

## Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan Kinetin Pada Induksi dan Regenerasi Tebu Melalui Metode *Thin Cell Layer*

### *Effect of 2,4-D and Kinetin Concentration on Sugarcane Induction and Regeneration Through Thin Cell Layer Method*

Aldhila Rizqi Widya Mardiana<sup>1)</sup>, Parawita Dewanti<sup>2,3\*)</sup>, Firdha Narulita Alfian<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember  
Jl. Kalimantan No.37, Sumbersari, Kabupaten Jember, Jawa Timur 68122

<sup>2)</sup>Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember  
Jl. Kalimantan No.37, Sumbersari, Kabupaten Jember, Jawa Timur 68122

<sup>3)</sup>Center for Development of Advanced Science and Technology (CDAST), Universitas Jember

Jl. Kalimantan No.37, Sumbersari, Kabupaten Jember, Jawa Timur 68122

<sup>4)</sup>Magister Bioteknologi, Universitas Jember

Jl. Kalimantan No.37, Sumbersari, Kabupaten Jember, Jawa Timur 68122

<sup>\*)</sup> Penulis untuk korespondensi E-mail: [parawita.faperta@unej.ac.id](mailto:parawita.faperta@unej.ac.id)

**Diajukan:** 6 Januari 2023 **/Diterima:** 24 Oktober 2023 **/Dipublikasi:** 28 November 2023

#### ABSTRACT

*Provision of sugarcane seeds is considered to be still experiencing problems due to the long time it takes to produce seeds and the limited availability of seeds. An alternative to overcome this problem is to produce sugarcane seeds through tissue culture using the thin cell layer method. The research was conducted to examine the effect of giving plant growth regulator (PGR) 2,4-D and kinetin to the planting medium through the thin cell layer method on the formation of callus and sugarcane plantlets. The explants used were in vitro cane basalt which were grown onto induction media using MS base media (Murashige & Skoog) with the addition of PGR 2,4-D and Kinetin and planted using the thin cell layer method. The concentrations of 2,4-D used were 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, and 4 mg/L; kinetin concentrations used were 0 mg/L, 1 mg/L, and 2 mg/L. The results of the induced callus were then transferred to the proliferation medium for callus growth which went through 4 phases, namely the globular phase, the scutellar phase, the coleoptile phase, and the cotyledon phase. The callus that has entered the cotyledon phase is then transferred to the regeneration medium to form new plantlets. The research results showed that the use of PGR with a combination of 2,4-D 3 mg/L + kinetin 0 mg/L (D3K0) in the culture media gave the best response in the formation of sugarcane callus induction with an average percentage of callus growth reaching 60.00%. while the concentration of 2,4-D 3 mg/L + kinetin 1 mg/L (D3K1) was the most effective concentration for forming sugarcane plantlets with an average plantlet growth of 14.00 plantlets.*

**Keywords:** Basal; Callus; Embryogenic Somatic; Thin Cell Layer

#### INTISARI

Penyediaan bibit tebu dianggap masih mengalami kendala yang disebabkan karena bibit yang dihasilkan membutuhkan waktu yang lama dan jumlah ketersediaan bibitnya terbatas. Alternatif untuk mengatasi permasalahan ini adalah memproduksi bibit tebu melalui kultur jaringan dengan metode *thin cell layer*. Penelitian dilakukan untuk mengkaji pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh (ZPT) 2,4-D dan kinetin pada media

tanam melalui metode *thin cell layer* terhadap pembentukan kalus dan planlet tebu. Eksplan yang digunakan adalah basal tebu *in vitro* yang ditanam ke media induksi menggunakan media dasar MS (Murashige & Skoog) dengan penambahan ZPT 2,4-D dan Kinetin dan ditanam dengan menggunakan metode *thin cell layer*. Konsentrasi 2,4-D yang digunakan adalah 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, dan 4 mg/L; konsentrasi kinetin yang digunakan adalah 0 mg/L, 1 mg/L, dan 2 mg/L. Hasil kalus induksi kemudian dipindah ke media proliferasi untuk pertumbuhan kalus yang melalui 4 fase, yaitu fase globular, fase skutelar, fase koleoptil dan fase kotiledon. Kalus yang sudah masuk fase kotiledon kemudian dipindahkan ke media regenerasi untuk membentuk planlet baru. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan ZPT dengan kombinasi 2,4-D 3 mg/L + kinetin 0 mg/L (D3K0) pada media kultur memberikan respon terbaik dalam pembentukan induksi kalus tebu dengan rata-rata persentase tumbuh kalus mencapai 60,00%, sedangkan konsentrasi 2,4-D 3 mg/L + kinetin 1 mg/L (D3K1) adalah konsentrasi yang paling efektif untuk pembentukan planlet tebu dengan rata-rata tumbuh planletnya mencapai sebanyak 14,00 planlet.

**Kata kunci:** Basal; Kalus; Somatik Embriogenik; *Thin Cell Layer*

## PENDAHULUAN

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman perkebunan yang memiliki nilai ekonomi tinggi karena pada bagian batangnya mengandung sukrosa tinggi yang dimanfaatkan sebagai bahan baku utama dalam pembuatan gula. Pemanfaatan tanaman tebu tidak hanya untuk menghasilkan gula untuk bahan makanan saja, namun saat ini juga dimanfaatkan dalam bidang industri farmasi, yaitu dapat menghasilkan *nanocellulose* yang banyak digunakan sebagai bahan dasar pembuatan kosmetik (Yuwono, M. 2021), sumber bahan bakar (*biofuel*) (Akram, A. B. 2021), dan bahan dasar pembuatan pulp (bubur kertas) (Ahmad dkk. 2020).

Tanaman tebu memiliki begitu banyak manfaat, namun dalam proses peningkatan produktivitasnya masih mengalami beberapa kendala. Menurut data Direktorat Statistik Tanaman Pangan, Hortikultura, dan Perkebunan (2021) produksi tanaman tebu selama 1 dekade terakhir mengalami

penurunan. Pada tahun 2021 produksi gula nasional menghasilkan gula sebanyak 2,35 juta ton, sedangkan kebutuhan gula pada tahun 2022 mencapai 6,48 juta ton. Dari data tersebut dapat dilihat bahwa produksi gula nasional belum mampu memenuhi kebutuhan konsumsi gula nasional. Penyebab menurunnya produksi gula ini disebabkan karena belum terpenuhinya kebutuhan bibit tebu baik secara kuantitas maupun kualitas yang kurang memadai (Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat. 2021).

