

ARTIKEL

by Septa Fip

Submission date: 31-Jul-2019 09:48PM (UTC-0500)

Submission ID: 1156655526

File name: erik_ISI_BUKU_kultur_mikrospora.pdf (784.25K)

Word count: 8577

Character count: 51747

P E N D A H U L U A N

Buku ini mengupas secara terperinci teknik kultur mikrospora pada tanaman tebu. tanaman tebu merupakan tanaman yang komersil namun teknik budidaya yang biasa dilakukan masih secara konvensional sehingga belum ada varietas baru yang dapat meningkatkan kualitas tebu ⁴⁹ secara cepat dan tepat. Oleh karena itu dalam buku ini dijelaskan secara mendalam berbagai aspek pengembangan kultur mikrospora tebu di Indonesia.

Teknik kultur mikrospora pada tanaman tebu hingga saat ini belum berhasil diaplikasikan pada tanaman tebu. teknologi kultur mikrospora merupakan teknologi yang sangat baru dalam bioteknologi tebu sehingga **Rumusan masalah** dalam buku ini merujuk pada bagaimana perkembangan teknologi kultur mikrospora pada tanaman tebu di Indonesia. Berdasarkan rumusan masalah tersebut **Tujuan penerbitan** buku ini yaitu Penulis mengharapkan pembaca dapat memahami teknik kultur jaringan secara mendasar terutama teknik kultur mikrospora hingga mahir dalam mengaplikasikan teknik ini pada tanaman tebu. Selain itu dengan pemahaman materi yang terperinci diharapkan pembaca dapat melakukan optimasi teknik kultur mikrospora di laboratorium dengan berbagai macam perlakuan

sehingga upaya pengembangan teknik kultur mikrospora di Indonesia dapat lebih maju. Kedepannya penulis mengharapkan pembaca dapat memperoleh manfaat setelah membaca buku ini. Semoga pembaca dapat memahami permasalahan budidaya tebu di Indonesia, melahirkan peneliti yang dapat mengembangkan teknik kultur mikrospora tebu serta dapat menjalankan prospek pengembangan teknik kultur mikrospora tebu dimasa mendatang.

1

PERMASALAHAN BUDIDAYA TEBU DI INDONESIA

Tanaman tebu merupakan tanaman potensial yang dibutuhkan seluruh dunia. 78% gula tebu diproduksi oleh lebih dari 100 negara yang umumnya merupakan kawasan tropis dan sub tropis. produksi gula Indonesia hanya sebesar 1,68% dari seluruh dunia. produktifitas ini sangat rendah dibanding dengan Negara lain. Seiring dengan peningkatan populasi penduduk permintaan gula dalam negeri terus meningkat sedangkan produksi gula dalam negeri tidak mencukupi sehingga untuk memeneuhi kebutuhan tersebut, Indonesia mengimpor gula dari Negara lain (Hakim, 2010).

Dalam Taksonomi, Tanaman ³Tebu (*Saccharum officinarum*) merupakan salah satu dari Keluarga Poaceae yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Produk utama dari Tanaman tebu ini adalah sukrosa yang terakumulasi pada internodus batang tebu. Negara terbesar dalam memproduksi tanaman tebu adalah Brazil. Negara Brazil banyak mengolah tebu sebagai etanol. Kawasan Asia termasuk Indonesia banyak memanfaatkan tebu

.

untuk produksi gula (Godheja *et al.*, 2014).

⁴⁴ Iklim tropis di Indonesia menghasilkan tanaman tebu yang memiliki kandungan sukrosa yang tinggi pada bagian batangnya. Kualitas produksi tanaman tebu yang baik tersebut diharapkan dapat mendorong perekonomian negara. Batang tebu dimanfaatkan terutama sebagai bahandasar utama dalam industri gula dan bahan baku industri lainnya seperti farmasi, kimia, pakan ternak, pupuk, jamur, dan lain-lain (Sukmajaja *et al.*, ¹⁷ 2011).

Wilayah Indonesia memiliki sumber daya lahan yang luas untuk mengembangkan berbagai komoditas pertanian termasuk tanaman tebu. Namun potensi sumberdaya alam ini belum optimal digunakan untuk budidaya tanaman tebu sehingga hal ini menjadikan salah satu penyebab produksi gula di Indonesia relatif rendah. Upaya pengelolaan lahan untuk meningkatkan produktifitas tebu sudah dilakukan. Namun belum memenuhi ⁴³ kebutuhan gula di Indonesia (Hakim, 2010).

