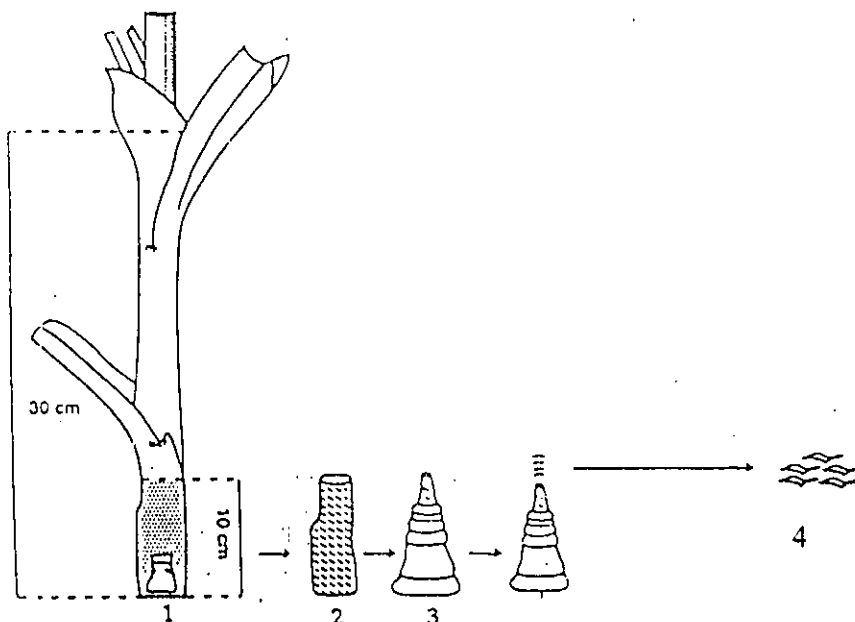
#### 4.4.6. Pembuatan media MS untuk kultur pucuk batang tebu

Media MS untuk kultur pucuk batang tebu yang telah dimasak dan disterilisasi dalam autoclave pada suhu 121<sup>0</sup>C, tekanan 1,2 atm selama 15 menit dituang kedalam petridish berdiameter 6 cm di dalam *laminar air flow cabinet* kemudian bagian tepinya dilapisi dengan parafilm dan disimpan selama tiga hari sebelum dilakukan penanaman.

#### 4.4.7. Perlakuan dan penanaman eksplan

Tujuan dari tahap ini adalah menumbuhkan kalus dari eksplan irisan daun muda yang masih menggulung pada bagian apikal meristem yang telah di iradiasi. Dengan menggunakan pinset, potongan pucuk yang mengandung titik tumbuh (Gambar 2) disterilkan secara fisik dengan pembakaran, yaitu dengan mencelupkan potongan pucuk tersebut ke dalam alkohol 96% kemudian dilewatkan di atas lampu spiritus sampai alkoholnya habis terbakar. Pelepah daun yang menutupi pucuk tersebut dikupas dan dicelupkan ke dalam alkohol 96% kemudian dilewatkan di atas lampu spiritus sampai alkoholnya habis terbakar, dan diulang 2 sampai 3 kali pembakaran. Pengelupasan pelepah diakhiri hingga nampak adanya daun muda yang masih menggulung dengan diameter kira-kira 1 cm. Dibuat irisan melintang dengan tebal 3 sampai 5 mm pada daun muda yang masih menggulung sebanyak 8 sampai 12 irisan, dengan menggunakan pinset eksplan dimasukkan ke dalam petridis berdiameter 6 cm. Setiap Petridis berisi 6 eksplan, kemudian ditutup dan dilapisi dengan parafilm. Setelah itu eksplan disimpan dalam ruang inkubasi selama 3 hari kemudian di iradiasi dengan sinar gamma Co<sup>60</sup>. Setelah di iradiasi, eksplan

diambil dan ditanam dalam tabung kultur yang berisi media MS, dan diamati perkembangan eksplannya.