Pengadaan bibit tanaman tebu biasanya dilakukan secara vegetatif menggunakan stek, namun cara ini dianggap kurang efektif karena membutuhkan waktu yang lama, membutuhkan batang tebu dalam jumlah banyak, dan membutuhkan lahan yang luas. Berdasarkan beberapa masalah tersebut, diperlukan teknologi untuk penyediaan bibit dalam waktu singkat, tidak memakan tempat, dan hasilnya berkualitas. Adapun teknik perbanyakan dalam

penyediaan bibit yang berkualitas ini adalah dengan memanfaatkan teknologi, yaitu teknik kultur jaringan. Pengadaan bibit dengan kultur jaringan juga bisa dilakukan dengan beberapa metode, seperti yang telah dilakukan oleh Sholeha dkk. (2015) dengan menggunakan eksplan gulungan daun muda (*spindle leaf*) tebu. Penggunaan eksplan ini dianggap kurang efektif karena masih perlu dilakukannya sterilisasi eksplan agar tidak terjadinya kontaminasi sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama dalam proses pengadaannya. Metode *thin cell layer* merupakan metode baru yang dianggap dapat menghemat waktu dalam pengadaan bibit tebu. *Thin Cell Layer* (TCL) merupakan salah satu metode perbanyakan secara *in vitro* dengan menggunakan eksplan dengan ukuran yang tipis yaitu antara 0,5 – 1 mm yang dihasilkan dari potongan organ tanaman (Nhut *et al.*, 2013). Kelebihan dari penggunaan metode *Thin Cell Layer* (TCL) adalah dapat menghasilkan planlet dengan jumlah banyak karena penggunaan eksplannya yang banyak dengan ukuran yang tipis. Perbedaan dalam penggunaan eksplan yang berukuran tipis dan penggunaan eksplan yang digunakan dengan metode baku, yaitu dengan eksplan yang tipis diharapkan mampu berkontak langsung dengan media sehingga bisa mendapatkan kalus dengan jumlah yang banyak (Nhut *et al.* 2013). Keberhasilan pembentukan kalus dibutuhkan penambahan zat pengatur tumbuh yang tepat.

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang ditambahkan pada media tanam adalah untuk

merangsang pertumbuhan perkecambahan, tunas, dan akar karena pada tubuh tanaman hanya memiliki senyawa organik yang jumlahnya sangat sedikit sehingga diperlukan tambahan ZPT untuk merangsang pertumbuhan eksplan. Komposisi media induksi yang dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus adalah penggunaan ZPT dari golongan auksin dan sitokinin. Menurut Widiastoety, (2014) dan Waryastuti dkk, (2017) ZPT golongan auksin seperti 2,4-D berfungsi untuk menstimulasi pemanjangan dan pembesaran sel, sedangkan ZPT golongan sitokinin seperti kinetin berfungsi dalam pembelahan sel. Penggunaan 2,4-D dalam konsentrasi yang tepat dapat menghasilkan kalus embriogenik pada fase induksi kalus dan fase proliferasi. Adanya keseimbangan tertentu dari auksin dan sitokinin pada media kultur akan meningkatkan pembesaran dan pembelahan sel (Hayati dkk., 2010).

Literatur penggunaan ZPT 2,4-D pada tebu untuk induksi dan regenerasi telah dipelajari sebelumnya oleh Dewanti dkk., (2019) dimana penggunaan ZPT 2,4-D dengan konsentrasi tinggi mampu mempercepat munculnya kalus embriogenik dan meningkatkan persentase eksplan berkalus. Penelitian sebelumnya hanya menggunakan ZPT auksin 2,4-D saja tanpa adanya kombinasi ZPT sitokinin. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan hasil kombinasi konsentrasi penggunaan ZPT auksin dan sitokinin yang tepat untuk menghasilkan bibit tebu melalui somatik embriogenesis.

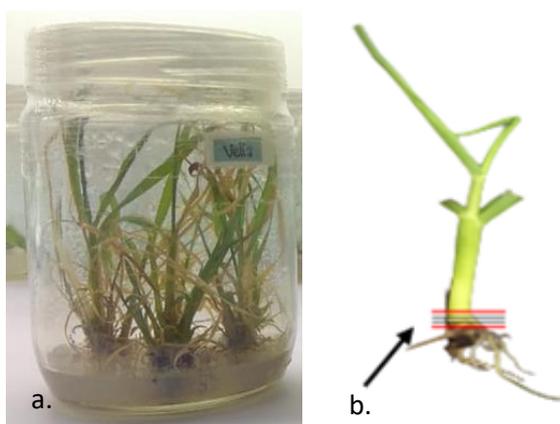
## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*), Universitas Jember. Bahan tanam yang digunakan adalah tunas basal *in vitro* tebu varietas Bululawang (BL) berumur 1 bulan yang didapatkan dari hasil kultur sebelumnya di media perbanyakan. Tunas yang akan digunakan sebagai eksplan sebelumnya dilakukan seleksi dan dipilih sesuai dengan kriteria, yaitu tunas yang sehat dan memiliki tinggi  $\pm 1 - 3$  cm, sedangkan tunas yang kurang memenuhi kriteria akan di subkultur pada media MS untuk mendapatkan tunas baru yang akan digunakan sebagai eksplan. Proses subkultur tunas tebu ini dilakukan di dalam LAF. Tanaman yang memenuhi kriteria diambil dari botol kultur kemudian dibersihkan dari sisa media. Tunas yang telah bersih tersebut kemudian dipotong pada bagian

basalnya dengan ukuran 1 cm dari pangkal dengan menggunakan pisau scalpel. Basal tersebut kemudian dipotong tipis menjadi ukuran sekitar 0,5 – 1 mm seperti yang terlihat pada gambar 1.

### Induksi Kalus

Seluruh media dalam penelitian menggunakan media Murashige and Skoog (MS) sebagai media dasar dengan penambahan zat pengatur tumbuh sesuai dengan perlakuan (Tabel 1). Media untuk induksi kalus terdiri dari MS + ZPT 2,4-D dan Kinetin (Tabel 1) + 300 mg/L Kasein Hidrolisat + 5 g/L Agar + 30 g/L Sukrosa dengan pH 6,0. Eksplan ditanam di dalam LAF Thermo kemudian botol kultur disimpan pada ruang gelap ditutup dengan kain hitam dengan kondisi suhu 23° - 25°C selama 2 minggu. Hasil akhir tahap induksi kalus adalah kalus embriogenik *Pre Embriogenik Mass* (PEM) dan kalus globular.



Gambar 1. Persiapan Bahan Tanam

Keterangan: a) Planlet tebu *In-Vitro*; b) Bagian basal tebu yang digunakan untuk perbanyakan

### Proliferasi Kalus

Kalus embriogenik yang terbentuk selama 2 minggu kemudian dipindahkan ke media proliferasi. Media proliferasi terdiri dari MS + 2 mg/L 2,4-D + 500 mg/L Kasein Hidrolisat + 40 mg/L L-Glutamin (Merck) + 560 mg/L L-Prolin (Sigma) + 5 g/L Agar + 30 g/L Sukrosa. Pada tahap proliferasi ini dilakukan pengamatan morfologi kalus mulai globular, skutelar, koleoptil, dan kotiledon dengan menggunakan mikroskop Leica EZ4HD. Proliferasi kalus dilakukan pada ruang terang dengan kondisi suhu 23° – 25°C selama 6 – 7 minggu.

### Regenerasi

Kalus kotiledon yang mulai muncul *green-spot* kemudian dipindahkan ke media regenerasi. Media regenerasi terdiri dari MS + 1,5 mg/L BA + 0,5 mg/L NAA + 100 mg/L Kasein Hidrolisat + 40 mg/L L-Glutamin + 5 g/L Agar + 30 g/L Sukrosa. Regenerasi dilakukan pada kondisi penyinaran lampu selama 16 jam dan kondisi gelap selama 8 jam dengan kondisi suhu 23° – 25°C dan diamati selama 4 minggu. Pada tahap proliferasi ini dilakukan pengamatan morfologi planlet tebu, tinggi planlet, dan jumlah planlet.