Kebutuhan pasokan gula di Indonesia yang semakin meningkat seiring dengan meningkatnya kebutuhan pangan, diperlukan adanya upaya meningkatkan hasil perkebunan. ²⁹ Salah satu upaya untuk meningkatkan hasil produksi tanaman tebu yaitu dengan penyediaan bibit unggul. Keberhasilan penyediaan bibit unggul melalui kultur mikrospora, akan menambah wawasan bagi pengembangan budidaya tebu (Rasullah *et al.*, 2013)

Tanaman tebu adalah tanaman yang memerlukan waktu

yang panjang karena menyelesaikan siklus hidupnya selama satu tahun sehingga setiap generasi diperlukan waktu satu tahun. Budidaya tanaman tebu secara konvensional memerlukan waktu, lahan, biaya, sumber bahan tanaman dan tenaga kerja banyak (Suaib *et al.*, 2013). Metode konvensional untuk seleksi varietas baru membutuhkan waktu ke 10-15 tahun (Tarique *et al.*, 2010).

Aplikasi Metode kultur jaringan beberapa tahun terakhir menjadi metode paling cepat untuk memperbanyak tanaman tebu. Perbanyak tanaman tebu umumnya menggunakan induksi protoplas, tunas dan regenerasi akar (Godheja *et al.*, 2014). Aplikasi kultur jaringan tanaman dalam memperbanyak tebu dapat menghasilkan **1** bibit tanaman secara massal, cepat, murah dan bebas patogen (Behera dan Sahoo, 2009).

Teknik kultur mikrospora merupakan teknologi terbaru kultur jaringan untuk menghasilkan bibit unggul secara cepat dibanding dengan teknik lain. kultur mikrospora dapat memproduksi bibit unggul berupa galur murni haploid dan dapat diinduksi menjadi double-haploid dalam waktu cepat (Segu-simaro dan Nuez, 2008). Teknik ini telah berhasil diaplikasikan pada berbagai tanaman hortikultura seperti kelompok brassica (**4** Kalashnikova *et al.*, 2011), gandum (Ayed *et al.*, 2010), cabai (Yin *et al.*, 2010) dan padi (Islam, 2013). Belum ada laporan mengenai perolehan individu tanaman tebu melalui kultur mikrospora diseluruh dunia hingga saat ini. Teknik kultur mikrospora 10 tahun terakhir yang baru diaplikasikan di

Indonesia juga belum sampai menghasilkan tanaman double haploid. Teknik kultur mikrospora hanya mampu menghasilkan mikrospora multinukleat/proembryo (Suaib *et al.*, 2013).

Pada dasarnya Kegiatan pemilihan bibit unggul melalui kultur mikrospora dari bibit yang terpilih hingga beberapa generasi dapat dicapai hanya dalam satu generasi atau satu tahun. Dengan demikian, pembentukan varietas baru tanaman tebu melalui produksi haploid dengan kultur mikrospora, dapat dicapai kurang dari delapan tahun (Suaib *et al.*, 2013). Anitasari (2017) melanjutkan penelitian dengan mengembangkan teknik kultur mikrospora pada beberapa varietas tebu di Jawa timur. Dalam penelitian tersebut memberikan kemajuan teknologi kultur mikrospora dimana berhasil mencapai tahap embriogenesis. Oleh karena itu dalam buku ini dijelaskan secara rinci teknologi kultur mikrospora tanaman tebu, prospek dan pengembangannya di Indonesia.