Gambar 2. Cara pengambilan eksplan pucuk batang tebu yang akan dikulturkan

1. Pucuk batang tebu dengan titik tumbuh
2. Potongan pucuk batang tebu yang akan diambil jaringannya
3. Potongan pucuk batang tebu setelah dikupas pelepah daunnya
4. Bahan jaringan yang akan dikulturkan

#### 4.4.8. Suspensi sel dan inisiasi embrioid

Kalus embrionik dari hasil iradiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dengan berat  $\pm 200$  mg dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang berisi 25 ml medium MS cair yang ditambah 0,5 mg/l 2,4 D + 2,0 mg/l kinetin. Setelah itu Erlenmeyer dibungkus aluminium foil dan diletakkan pada shaker dengan kecepatan 80 rpm. Setiap 1 minggu sekali dilakukan subkultur media dengan cara mengganti media baru.

Setelah minggu ke-2 dilakukan tahap inisiasi embrioid dan perkembangan embrioid dengan mengkulturkan suspensi sel pada media MS cair yang mengandung kinetin 1mg/l, kemudian Erlenmeyer diletakkan di atas penggojok. Pengamatan perkembangan embrioid

kemudian Erlenmeyer diletakkan di atas penggojok. Pengamatan perkembangan embrioid dilakukan di bawah mikroskop dengan cara mengambil cuplikan masa sel ditaruh di atas gelas benda dan ditetesi gliserin, pewarna *hematoxylin* kemudian ditutup dengan gelas penutup.

#### 4.5. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas, berupa dosis radiasi yang digunakan.
2. Variabel terikat, meliputi: lama waktu (hari) eksplan membentuk kalus dan perkembangan embrioid yang berasal dari suspensi sel
3. Variabel yang disamakan: pH, suhu.

#### 4.6. Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan setiap perlakuan diulang 7 kali. Kelima perlakuan tersebut adalah sebagai berikut:

D0 = kalus diradiasi dengan dosis 0 rad

D100 = kalus diradiasi dengan dosis 100 rad

D500 = kalus diradiasi dengan dosis 500 rad

D1000 = kalus diradiasi dengan dosis 1.000 rad

D1500 = kalus diradiasi dengan dosis 1.500 rad.

#### **4.7. Pengamatan**

Pengamatan terhadap induksi kalus dilakukan setiap hari sampai hari ke-30 terhadap lama waktu (hari) eksplan membentuk kalus. Pengamatan terhadap perkembangan embrioid dilakukan di bawah mikroskop cahaya.

#### **4.8. Analisis data**

Data yang telah diperoleh kemudian dianalisis secara diskriptif dan dengan menggunakan Analisis Varian. Apabila ada pengaruh dilanjutkan dengan Uji LSD pada taraf signifikansi 5%, sedangkan pola perkembangan embrioid dikumpulkan dalam bentuk foto.

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Hasil Penelitian

Hasil pengamatan terhadap rerata lama waktu (hari) eksplan tebu (*Saccharum spp*) membentuk kalus pada berbagai perlakuan dosis iradiasi disajikan pada tabel 1 di bawah ini.

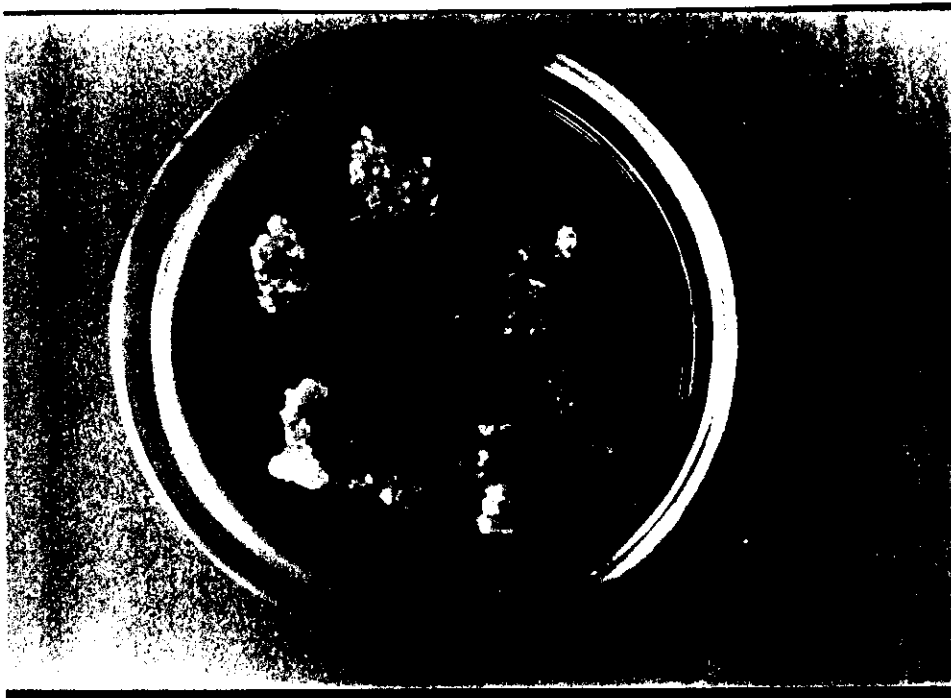
Tabel 1. Rerata lama waktu (hari) eksplan tebu membentuk kalus pada berbagai dosis perlakuan iradiasi Co<sup>60</sup>