Variabel pengamatan pada penelitian ini diantaranya meliputi tahap induksi kalus, proliferasi kalus, dan regenerasi kalus. Pada

tahap induksi kalus, parameter yang diamati adalah morfologi kalus, waktu pembentukan kalus PEM, dan persentase tumbuh kalus. Pada tahap proliferasi kalus, parameter yang diamati adalah waktu pembentukan kalus mulai dari fase globular, fase skutelar (*heart-shape*), fase koleoptil (*torpedo-shape*), dan fase kotiledon. Pada tahap regenerasi, parameter yang diamati adalah waktu pembentukan planlet, jumlah planlet, dan tinggi planlet.

### Analisis Data

Rancangan percobaan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 2 faktor, yaitu penambahan 2,4-D dan kinetin. Faktor 1 adalah ZPT 2,4-D dengan konsentrasi 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, dan 4 mg/L; Faktor 2 adalah ZPT kinetin dengan konsentrasi 0 mg/L, 1 mg/L, dan 2 mg/L. Terdapat 12 kombinasi perlakuan dengan masing-masing kombinasi diulang sebanyak 3 kali, sehingga didapatkan 36 perlakuan. Adapun kombinasi antara 2,4-D (D) dan kinetin (K) dapat dilihat pada tabel 1 dibawah. Data yang diperoleh dari hasil pengamatan kemudian dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA). Jika terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan yang diuji, akan dilakukan uji lanjutan Duncan's Multiple Range Test (DMRT) pada taraf 5%.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan 2,4-D (D) dan Kinetin (K)

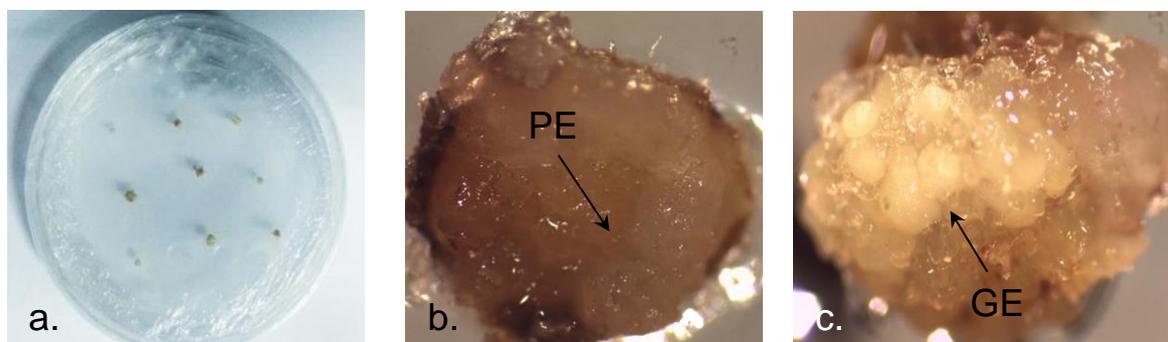
Kode	Kombinasi Perlakuan
D <sub>1</sub> K <sub>0</sub>	2,4-D 1 mg/L + Kinetin 0 mg/L
D <sub>1</sub> K <sub>1</sub>	2,4-D 1 mg/L + Kinetin 1 mg/L
D <sub>1</sub> K <sub>2</sub>	2,4-D 1 mg/L + Kinetin 2 mg/L
D <sub>2</sub> K <sub>0</sub>	2,4-D 2 mg/L + Kinetin 0 mg/L
D <sub>2</sub> K <sub>1</sub>	2,4-D 2 mg/L + Kinetin 1 mg/L
D <sub>2</sub> K <sub>2</sub>	2,4-D 2 mg/L + Kinetin 2 mg/L
D <sub>3</sub> K <sub>0</sub>	2,4-D 3 mg/L + Kinetin 0 mg/L
D <sub>3</sub> K <sub>1</sub>	2,4-D 3 mg/L + Kinetin 1 mg/L
D <sub>3</sub> K <sub>2</sub>	2,4-D 3 mg/L + Kinetin 2 mg/L
D <sub>4</sub> K <sub>0</sub>	2,4-D 4 mg/L + Kinetin 0 mg/L
D <sub>4</sub> K <sub>1</sub>	2,4-D 4 mg/L + Kinetin 1 mg/L
D <sub>4</sub> K <sub>2</sub>	2,4-D 4 mg/L + Kinetin 2 mg/L

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Induksi Kalus

Induksi kalus merupakan proses awal untuk mendapatkan kalus embriogenik. Eksplan yang telah dipotong sedemikian rupa kemudian ditanam pada media induksi dan diamati selama 2 minggu. Perkembangan kalus diawali dengan fase *Pre Embryogenic Mass* (PEM) yang mulai terlihat pada 6 hari setelah tanam (HST)

dengan ciri-ciri yaitu munculnya bulatan kecil berwarna putih bening pada sekitar bekas irisan (Busaifi dan Hirjani, 2018). Pada hari ke-15 kalus mulai berkembang dan terlihat jelas dengan ciri-ciri kalus terlihat berwarna putih kekuningan dan menunjukkan struktur yang remah, biasanya pada tahap ini kalus mulai memasuki fase Globular (Anggraeni *et al.*, 2022). Berikut merupakan gambar perkembangan kalus yang dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Perkembangan Eksplan Basal Tebu pada Media Induksi

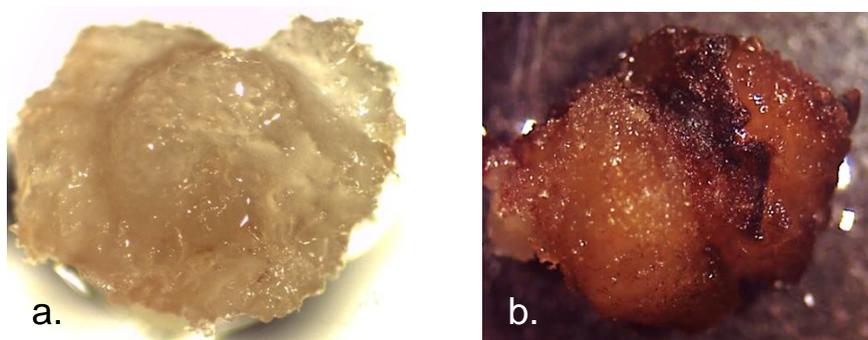
Keterangan: a) Eksplan setelah ditanam pada media agar padat, b) Eksplan masuk fase PEM pada 6 HST, c) Eksplan masuk fase Globular pada 9 HST. (PEM: *Pre Embryogenic Mass*, GE: *Globular Embriogenik*)

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi kalus didapatkan 2 jenis kalus, yaitu kalus embriogenik dan kalus non-embriogenik. Pengamatan morfologi kalus dilakukan untuk mengetahui perbedaan struktur dan warna kalus. Kalus yang bersifat embriogenik memiliki ciri-ciri kalus berwarna putih hingga kekuningan, bertekstur gembur, dan terlihat kering (Ningtiyas *et al.*, 2016), sedangkan untuk kalus non-embriogenik memiliki ciri-ciri berwarna kecoklatan hingga kehitaman dan bertekstur rapuh atau lunak (Heringer *et al.*, 2015). Kalus non-embriogenik ini tergolong jaringan non-regeneratif dengan kemampuan rendah untuk tumbuh menjadi tanaman baru (Alfian *et al.*, 2019). Kalus yang bersifat embriogenik merupakan kalus yang dianggap berhasil dan akan dipindahkan ke media proliferasi agar kalus dapat berkembang ke fase somatik embriogenik. Penambahan zat pengatur tumbuh yang sesuai merupakan faktor utama untuk memicu terbentuknya kalus embriogenik (Dewanti *et al.*, 2021). Berikut

merupakan gambar morfologi induksi kalus embriogenik dan non-embriogenik yang dapat dilihat pada gambar 3.