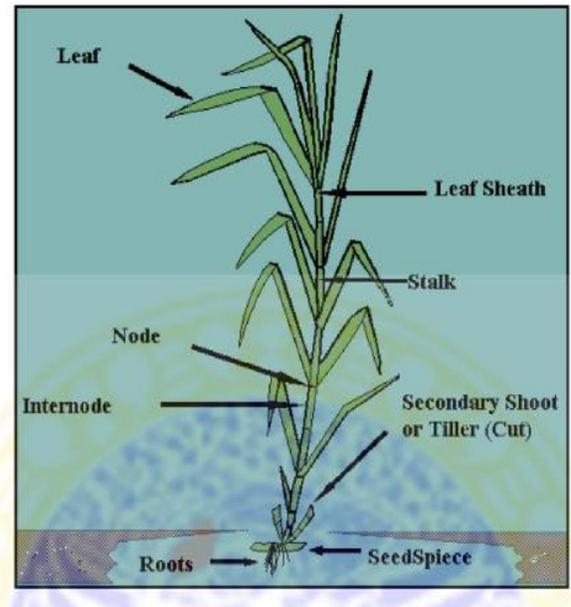
2

BIOLOGI TEBU

Sejarah penamaan tebu (*Saccharum officinarum* L.) diberikan oleh Linnaeus 1753. Dalam Bahasa sansekerta tebu disebut Carkara atau Karkara yang artinya Kristal/gravel. di Negara arab tebu dikenal sebagai Sakkara atau Sukkar. Bangsa yunani menyebut tebu sebagai Sakchar atau Sakcharon dan pada akhirnya bangsa romawi menyebut sebagai Saccharum (PTPN XI, 2010).Tebu merupakan tanaman dari suku rumput-rumputan. Berikut susunan taksonominya:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Ordo	: Poales
Famili	: Poaceae
Genus	: Saccharum
Spesies	: <i>Saccharum officinarum</i> L. (NCBI, 2016)

Tebu adalah tanaman yang digunakan sebagai bahan baku gula. Tanaman ini hanya dapat tumbuh di daerah beriklim tropis. Di Indonesia tebu banyak dibudidayakan di pulau Jawa dan Sumatera. Morfologi tebu diantaranya akar, batang, daun, bunga dan buah (Indrawanto *et al.*, 2010).



Gambar 1. Morfologi tanaman tebu

5
a. Batang

batang tebu tegak lurus dan memiliki ruas yang terdapat buku-buku diantaranya. Pada tiap buku terdapat mata tunas dan tidak bercabang. Batang tebu memiliki diameter sekitar 2 sampai 5 m (Indrawanto *et al.*, 2010). Bagian luar batang merupakan kulit keras sedangkan bagian dalam mengandung nira (air gula). perbedaan varietas tebu menyebabkan perbedaan tebal batang,

warna, panjang ruas, bentuk ruas, bentuk mata dan lapisan lilin. bentuk ruas juga bervariasi tergantung varietas tanaman. bentuk ruas diantaranya silindris, tong, kelos, konis, konis terbalik, cembung dan cekung (PTPN XI, 2010).

b. Akar

akar tebu berupa akar serabut yang tumbuhnya berasal dari cincin tunas anakan. (Indrawanto *et al.*, 2010). Bagian akar tebu diantaranya:

- akar tunas, akar yang tumbuh dari mata tunas dan menggantikan fungsi akar bibit
- akar Setek, akar yang tumbuh pada cincin akar batang dengan masa hidup tidak lama (PTPN XI, 2010).

c. Daun

bentuk daun tebu yaitu seperti busur panah (pita) yang berseling kanan kiri. Tidak bertangkai dan Memiliki pelepah. Pertulangan daun sejajar dan berbulu keras (Indrawanto *et al.*, 2010). Secara morfologi daun tebu termasuk daun tidak lengkap yang terdiri atas (PTPN XI, 2010):

- helaian daun

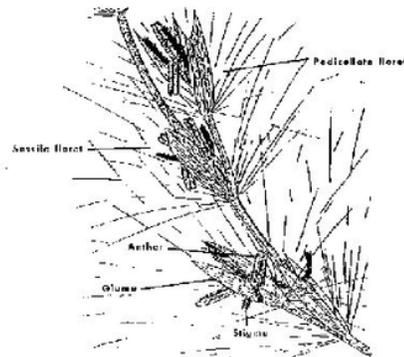
helaian daun tebu tipis dengan penyangga ibu tulang daun. panjang helaian daun mencapai 1-2 meter dengan lebar 4-7 cm tergantung varietas tebu. ujung daun meruncing dengan tepi helaian tajam berbentuk seperti gigi yang mengandung zat kersik. ujung daun dapat menggulung apabila kekurangan air.

- Pelepah Daun

pelelah daun tebu menyelubungi seluruh batang. bagian tengah daun merupakan bagian yang tebal dan bagian tepi sangat tipis. tanpa pengenalan varietas tebu dilihat dari jumlah rambut pada pelelah daun tebu.

d. Bunga

tebu memiliki bunga yang strukturnya bersifat malai berukuran 50 – 80 cm. malai bunga tebu berbentuk piramida dengan panjang 70-90 cm yang mengandung cabang malai dengan ribuan bunga kecil. bunga tebu terdiri atas tenda bunga yaitu tiga helai daun tajuk bunga, tiga benang sari dan satu bakal buah dengan kepala putik yang berbentuk bulu-bulu. pada bunga yang masak, benang sari (pollen) nya panjang sehingga kepala sari (anther) menggantung keluar dari tajuk bunga (PTPN XI, 2010).