Perlakuan	Rerata lama waktu (hari) eksplan tebu ( <i>Saccharum spp</i> ) membentuk kalus
D0	19,57 ± 0,53 <sup>a</sup>
D100	13,85 ± 1,07 <sup>b</sup>
D500	17,28 ± 0,49 <sup>c</sup>
D1000	15,85 ± 0,69 <sup>d</sup>
D1500	18,85 ± 0,90 <sup>e</sup>

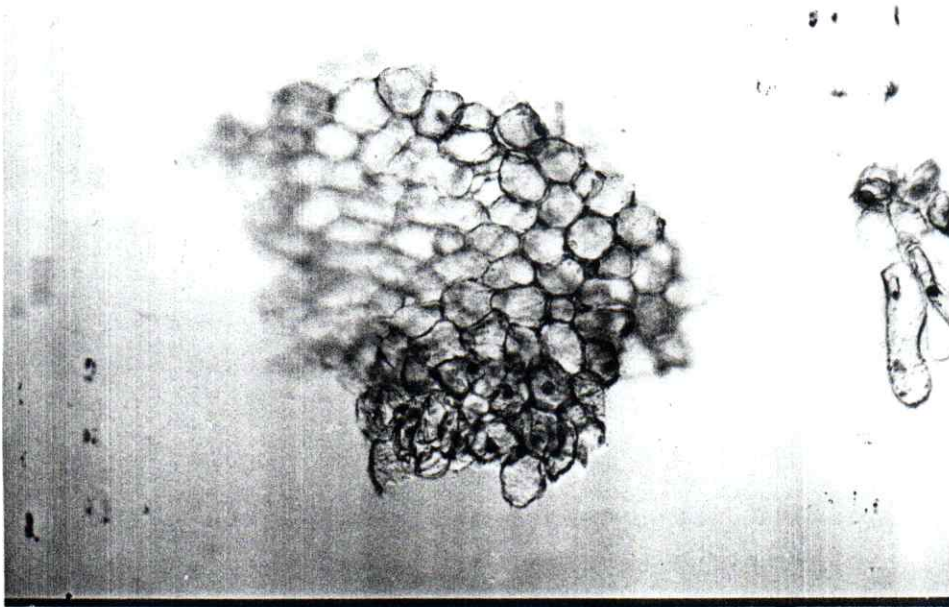
Keterangan: Angka rerata dalam kolom yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada taraf  $\alpha$ : 0,05