Berdasarkan hasil pengamatan yang diperoleh terhadap waktu pembentukan kalus PEM dan persentase jumlah kalus pada eksplan (Gambar 4 dan Gambar 5) menunjukkan bahwa media induksi kalus dengan penambahan 2,4-D dan kinetin dengan beberapa konsentrasi berbeda mempengaruhi waktu pembentukan kalus PEM dan persentase jumlah kalus.

Pengaruh terhadap adanya penambahan 2,4-D pada waktu pembentukan kalus PEM dapat dilihat pada Gambar 4. Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa perlakuan 2,4-D 3 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D3K0) membentuk kalus paling cepat dengan rata-rata yaitu 5,67 HST, sedangkan waktu pembentukan kalus paling lama terlihat pada perlakuan 2,4-D 1 mg/L + Kinetin 2 mg/L dengan rata-rata waktunya 9,00 HST.



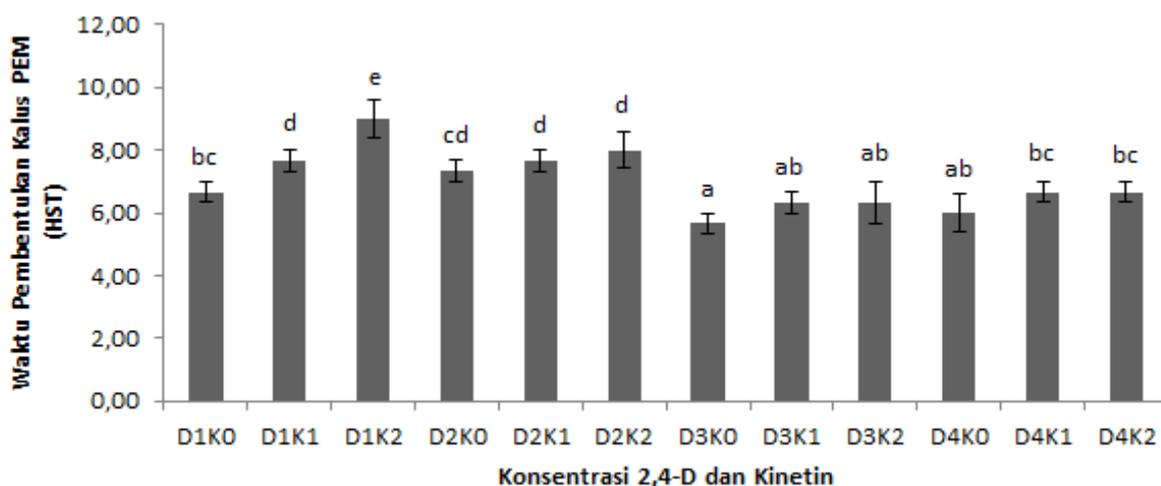
Gambar 3. Perbedaan Kalus Embriogenik dan Non-Embriogenik: a) Kalus Embriogenik, b) Kalus Non – Embriogenik

Perbedaan dalam waktu pembentukkan kalus ini disebabkan karena adanya penambahan zat pengatur tumbuh yang dapat menentukan keberhasilan dalam proses diferensiasi sel pada jaringan sel yang dikulturkan (Sulichantini *et al.*, 2020). Penggunaan ZPT golongan auksin khususnya 2,4-D banyak digunakan dalam media induksi karena dapat meningkatkan pembelahan dan pertumbuhan sel dalam membentuk kalus (Suhesti dkk., 2015). Selain itu, penggunaan konsentrasi 2,4-D yang tinggi dapat merangsang pembelahan sel untuk mempercepat pembentukkan kalus (Aisyah *et al.*, 2022). Penggunaan kinetin dalam media induksi berkontribusi untuk pembelahan sel dan peningkatan awal jumlah sel, meskipun dalam dosis yang rendah penggunaan kinetin dan 2,4-D dapat mendukung terjadinya pertumbuhan kalus embriogenik (Raza *et al.*, 2012).

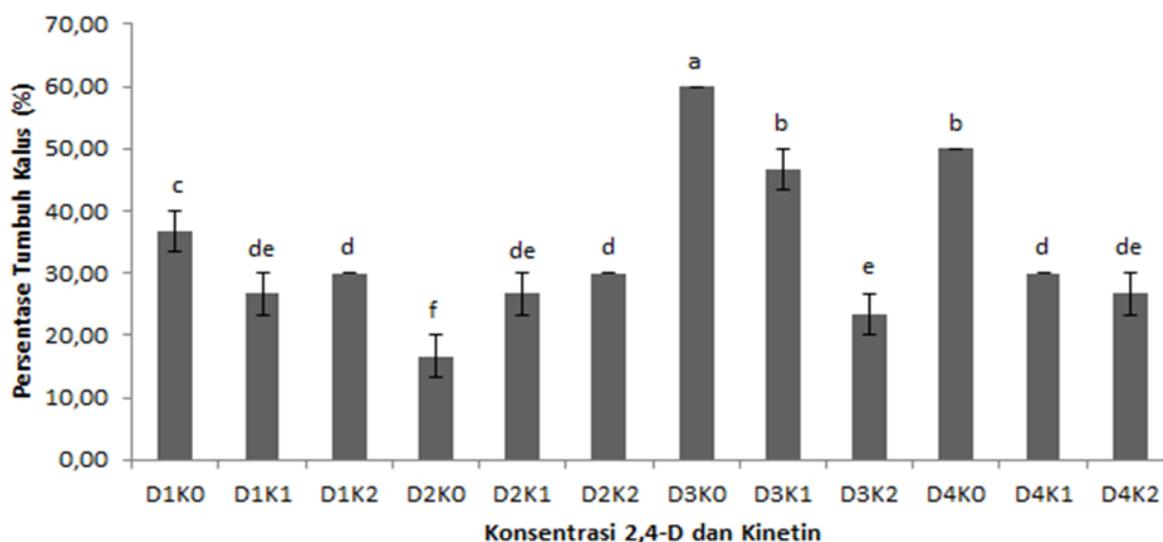
Hasil pengamatan persentase tumbuh kalus paling tinggi pada perlakuan dengan konsentrasi 2,4-D 3 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D3K0) dengan nilai 60,00%, sedangkan untuk hasil terendah terlihat pada perlakuan 2,4-D 2 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D2K0) dengan

nilai 16,67% seperti yang terlihat pada Gambar 5.