Gambar 2. Anther Tebu

e. Buah

Buah tebu seperti padi, memiliki satu biji dengan besar lembaga 1/3 panjang biji. Biji tebu dapat ditanam di kebun percobaan untuk mendapatkan jenis baru hasil persilangan yang lebih unggul.

3

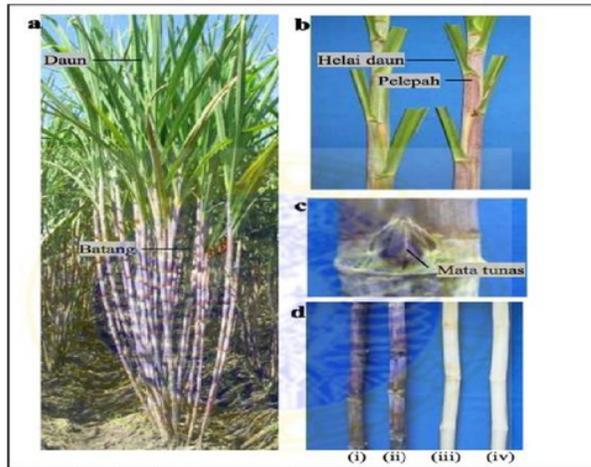
VARIETAS **TEBU**

Varietas tebu yang berkembang di Indonesia sangat beragam. Secara umum ada tiga jenis varietas yang banyak dikembangkan di wilayah Indonesia yang bervariasi berdasarkan faktor lingkungan yang dapat berpengaruh pada kualitas tanaman tebu. Berikut diuraikan beberapa varietas tebu yang banyak di tanam di Indonesia.

VARIETAS BULULAWANG

Ciri khas varietas Bululawang yaitu batangnya bulat silindris. Warnanya coklat kemerahan. Pada permukaan batang dilapisi oleh lilin. Pada tiap atas mata tunas terdapat cincin tumbuh. Sedangkan daunnya berwarna hijau kekuningan. Bentuknya panjang dan lebar. Secara agronomis varietas bululawang memiliki sifat diantaranya perkecambahan lambat, ukuran batang berdiameter sedang hingga besar, bunga banyak, tipe masak tengah sampai akhir, kadar sabut 13 -14 persen. Tahan terhadap hama dan penyakit serta tahan pada luka api dan mosaic. Berikut gambar morfologinya (gambar 3).

.

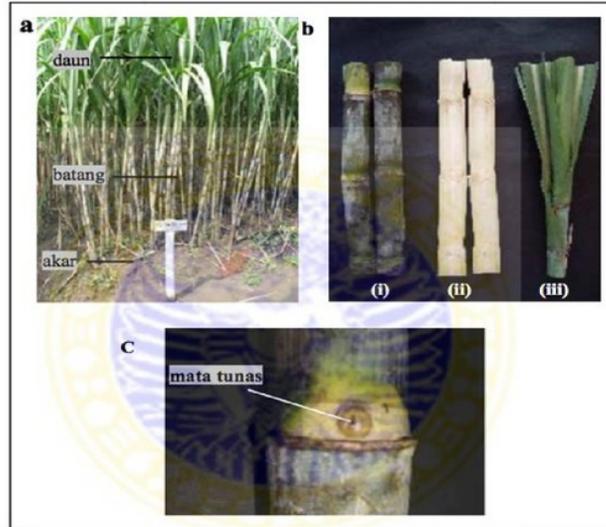


Gambar 3. Struktur morfologi varietas Bululawang

VARIETAS PS 882

Karakteristik batang tebu varietas PS 882 yaitu berbentuk silindris dan sedikit konis dan warnanya kuning kehijauan. Lapisan lilin pada barang tebal sehingga berpengaruh pada warna ruas. Begitupula daunnya berwarna hijau kekuningan. Mata tunas terdapat pada pelepah daun bagian pangkal. Berukuran lebar dan berbentuk bulat.

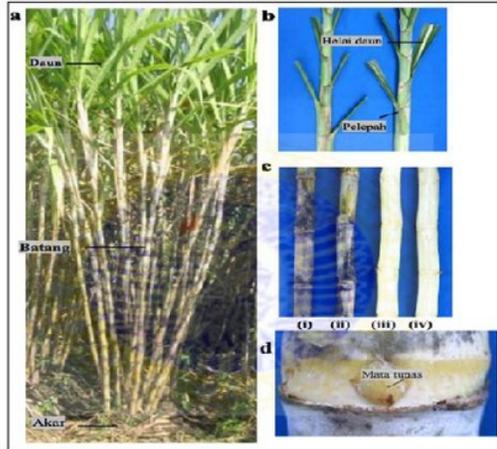
Secara agronomis sifat varietas ini berupa perkecambahan sedang. Tipe masak awal hingga tengah. Kadar sabut yaitu 13,42%. Tahan terhadap hama penyakit blendok, mosaic, luka api. Varietas ini baik ditanam pada jenis tanah vertisol, inceptisol maupun ultisol.