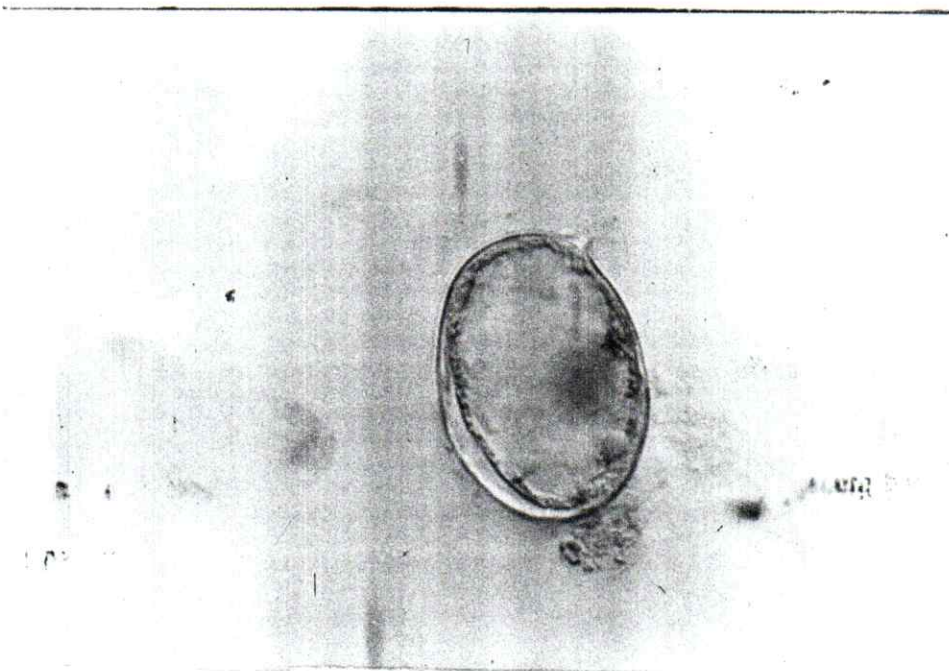
Gambar 3. Kalus dari eksplan pucuk batang tebu *Saccharum* spp



Gambar 4. Kalus tebu setelah disubkultur pada media MSI



Gambar 5. Struktur anatomi sel-sel kalus tebu



Gambar 6. Sel kalus tebu tunggal setelah digojog



Gambar 7. Hasil diferensiasi kalus tebu membentuk tunas

## 5.2. Pembahasan

Pengamatan terhadap eksplan pucuk batang tebu setelah diiradiasi dan diinokulasi dilakukan secara visual. Setelah eksplan ditanam dalam media MS I, eksplan mengalami pembengkakan, membesar dari ukuran semula, kemudian pada permukaan eksplan muncul kalus yang dimulai dari luka bekas potongan yang kontak dengan media, kemudian berlanjut dengan pertumbuhan kalus sebagai akibat dari berproliferasinya sel-sel penyusun kalus, sehingga menutup sebagian atau bahkan seluruh permukaan eksplan (gambar 2). Hal ini sesuai dengan pendapat Dodds dan Robert (1982) yang menyatakan bahwa terjadinya kalus di tempat irisan yang bertujuan untuk menutup luka.

Hasil analisis varian (lampiran 2) menunjukkan bahwa ada pengaruh perlakuan iradiasi sinar gamma terhadap lama waktu eksplan membentuk kalus secara signifikan



karena diperoleh nilai probabilitas  $< 0,05$ , sehingga dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan untuk mengetahui beda antar perlakuan.

Hasil pengamatan terhadap lama waktu eksplan membentuk kalus menunjukkan bahwa perlakuan iradiasi dosis 100 rad mampu menginduksi pembentukan kalus lebih cepat dibanding perlakuan yang lain, hal ini sesuai dengan hasil analisis uji LSD yaitu perlakuan iradiasi dosis 100 rad berbeda nyata dengan perlakuan iradiasi dosis 500 rad, 1000 rad, 1500 rad, dan 0 rad. Hal ini dimungkinkan karena radiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dapat mengganggu kondisi fisiologis sel-sel meristem penyusun eksplan. Untuk dapat membentuk kalus, sel-sel penyusun meristem harus dalam kondisi optimal. Selama periode dua minggu tersebut tampaknya sel-sel yang mungkin mengalami kerusakan fisiologis telah mampu memperbaiki atau memperbaiki diri. Hal ini dimanifestasikan adanya pembentukan kalus yang lebih cepat pada perlakuan iradiasi dosis 100 rad dibanding perlakuan yang lain. Hal ini didukung pernyataan Ichikawa dan Ikusima (1967) bahwa dengan perlakuan iradiasi sinar gamma pada suatu tingkat dosis tertentu dapat merangsang pertumbuhan tanaman. Hal ini disebabkan hilangnya kemampuan sebagian sel pada meristem untuk membelah diri, menyebabkan aktivitas pembelahan sel-sel meristem yang lain meningkat. Perlakuan iradiasi  $\text{Co}^{60}$  dengan dosis 100 rad ternyata juga mampu meningkatkan pembentukan tunas adventif pada kultur kalus *Anthurium andreanum* telah dilaporkan oleh Pierik (1987).