Keberhasilan dalam pembentukan kalus tebu melalui somatik embriogenesis terlihat lebih berpengaruh dengan penggunaan ZPT 2,4-D. Menurut Chithra *et al.*, (2004) mengatakan bahwa tinggi rendahnya pada persentase pembentukan kalus embriogenik dapat dipengaruhi oleh konsentrasi ZPT auksin sintetik yang berfungsi untuk menginduksi kalus embriogenik. Hasil ini didukung dengan hasil penelitian Ali *et al.*, (2010) bahwa pemberian ZPT 2,4-D dengan konsentrasi 3 mg/L dan 4 mg/L dapat memaksimalkan kemunculan kalus pada tahap induksi. Penambahan 2,4-D dengan konsentrasi tinggi akan semakin mempercepat proses induksi kalus. Penambahan 2,4-D mempermudah proses difusi ke dalam jaringan tanaman pada area yang telah dilukai sehingga 2,4-D yang telah ditambahkan pada media induksi akan membantu auksin endogen untuk menstimulasi dan merangsang pembelahan sel terutama pada area yang telah dilukai (YelNitis. 2012).



Gambar 4. Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan Kinetin Terhadap Waktu Pembentukan Kalus PEM

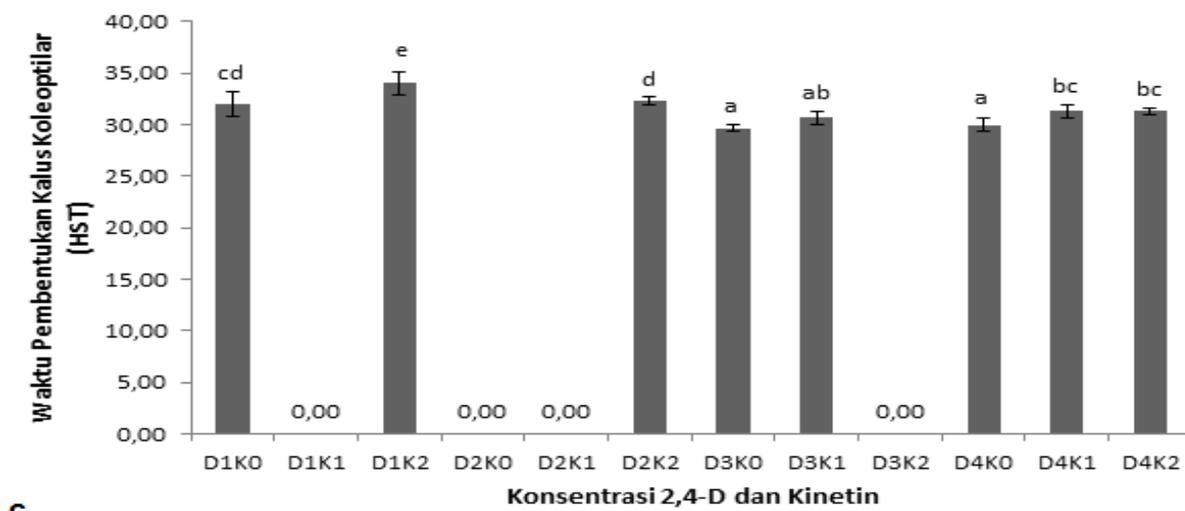
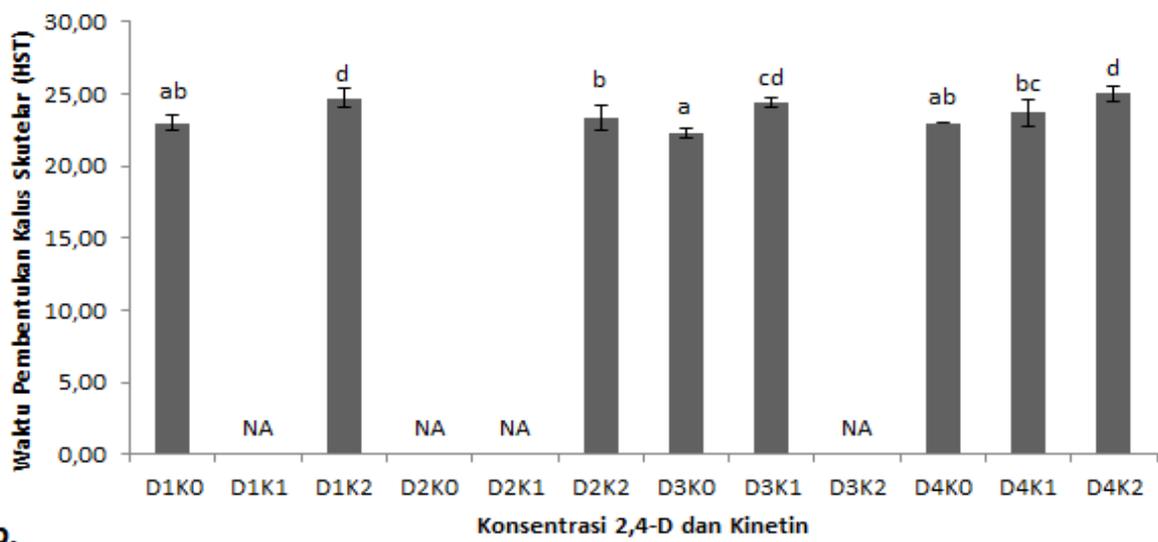
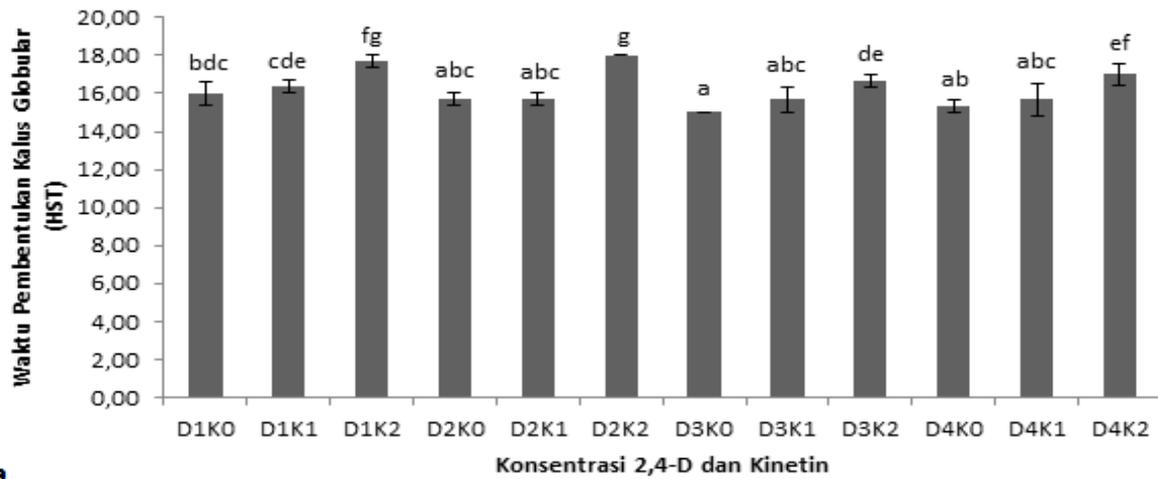