Gambar 3. Struktur morfologi varietas PS 882

VARIETAS PS 862

Varietas ini karakteristiknya agak berbeda karena Batangnya memiliki ruas yang berbuku, konis sampai kumparan. Warna batang yaitu hijau kekuningan dengan penampang melintang bulat. Batang pada permukaannya terdapat lilin sedang. Daunnya berwarna hijau. Sifat agronomis varietas ini yaitu merupakan perkecambahan sedang, toleran hama pengerek pucuk dan batang. Tahan penyakit blendok, mosaic dan peka pokahboeng.



Gambar 3. Struktur morfologi varietas PS 862

4

SYARAT TUMBUH TEBU

Tanaman tebu sangat cocok hidup di daerah tropis- subtropis antara 190C LU-35 0LS. Jenis tanah yang baik bagi tanaman tebu yaitu tanah yang sedang, tidak terlalu kering dan tidak terlalu basah. Ketinggian antara 0-1400 m dpl. Pengairan bagi tanaman tebu harus terjaga (Indrawanto *et al.*, 2010). Berikut aspek syarat tumbuh yang penting bagi pertumbuhan tebu:

A. TANAH

Tanah yang baik bagi tanaman tebu yaitu tanah gembur karena tebu memerlukan aerasi udara. Hal ini berfungsi agar akar berkembang dengan baik. Sehingga pada awal penanaman dilakukan pemecahan agregat tanah untuk memudahkan akar berkembang masuk ke tanah. Tekstur tanah yang baik berupa partikel lempung, debu dan liat. Perbandingan idealnya yaitu bertekstur ringan hingga berat serta kemampuan menahan air dan porositas sebanyak 30 %.

Solum tanah yang baik untuk tebu minimal 50 cm dan permukaan air 40 cm. solum yang baik untuk tebu tidak memiliki lapisan kedap air. pH yang baik untuk menanam tebu yaitu sekitar

6 – 7,5. Namun tebu juga masih toleran pada pH maksimal 8,5 dan tidak kurang dari 4,5. Apabila pH kurang dari kisaran tersebut biasanya tebu mengalami keracunan Fe dan Al. solusi untuk permasalahan ini yaitu menambahkan kapur (CaCO₃) agar unsur tersebut berkurang.

B. IKLIM

Iklim sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan tebu. tebu membutuhkan banyak air untuk pertumbuhannya. Sebaliknya apabila tebu memasuki fase masak tanaman justru membutuhkan keadaan kering untuk menghentikan pertumbuhan. Musim hujan menyebabkan banyaknya air yang masuk kedalam tanah sehingga hal ini sangat merugikan bagi petani karena rendemen tebu memiliki nilai rendah.

Curah hujan yang baik untuk menanam tebu setidaknya terdapat 3 bulan kering antara 1.000 – 1.300 mm per tahun. Idealnya distribusi curah hujan untuk periode pertumbuhan vegetatif tanaman tebu yaitu 200 mm/ bulan selama 5 – 6 bulan. Tanaman tebu dapat tumbuh dengan baik didaerah dengan curah hujan berkisar antara 1.000 – 1.300 mm per tahun dengan sekurang-kurangnya 3 bulan kering. Distribusi curah hujan yang ideal untuk pertanaman tebu adalah: pada periode pertumbuhan vegetatif diperlukan curah hujan yang tinggi (200 mm per bulan) selama 5-6 bulan. Periode berikutnya adalah periode kering dimana curah hujan yang dibutuhkan kurang dari 75 mm/ bulan selama 4 – 5 bulan. Dalam periode kering ini terdapat proses pemasakan tebu dan pertumbuhan generatif. Untuk mengatur sistem ini tidak perlu menunggu hujan, dapat diusahakan dengan

syarat ketersediaan air irigasi sehingga bisa diatur berapa jumlah air yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tanaman tebu.

Pertumbuhan tebu juga dipengaruhi oleh suhu. Suhu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tebu yaitu sekitar $24^{\circ}\text{C} - 34^{\circ}\text{C}$ dengan beda suhu siang malam kurang dari 10°C . pada siang hari, terjadi proses pembentukan sukrosa yang ditimbun pada batang. Proses ini efektif pada suhu 15°C pada malam hari.