Dari hasil pengamatan nampak bahwa semakin besar dosis iradiasi ternyata pembentukan kalus semakin lama (kecuali pada dosis 1000 rad) dan kalus yang terbentuk sedikit. Hal ini mengindikasikan bahwa semakin besar dosis iradiasi akan semakin menghambat pembentukan kalus. Penghambatan waktu pembentukan kalus diduga disebabkan oleh kerusakan seluler pada sebagian sel-sel meristem penyusun eksplan yang

diiradiasi, sehingga menyebabkan berkurangnya konsentrasi auksin bebas dalam sel meristem, sehingga menghambat pembelahan sel. Hal ini didukung oleh Gordon (1961) yang menyatakan bahwa berkurangnya konsentrasi auksin disebabkan oleh penghambatan sistem enzim yang sangat radiosensitif sehingga proses perubahan indol acetaldehyde menjadi IAA terganggu. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan Tetelepta dan Hendratno (1966) bahwa efek yang sering dijumpai pada perlakuan iradiasi sinar gamma adalah penghambatan atau stimulasi pertumbuhan.

Dari hasil pengamatan nampak bahwa pada perlakuan iradiasi dengan dosis 500 rad, 1000 rad, dan 1500 rad kalus yang terbentuk sedikit dan mengalami kematian, walaupun dalam waktu yang tidak bersamaan. Hal ini dimungkinkan karena radiasi sinar gamma  $Co^{60}$  dapat mengganggu kondisi fisiologis sel-sel kalus. Untuk dapat bertahan hidup dan berproliferasi, sel-sel kalus tersebut harus dalam kondisi optimal. Selama periode tiga minggu tampaknya sel-sel yang mengalami kerusakan fisiologis tidak mampu memperbaiki atau memperbaiki diri. Hal ini dimanifestasikan adanya warna kalus yang semula berwarna putih kekuningan berubah menjadi hitam yang mengindikasikan kalus tersebut telah mati.

Hasil pengamatan terhadap perkembangan embrioid, pada penelitian ini perkembangan embrioid belum dapat teramati. Hal ini menunjukkan bahwa semua sel kalus yang disuspensikan tidak mempunyai sifat embriogenik. Hal ini diduga karena kalus yang disuspensikan kurang *friable* sehingga sulit mendapatkan sel tunggal. Di samping itu dengan adanya perlakuan subkultur yang berulang-ulang (diperpanjang) dapat menurunkan sifat embriogenik sel kalus. Hal ini didukung Bhojwani dan Razdan (1983) yang menyatakan bahwa penurunan potensi embriogenik pada kultur suspensi sel yang diperpanjang yaitu dengan bertambahnya waktu sel-sel baru menjadi berkurang potensi

embriogeniknya, yang disebut dengan *instabilitas* sitologi pada sel-sel yang dikulturkan. Selain itu pada sel yang berulang-ulang disubkultur menjadi lebih sensitif terhadap penghambatan ekspresi totipotensinya atau mungkin disebabkan karena jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan belum sesuai.

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1. Kesimpulan**

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

- (1) Ada pengaruh perlakuan iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  terhadap lama waktu eksplan membentuk kalus dan perlakuan iradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  dengan dosis 100 rad dapat /mampu mempercepat pembentukan kalus eksplan pucuk batang tebu (*Saccharum sp*)
- (2) Perkembangan embrioid yang berasal dari suspensi sel kalus tebu sampai penelitian ini berakhir belum dapat teramati.