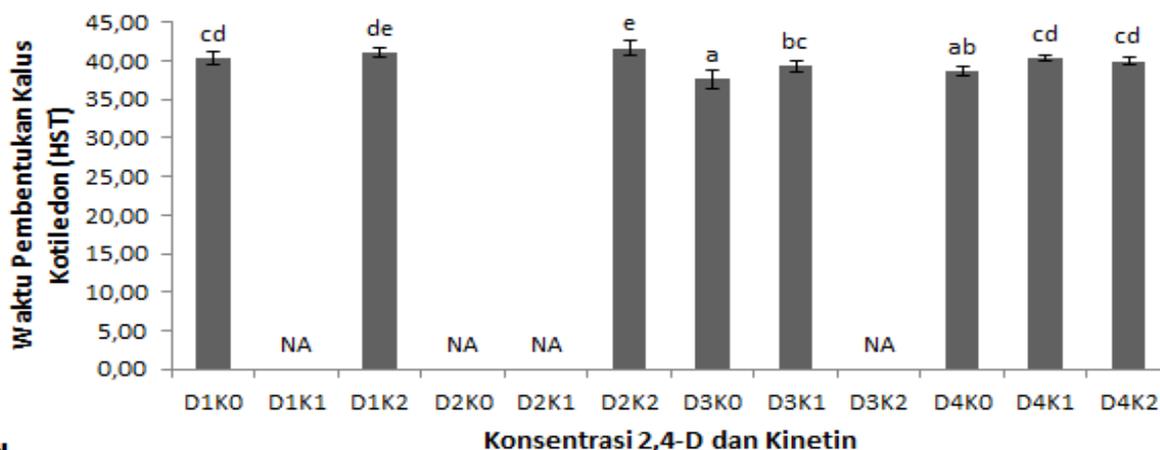
Gambar 5. Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan Kinetin Terhadap Persentase Tumbuh Kalus

## 2. Proliferasi Kalus

Pada tahap proliferasi, kalus embriogenik yang terbentuk akan mengalami perubahan terhadap beberapa fase, yaitu fase globular, fase skutelar, fase koleoptil, dan fase kotiledon. Pada hasil penelitian yang terlihat pada Gambar 5a untuk parameter waktu pembentukan kalus globular terlihat pada perlakuan konsentrasi 2,4-D 3 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D3K0) dengan nilai rata-rata 15,00 HST. Hasil analisis parameter waktu pembentukan kalus skutelar yang terlihat pada gambar 5b tercepat pada perlakuan konsentrasi 2,4-D 3 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D3K0) dengan nilai rata-rata 22,33 HST. Pada fase skutelar terlihat bahwa pada beberapa perlakuan konsentrasi 2,4-D 1 mg/L + Kinetin 1 mg/L (D1K1), 2,4-D 2 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D2K0), 2,4-D 2 mg/L + Kinetin 1 mg/L (D2K1), dan 2,4-D 3 mg/L + Kinetin 2 mg/L (D3K2) terlihat tidak dapat berkembang membentuk kalus skutelar karena terjadinya

pencoklatan (*browning*). Pencoklatan (*browning*) dapat disebabkan oleh adanya senyawa fenolik stress akibat pemotongan kalus, ataupun kondisi tidak normal lainnya (Nofrianinda dkk., 2017). Kalus skutelar yang dapat bertahan kemudian akan berkembang membentuk kalus koleoptil. Dari hasil data terlihat untuk waktu pembentukan kalus koleoptil yang terlihat pada gambar 5c terlihat pada perlakuan 2,4-D 3 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D3K0) dengan nilai rata-rata 29,67 HST dan 2,4-D 4 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D4K0) dengan nilai rata-rata 30 HST. Dari kalus koleoptil kemudian berkembang membentuk kalus kotiledon dengan waktu pembentukan kalus kotiledon tercepat yang terlihat pada gambar 5d menunjukkan bahwa pada perlakuan 2,4-D 3 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D3K0) dengan nilai rata-rata 37,67 HST. Pada kalus kotiledon ini mulai terbentuk *green-spot* sehingga perlu dilakukannya subkultur ke media regenerasi.





d.

Gambar 6. Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan Kinetin Terhadap Waktu Pembentukan Kalus Somatik Embriogenesis: a) Fase Globular; b) Fase Skutelar; c) Fase Koleoptil; d) Fase Kotiledon (NA = Not Available)

### 3. Regenerasi Tunas

Morfologi kalus embriogenik pada tahap somatik embriogenesis terdiri dari beberapa fase, yaitu fase globular, fase skutelar (*heart-shape*), fase koleoptil (*tornado-shape*), dan fase kotiledon seperti yang terlihat pada Gambar 7. Menurut Hartati dkk., (2018) fase globular merupakan fase berkumpul dan membentuknya sekumpulan sel-sel dan membentuk struktur bulat. Fase skutelar atau *heart-shape* merupakan fase dimana sel-sel mengalami pendataran dan penonjolan pada kedua sisi sehingga terlihat membentuk seperti hati. Fase koleoptil atau *torpedo-shape* merupakan fase dimana sel-sel mengalami pemanjangan sehingga terlihat seperti tabung, dan fase kotiledon merupakan fase dimana sel-sel mulai terlihat sel meristem apeks pucuknya yang ditandai dengan munculnya *green-spot* di sekitar kalus. Kalus kotiledon yang telah muncul *green-spot* kemudian disubkultur dan ditanam pada

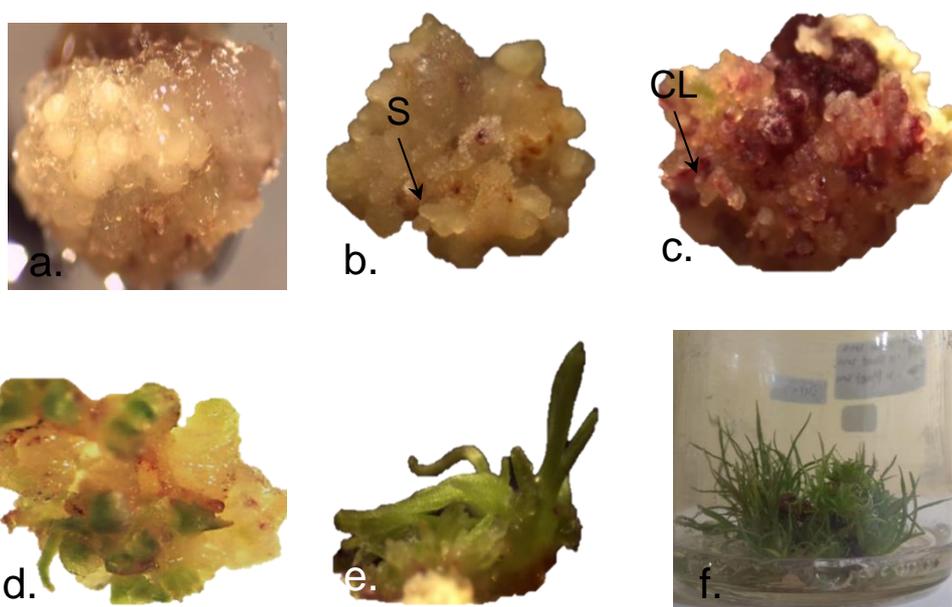
media regenerasi hingga membentuk tunas. Tunas yang telah disubkultur ke media regenerasi kemudian tumbuh membentuk planlet baru. Planlet yang telah terbentuk kemudian dapat diaklimatisasi sehingga tujuan untuk meningkatkan jumlah bibit tebu berkualitas dapat terwujud.