Penyinaran tanaman tebu yang baik yaitu sekitar 12 – 14 jam sepanjang hari. Sistem fotosintesis akan terjadi secara optimal dengan penyinaran cahaya matahari yang baik. Kecepatan di lahan penanaman tebu juga berpengaruh pada kelembapan udara dan kadar CO_2 . Hal ini juga berpengaruh pada proses fotosintesis. Pertumbuhan tebu baik pada kecepatan angin kurang dari 10 km/jam pada siang hari, apabila kecepatan angin melebihi 10 km/jam tanaman tebu mudah patah dan roboh sehingga mengganggu pertumbuhan tanaman tebu.

Kecepatan angin sangat berperan dalam mengatur keseimbangan kelembapan udara dan kadar CO_2 disekitar tajuk yang mempengaruhi proses fotosintesa. Angin dengan kecepatan kurang dari 10 km/jam disiang hari berdampak positif bagi pertumbuhan tebu, sedangkan angin dengan kecepatan melebihi 10 km/jam akan mengganggu pertumbuhan tanaman tebu bahkan tanaman tebu dapat patah dan roboh.

5

TEKNIK PENANAMAN TEBU SECARA KONVENSIONAL

Tanaman tebu di Indonesia dibudidayakan secara konvensional untuk produksi gula. Teknik budidaya yang dilakukan sudah dikembangkan bertahun-tahun dan menjadi protokol budidaya tebu. berikut diuraikan beberapa langkah yang dilakukan dalam budidaya tanaman tebu:

A. Pembersihan dan persiapan Lahan

Kondisi fisik dan kimia tanah untuk penanaman tebu perlu disiapkan pada awal sebelum penanaman tebu dimulai. Untuk itu persiapan dan pembersihan lahan merupakan titik awal yang wajib diperhatikan sebelum menanam tebu. pertama yang dilakukan yaitu pembersihan semak belukar (Pembersihan lahan dengan pembabatan atau penebasan). Selain semak, dilakukan juga pembersihan pohon bekas tebangan terdahulu. Apabila lahan yang dipakai adalah bekas hutan maka sisa akar pohon yang masih tertanam didalam tanah juga dibersihkan.

Setelah lahan dibersihkan. Hal berikutnya yaitu pembajakan pertama tanah. Hal ini dilakukan untuk menggemburkan tanah, membalik tanah, memotong sisa akar yang masih tertanam di

dalam tanah. Alat bajak yang digunakan biasanya Rome Harrow 20 disc dengan diameter 31 inchi dan menggunakan bulldoser 155 hp.

Pembajakan berikutnya dilakukan tiga minggu kemudian. Hal ini dilakukan untuk penggaruan tanah dalam menghancurkan bongkahan tanah dan agar tanah merata. Alat yang digunakan biasanya disc plow 3-4 dish dengan diameter 28 inchi serta ditarik oleh traktor 80- 90 hp.

B. Penanaman Tebu

Tahap awal penanaman tebu yaitu seleksi bibit tebu, seleksi ini dilakukan untuk memilih varietas terbaik tebu yang baik untuk ditanam dilahan yang sudah dipersiapkan. Hal kedua yang dilakukan yaitu memilih bibit yang sehat. Teknik pemotongan bibit dilakukan dengan memotong batang menggunakan pisau tajam dengan pencelupan pada lisol pekat 20% tiap 3- 4 kali potongan. Berikutnya bibit direndam pada air panas 50⁰C 7 jam untuk menghindari hama dan penyakit lalu berganti dengan merendam pada air dingin 15 menit.

Setelah diberi perlakuan, bibit ditanam secara doble row dengan letak mata disamping untuk berjaga apabila salah satu tunas mati dapat diganti oleh sebelahnya.

Cara menanam tebu lainnya yaitu melalui pengeprasan. Pengeprasan biasanya dilakukan pada saat menanam tebu setelah panen pertama. Pengeprasan adalah menumbuhkan kembali bibit dari tanaman tebu yang telah ditebang sebelumnya. Lahan tebu yang akan dikepras, dibersihkan dari kotoran-kotoran. Pengeprasan

dilakukan per petak agr pertumbuhan merata. Setelah satu minggu tebu di airi dan di beri perlakuan penggarapan untuk mengganti akar tua menjadi akar muda agar mempercepat pertumbuhan tunas dan anakan. Hal ini juga bermanfaat bagi tanah dalam mempermudah pemupukan karena struktur tanah lebih longgar.