#### **6.2. Saran**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis radiasi  $\text{Co}^{60}$  yang tepat untuk meningkatkan diferensiasi kalus, diferensiasi akar, pertumbuhan akar, dan pertumbuhan tunas. Selain itu perlu dilakukan penelitian perkembangan embrioid yang berasal dari sel kalus tebu yang diiradiasi sinar gamma  $\text{Co}^{60}$  yang ditumbuhkan pada medium MS cair dengan kombinasi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1992. *Pembudidayaan Tebu di Lahan Sawah dan Tegalan*. Tim Penulis Penebar Swadaya. Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta.
- Anonim. 1993a. *Gula: Tinjauan Produksi dan Pemasaran Gula Indonesia*. Bank Bumi Daya, Pasuruan.
- Anonim. 1993b. Pengadaan Bibit Tebu Dengan Kultur Jaringan. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian* Vol XV. (3)
- Arditti, J dan Ernst, R. 1992. *Micropropagation of Orchids*. John Willey dan Sons Inc, Canada.
- Barnes, A. C. 1974. *The Sugar Cane*. Aylesbury, Leonard Hill Books.
- Bhojwani, S. S. dan Razdan, M. K. 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier Science Publishers B. V.
- Brown, W. V. dan Bertke, E. M., 1969, *Text Book of Cytology*. The CV Mosby Company, ST. Lonis. Company.
- Dixon, R.A. 1985. *Plant Cell Culture, A Practical Approach*. IRL Press Limited. Oxford. England.
- Dodds, Y. and Robert, L. W., 1983, *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press. London.
- George, E. F. and P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories*.
- Gordon, S. A., 1961, The Biogenesis of Auxin, *Encyc. Plant Physiology*
- Gumbira, E dan Said. 1996. Prospek Pemantapan Bioteknologi Untuk Penyediaan Pangan. *Majalah Pangan*. (VII) 228.
- Hendaryono, D. P. S. dan Ari, W. 1994. *Teknik Kultur Jaringan: Pengenalan Dan Petunjuk Perbanyak Tanaman Secara Vegetatif Modern*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Ichikawa, S. and Y. Ikushima. 1967. A. Development Study of Diploids Oats by Means of Radiation Induced Somatic Mutation Rad. *Bot.* 7: 205-215.
- Juniarso, T. 1993. Kultur Sel dan Jaringan. *Majalah Wahana*. Vol V(3).
- Katuuk, J. R. P. 1989. *Teknik Kultur Jaringan Dalam Mikropropagasi Tanaman*. Departemen P dan K Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. PPLPTK. Jakarta.

- Luc, M. Sikora, R. A and Bridge, J. 1995. Growing Sugarcane In the Recent Sands. **South African Sugar Jurnal**. Vol LX (369).
- Moebarokah. A. 1972. **Iradiasi Breeding Mutlak Perlu di Indonesia**. Kesimpulan Dan Kertas Kerja Karya Pertemuan Pembahasan Pemuliaan Mutasi BATAN. Jakarta.
- Pierik, R. L. M. 1987. **In Vitro Culture of Higher Plants** Marmus Nijhoff. Publisher
- Prasetyorini, G. A; Wattimena; Ika, M., 1992, Pemanfaatan Radiasi Sinar Gamma Untuk Multiplikasi Tunas In Vitro Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook), **Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi**, Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi LIPI, Bogor.
- Raghavan, V. 1976. **Experimental Embryogenesis in Vascular Planst**. Academic Press. London.
- Rahardja, P.C. 1995. **Kultur Jaringan-Teknik Perbanyakkan Tanaman Secara Modern**. Penerbit Penebar Swadaya, Bandung.
- Sastrowijono, S. 1991. Perkembangan Kultur Jaringan di Indonesia. **Proceeding Pelatihan Mikropropagasi Tanaman Tebu**. Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI).
- Sastrowijono, S., 1976, Perkembangan Kultur Jaringan di Indonesia, **Proceedings Pelatihan Penanganan Mikropropagasi Tanaman Tebu**, Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI).
- Soebroto, R.S.H. 1972. **Tebu Rakyat**. Penerbit Terate, Bandung.
- Soekarso, G. 1991. Pemuliaan Tebu Non Konvensional. **Majalah Pemuliaan Gula**. Vol XX(4).
- Soeryowinito, M. 1991. **Pemuliaan Tanaman Secara In Vitro**. UGM Prees, Yogyakarta.
- Steenis, C.G.G.J. 1992. **Flora**. Penerbit PT Pradya Paramita, Jakarta.
- Tetelepta, dan T., dan Hendratno, 1966, Penelitian Pendahuluan Tentang Pengaruh Radiasi Sinar Gamma  $Co^{60}$  Pada Tembakau, **Aplikasi Radioisotop**, Bandung, Agustus 1966, BATAN, Jakarta.
- Tjitrosoepomo, G. 1988. **Taksonomi Tumbuhan Tinggi**. UGM Prees, Yogyakarta.
- Utami, E. S. W., Manuhara, Y. S. W., Hariyanto, S, 2001. Studi Pengaruh Iradiasi Sinar Gamma  $Co^{60}$  Terhadap Diferensiasi dan Pertumbuhan Planlet Tebu (*Saccharum sp*) var PS 862 In Vitro, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Wereing, P. F. and D.J. Phillips. 1975. **The Control of Growth and Differentiation in Plants**. Pergamon Press. Ltd., Oxford. New York. Directory of Commercial Laboratories.