Hasil pengamatan pada tahap regenerasi dapat dilihat pada Gambar 8a. Untuk parameter waktu pembentukan planlet tercepat terlihat pada perlakuan konsentrasi 2,4-D 3 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D3K0) dan 2,4-D 4 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D4K0) dengan nilai rata-rata 46,33 HST. Meskipun semua kalus pada penelitian dapat diregenerasi menjadi planlet, tidak berarti daya regenerasi planlet tetap seragam seiring dengan penggunaan kalus dengan waktu 1,5 bulan. Hal tersebut terlihat pada gambar 8b dan 8c dengan parameter jumlah tunas dan tinggi tunas dimana variabel tinggi tunas dan jumlah tunas terlihat berbeda nyata. Dari

hasil data terlihat jumlah tunas paling banyak pada perlakuan konsentrasi 2,4-D 3 mg/L + Kinetin 1 mg/L (D3K1) dengan jumlah rata-rata 14,00 planlet, sedangkan untuk tinggi planlet tertinggi pada perlakuan 2,4-D 3 mg/L + Kinetin 0 mg/L (D3K0) dengan nilai 4,67 cm.

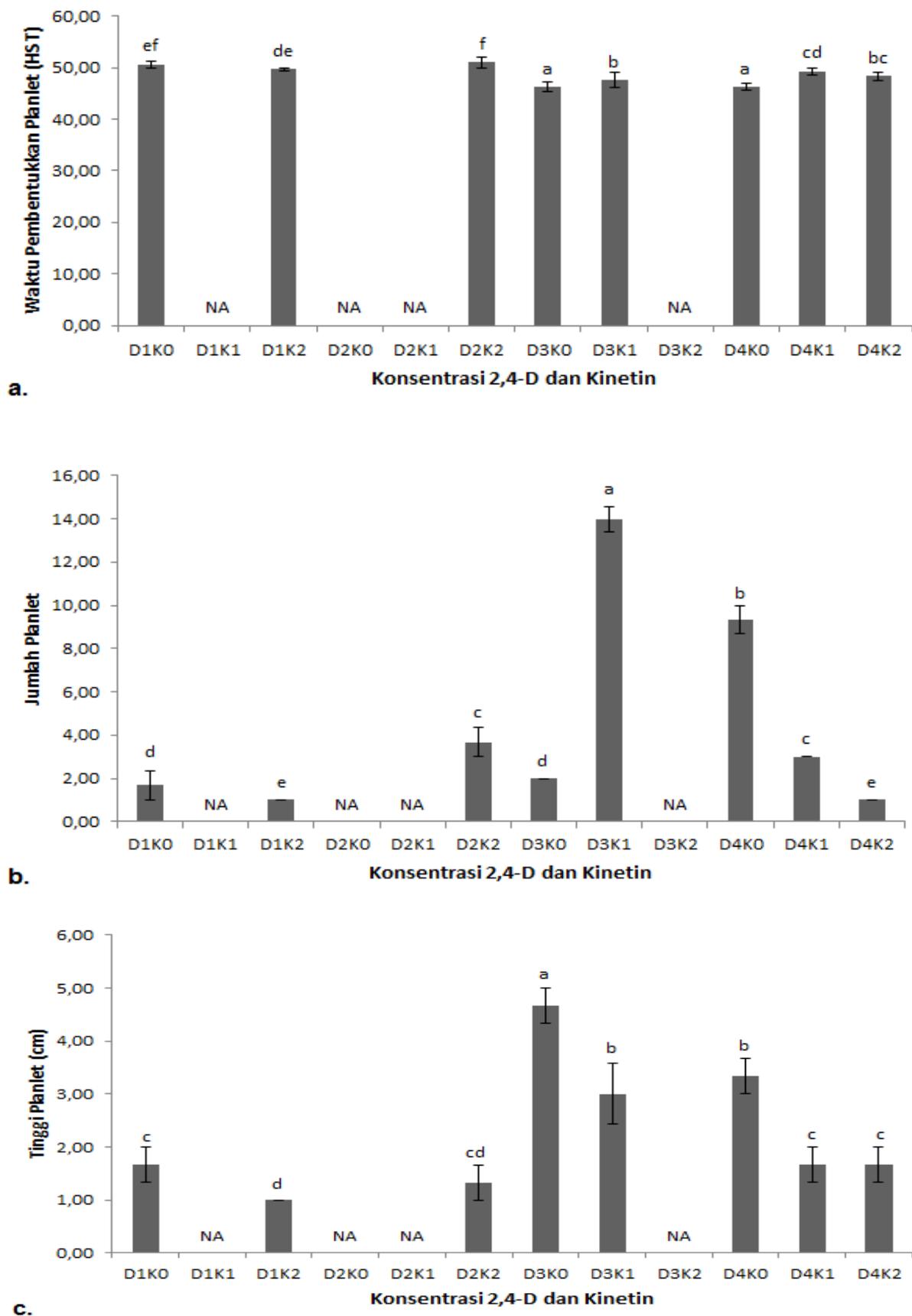
Menurut Azizi dkk., (2017) jumlah tunas mempengaruhi tinggi tunas karena dengan meningkatnya jumlah tunas menyebabkan terjadinya persaingan dalam penyerapan

nutrisi antar tunas sehingga tinggi tunas menurun. Perhitungan tinggi planlet sudah memenuhi kriteria dengan minimal panjang planlet 1 cm. Kalus yang dihasilkan dari kombinasi perlakuan 2,4-D dan kinetin mampu menghasilkan jumlah planlet yang lebih banyak dengan waktu pembentukan planlet 1,5 bulan karena adanya ZPT kinetin yang berfungsi dalam proses pembelahan sel dan pembentukan organ dalam pertumbuhan tunas (Royani dan Fatmawati, 2018).



Gambar 7. Morfologi Kalus Embriogenik pada Tahap Somatik Embriogenesis hingga Membentuk Planlet

Keterangan: a) Globular terlihat pada 15 HST; b) Skutelar terlihat pada 22 HST; c) Koleoptil terlihat pada 30 HST; d) Kotiledon terlihat pada 38 HST; e) Tunas terlihat pada 46 HST; f) Planlet Tebu pada 64 HST. (SC: Skutelar; CL:Koleoptil)



Gambar 8. Pengaruh Konsentrasi 2,4-D dan Kinetin Terhadap Pertumbuhan Planlet Tebu: a) Waktu Pembentukan Planlet; b) Jumlah Planlet; c) Tinggi Planlet (NA = Not Available)