C. Penyulaman

Istilah penyulaman tebu berarti penggantian bibit tebu yang mati dengan bibit baru. Hal ini dilakukan agar populasi tebu tetap banyak sehingga menghasilkan produksi tebu yang semakin optimal. Penyulaman dilakukan antara 2 – 4 minggu setelah tanam.

D. Pemupukan

Dosis yang digunakan untuk pemupukan tanah pada tanaman tebu memiliki kadar yang beragam tergantung kondisi lahan. Analisa tanah sangat diperlukan dalam proses ini. Pupuk yang digunakan biasanya menggunakan perbandingan 1: 3 pupuk urea, SP-36, dan KCL.

E. Pengendalian Hama dan Penyakit

Proses ini sangat penting dilakukan untuk mencegah penyebaran hama dan penyakit sehingga dapat menjaga kualitas tanaman tebu yang ditanam. Hama tanaman tebu diantaranya

- penggerek pucuk (*Triporyza vinella* F) dikendalikan dengan insektisida Carbofuran/ Petrofur dengan dosis 25 kg/ha yang ditebarkan pada tanah
- Uret (*Lepidieta stigma* F) pengendalian dilakukan secara mekanik dengan menangkap hewan tersebut setiap sore. Selain itu dapat juga secara kimiawi dengan insektisida carbuforan 3G

- Pengerak batang: pengendalian dengan menggunakan insektisida semprot pestona/ natural BVR
- Penyakit mosaik dikendalikan dengan pembersihan lingkungan tebu dan menggunakan bibit yang benar-benar sehat pada saat penanaman
- Penyakit busuk akar dikendalikan dengan memilih bibit yang merupakan varietas tahan penyakit busuk akar dan juga melakukan drainase yang baik pada lahan penanaman
- Penyakit blendok dikendalikan dengan memilih bibit yang merupakan varietas tahan penyakit blendok serta pemberian desinfektan Lysol 15% pada pisau pemotong bibit tebu
- Penyakit Pokkahbung dikendalikan dengan menggunakan natural glio sebanyak kurang lebih 2 sendok gula pasir pada daun muda.

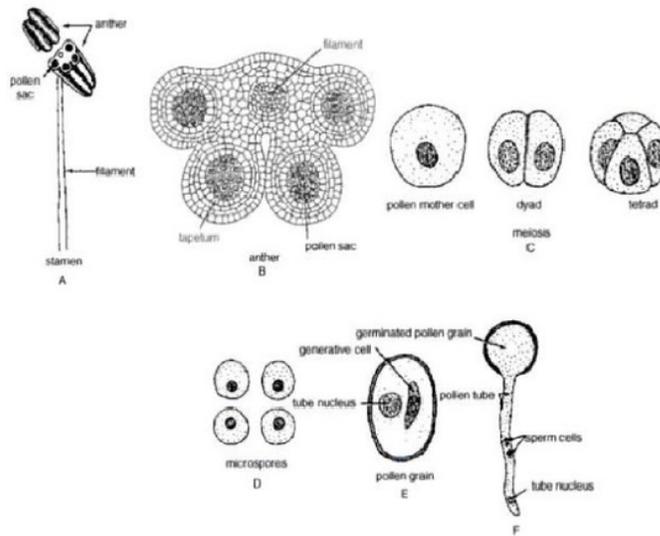
6

MIKROSPORA TEBU

Dalam membahas mikrospora tebu, terlebih dahulu memahami struktur bunga seperti yang diuraikan pada bab sebelumnya.

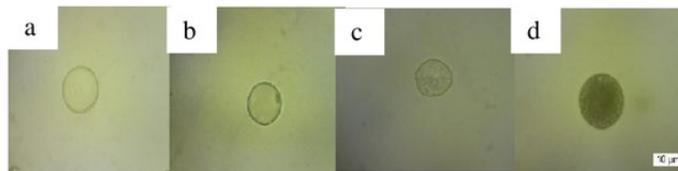
Pada dasarnya bunga memiliki benang sari sebagai alat perkembangan generative tumbuhan. benang sari atau juga disebut alat kelamin jantan pada bunga terdiri atas dua bagian yaitu anther dan filament. Dalam anther terdapat mikrosporangium atau ruang serbuk sari. mikrospora adalah serbuk sari yang masih muda. Serbuk sari muda ini yang selanjutnya berkembang menjadi polen.

Secara umum mikrospora terbentuk di dalam anter (Gambar 6). Mikrospora berkembang melalui tahapan diantaranya secara berurutan tetrad(empatsel mikrospora berlekatan dan memiliki inti ditengah), uninukleat awal, uninukleat akhir, binukleat awal, binukleat akhir, multinukleat atau pollen (Suaib *et al.*, 2007).