- Wereing, P. F. and D.J. Phillips. 1981. **Growth and Differentiation in Plants**. Pergamon Press. Ltd., Oxford. New York.
- Wetherell, D.F. 1982. **Pengantar Propagasi Tanaman Secara In Vitro**. (terjemahan oleh Koensoemardiyah). IKIP Semarang Press.
- White, P.R. 1963. **The Cultivation of Animal and Plant Cells**. The Ronald Prees.
- Willson, G.B. and Morrison, J.H., 1966. **Cytology**, Van Nostrand Teinhold Company, New York, Cicinati, Toronto.
- Winata, L. 1988. **Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan**. Dedikbud-Dirjen Dikti. Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi. Institute Pertanian Bogor.

# LAMPIRAN



## Lampiran 1. Komponen Media Murashige and Skoog (MS)

	mg/l
<b>A. Makronutrien</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>B. Mikronutrien</b>	
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,300
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8,600
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,830
KI	0,250
Na <sub>2</sub> MO.2H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>C. Besi</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	37,30
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80
<b>D. Vitamin</b>	
Pyridoxin-HCl (Vit. B6)	0,50
Thiamin	0,10
<b>E. Asam Amino</b>	
Glisin	2,0
Asam Nikotinat	0,5
<b>F. Zat Organik</b>	
Mio inositol	100
Sukrosa	30.000
<b>G. Agar</b>	
pH	5,6 - 6
Ditambah 2,4D dan Kinetin	

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

Lampiran 2. Analisis Varian lama waktu (hari) eksplan tebu membentuk kalus dan uji  
Duncan lama waktu (hari) eksplan tebu membentuk kalus

## Oneway

## ANOVA

HARI\_KE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	341,962	4	85,490	154,235	,000
Within Groups	55,429	100	,554		
Total	397,390	104			

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: HARI\_KE

LSD

(I) PERLAKUA	(J) PERLAKUA	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
D 0	D 100	5,7143*	,3446	,000	5,0305	6,3980
	D 500	2,2857*	,3249	,000	1,6411	2,9302
	D 1000	3,7143*	,3146	,000	3,0901	4,3385
	D 1500	,7143*	,3083	,023	,1027	1,3259
D 100	D 0	-5,7143*	,3446	,000	-6,3980	-5,0305
	D 500	-3,4286*	,2569	,000	-3,9332	-2,9240
	D 1000	-2,0000*	,2437	,000	-2,4835	-1,5165
	D 1500	-5,0000*	,2354	,000	-5,4671	-4,5329
D 500	D 0	-2,2857*	,3249	,000	-2,9304	-1,6411
	D 100	3,4286*	,2569	,000	2,9189	3,9332
	D 1000	1,4286*	,2149	,000	1,0022	1,8550
	D 1500	-1,5714*	,2055	,000	-1,9791	-1,1637
D 1000	D 0	-3,7143*	,3146	,000	-4,3385	-3,0901
	D 100	2,0000*	,2437	,000	1,5165	2,4835
	D 500	-1,4286*	,2149	,000	-1,8550	-1,0022
	D 1500	-3,0000*	,1888	,000	-3,3745	-2,6255
D 1500	D 0	-,7143*	,3083	,023	-1,3259	-10,27
	D 100	5,0000*	,2354	,000	4,5329	5,4671
	D 500	1,5714*	,2055	,000	1,1637	1,9791
	D 1000	3,0000*	,1888	,000	2,6255	3,3745

\* The mean difference is significant at the .05 level.

2003

PAM...AN