## KESIMPULAN

Perlakuan dengan konsentrasi kombinasi 2,4-D 3 mg/L + kinetin 0 mg/L (D3K0) pada media kultur memberikan respon terbaik dalam pembentukan induksi kalus tebu dengan rata-rata persentase tumbuh kalus mencapai 60,00%. Konsentrasi 2,4-D 3 mg/L + kinetin 1 mg/L (D3K1) adalah konsentrasi yang paling efektif untuk pembentukan planlet tebu dengan rata-rata tumbuh planletnya mencapai sebanyak 14,00 planlet. Berdasarkan hasil penelitian perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengaklimatisasi planlet yang telah terbentuk pada media regenerasi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Laboratorium CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) atas dukungan fasilitas selama pelaksanaan penelitian ini. Penulis juga menyampaikan terima kasih pada *Research Project* Visi Misi Universitas Jember 2023 dengan nomor kontrak 3797/UN25.3.1/LT/2023.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, K. A., R. Rifdah, dan T. Susanto. 2020. Pemanfaatan Ampas Tebu Menjadi Pulp dengan Proses Peroksida Alkali. *Publikasi Penelitian Terapan dan Kebijakan*, 3(1): 34 – 39.
- Aisyah, N. N., L. I. Widuri, F. N. Alfian, and P. Dewanti. 2022. The Effect of pH and Sucrose on The Embryogenic Cells Growth of Sugar Cane (*Saccharum officinarum*) in Liquid Culture. *Tropical and Subtropical Agroecosystem*, 25 (1): 1-12.
- Akram, A. B. 2021. Getting Fuel from Sucrose (Table Sugar). *Sustainable Bioenergy Systems*, 11: 272 – 284.
- Alfian, F. N., N. F. Afdhoria, P. Dewanti, D. P. Restanto, and B. Sugiharto. 2019. Liquid Culture of Somatic Embryogenesis Cell Proliferation of Sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Intl. J. Agric. Biol.*, 21(4): 905 – 910.
- Ali, S., J. Iqbal, and M. S. Khan. 2010. Genotype Independent *In Vitro* Regeneration System in Elite Varieties of Sugarcane. *Pakistan Journal of Botany*, 42(6): 3783-3790.
- Anggraeni, L. P., F. N. Alfian, L. I. Widuri, and P. Dewanti. 2022. Analysis of BBM, LEC, and SERK Expressions in Callus of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) at Somatic Embryogenesis Development Stages. *Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 9(1): 100-109.
- Azizi, A.A.A., I. Roostika, dan D. Efendi. 2017. Multiplikasi Tunas *In Vitro* Berdasarkan Jenis Eksplan pada Enam Genotipe Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Littri*, 23(2): 90 – 97.
- Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat. 2021. *Pembibitan tanaman tebu*. <http://balittas.litbang.pertanian.go.id/index.php/id/publikasi/infotek/2121-alat-budchip-tebu-tegakan-tipe-manual>. [Diakses pada 22 Agustus 2022 pukul 13.45 WIB].

- Busaifi, R. dan Hirjani. 2018. Induksi Kalus Embriogenik Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Pada Berbagai Kombinasi 2,4-D dan BAP Secara *In Vitro*. *Agrosains*, 5(2): 91-102.
- Chithra, M., K. P. Martin, C. Sunandakumari, and P. V. Madhusoodanan. 2004. Somatic Embryogenesis, Encapsulation, and Plant Regeneration of *Rotula Aquatica* Lour., a Rare Rhoeophytic Woody Medicinal Plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 1-4.
- Dewanti, P., L. I. Widuri, P. Okviandari, A. U. K. Maulidiya, F. N. Alfian, and B. Sugiharto. 2021. Development of Synthetic Seeds Derived from Coleoptile of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) through Somatic Embryogenesis. *Intl. J. Agric. Biol.*, 26(3): 377-383.
- Dewanti, P., P. Okviandari, D. P. Restanto, F. N. Alfian, W. Sholeha, dan B. Sugiharto. 2019. Penggunaan 2,4-D untuk Induksi dan Regenerasi Tebu (*Saccharum officinarum* L.) melalui Somatik Embryogenesis. Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta.
- Direktorat Statistik Tanaman Pangan, Hortikultura, dan Perkebunan. 2021. *Statistik Tebu Indonesia 2020*. Jakarta: Badan Pusat Statistika.
- Hartati, H. Agani, N. S. Hartati, dan E. Sudarmonowati. 2018. Kecepatan Regenerasi Kalus Somatik Embriogenik Terung Pada Beberapa Media Maturasi. *Ilmu Dasar*, 19(2): 125-134.
- Hayati, S. K., Y. Nurchayati, dan N. Setiari. 2010. Induksi Kalus dari Hipokotil Alfalfa (*medicago sativa* L.) secara *in vitro* dengan Penambahan Benzyl Amino Purine (BAP) dan  $\alpha$ -Naphtalene Acetic Acid (NAA). *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, 12(1): 6 – 12.
- Heringer, A. S., T. Barroso, A. F. Macedo, C. Santa-Catarina, G. H. M. F. Souza, E. I. S. Floh, G. A. de Souza-Filho, and V. Silveira. 2015. Label-Free Quantitative Proteomics of Embryogenic and Non-Embryogenic Callus during Sugarcane Somatic Embryogenesis. *PLOS ONE*, 10(6): 1-23.
- Nhut, D. T., D. D. Giap, B. V. The Vinh, N. T. K. Loan, N. P. Huy, N. T. Hai, H. X. Chien, T. T. Tuan, and T. X. Du. 2013. *Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops*. Vietnam: Tay Nguyen Institute of Biology.
- Ningtiyas, W. N., P. Dewanti, and B. Sugiharto. 2016. Preservation Effect of PEG (Polyethylene Glycol) on Synthetic Seed of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Var. NXI 1,3. *Annales Bogorienses*, 20(2): 63-68.
- Nofrianinda, V., F. Yulianti, dan E. Agustina. 2017. Pertumbuhan Planlet Stroberi (*Fragaria ananassa* D) Var. Dorit pada Beberapa Variasi Media Modifikasi *In Vitro* di Balai Penelitian Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO). *BIOTROPIC*, 1(1): 41-50.
- Raza, S., S. Qamarunisa, M. Hussain, I. Jamil, S. Anjum, A. Azhar, and J. A. Qureshi. 2012. Regeneration in Sugarcane via Somatic Embryogenesis and Genomic Instability in Regenerated Plants. *J. Crop Sci. Biotech.*, 15(2): 131-136.
- Royani, I. dan A. Fatmawati. 2018. Pengaruh Konsentrasi NAA dan Kinetin Terhadap Pertumbuhan Tanaman Krisan Secara In-Vitro. *Ilmiah Biologi*, 4(2): 63 – 66.
- Sholeha, W., B. Sugiharto, D. Setyati, dan P. Dewanti. 2015. Induksi Embriogenesis Somatik Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) dan Kinetin pada Eksplan Gulungan Daun Muda Tanaman Tebu. *Ilmu Dasar*, 16(1): 17 – 22.
- Sulichantini, E. D., Eliyani, A. Saputra, A. P. D. Nazari, dan Susyowati. 2020. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh dan Bahan Organik terhadap Pertumbuhan Anggrek Tebu *Grammatophyllum speciosum* Blume Secara Kultur Jaringan. *Agroteknologi Tropika Lembab*, 4(1): 13-19.

- Waryastuti, D. E., L. Setyobudi, dan T. Wardiyati. 2017. Pengaruh Tingkat Konsentrasi 2,4-D dan BAP pada Media MS Terhadap Induksi Embriogenik Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Produksi Tanaman*, 5(1): 140 – 149.
- Widiastoety, D. 2014. Pengaruh Auksin dan Sitokinin Terhadap Pertumbuhan Planlet Anggrek Mokara. *Hortikultura*, 24(3): 230-238.
- Yelnititis. 2012. Pembentukan Kalus Remah dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz). *Pemuliaan Tanaman Hutan*. 6(1):181-194.
- Yuwono, M. 2021. Peningkatan Nilai Manfaat Ampas Tebu sebagai Sumber Bahan Baku Halal Komoditas Ekspor. <https://news.unair.ac.id/2021/06/07/peningkatan-nilai-manfaat-ampas-tebu-sebagai-sumber-bahan-baku-halal-komoditas-ekspor/?lang=id>. [Diakses pada 4 Oktober 2023 pukul 23.50 WIB].