Gambar 6. Perkembangan Mikrospora (Taji *et al.*, 2002)

Struktur anatomi perkembangan mikrospora tebu (Anitasari *et al.*, 2018) yang sudah diamati adalah sebagai berikut:



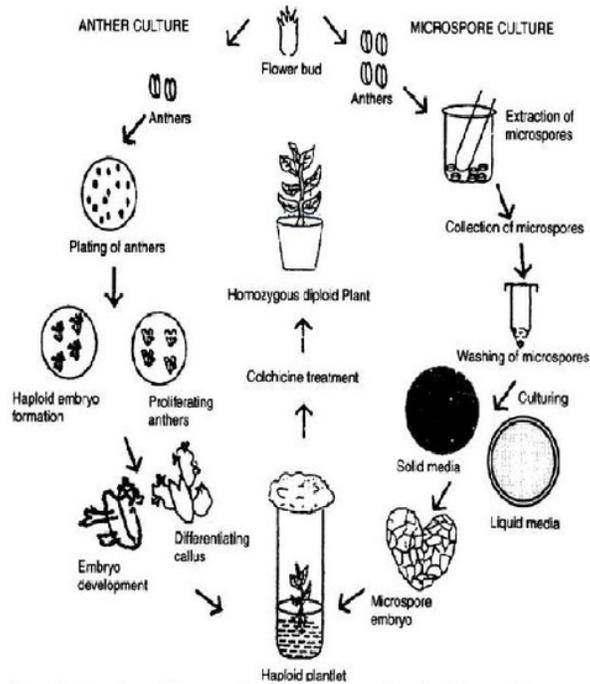
Gambar 7. Tahapan MikrosporaTebu
a. awal uninukleat b. uninukleat; c. multinukleat; d. polen masak

7

KULTUR MIKROSPORA

Tanaman haploid dapat dikembangkan dengan teknik kultur *in vitro* mikrospora dan anter (Gambar 2.6). Kultur mikrospora berbeda dengan kultur anter. Kultur anter menggunakan anter sebagai eksplan kemudian ditanam pada medium padat. Pada kultur mikrospora, eksplan yang digunakan adalah serbuk sari muda atau yang biasa disebut dengan mikrospora. Anter harus dipecah lebih dulu kemudian mikrospora ditanam pada medium cair (Chwla, 2002). Kultur mikrospora memiliki keunggulan dibanding kultur anter. Kultur mikrospora menghasilkan jumlah embrio yang banyak.

Produksi haploid dan *double haploid* yang dihasilkan dari kultur mikrospora dapat dimanfaatkan sebagai model sistem proses embriogenesis dan target manipulasi genetik seperti mutasi, seleksi *in vitro* dan transformasi (Palmer *et al.*, 2005). Selain itu, kultur mikrospora merupakan teknologi yang efisien untuk memproduksi tanaman homozigot. Tanaman homozigot digunakan sebagai tetua dalam memproduksi hibrida F1 dengan meningkatkan efisien seleksi untuk rekombinan genetik (Na *et al.*, 2011).



Gambar 8. Perbandingan Kultur Anter dan kultur mikrospora (Chawla, 2002)

Kultur mikrospora menghasilkan embrio yang bersifat haploid dan juga secara spontan dapat menjadi tanaman *double haploid* (Eftoda, 2006). ¹⁰ Tanaman haploid adalah tanaman yang mempunyai kromosom dengan jumlah separuh dari jumlah kromosom tanaman normal. Tanaman haploid sangat penting dalam pemuliaan tanaman yaitu untuk mendapatkan tanaman homozigot atau galur murni (Santoso dan Nursandi, 2002).

Tanaman haploid dapat terjadi secara alami dan buatan. Cara alami dapat terjadi melalui penyerbukan sendiri namun

frekuensinya rendah. Dalam pemuliaan tanaman, tanaman haploid set kromosomnya dapat digandakan dan diperoleh tanaman yang homozigot sempurna. Untuk menggandakan sesuai dengan sifat yang diinginkan perlu mengubah tanaman haploid menjadi homozigot *double haploid* dengan kultur mikrospora (Boer *et al.*, 2000).

Kultur mikrospora digunakan dalam program pemuliaan karena dapat meningkatkan embrio 10 kali lipat dibanding kultur anter. Adapun faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur mikrospora yaitu:

a. Genotip tanaman donor

Tanaman donor adalah tanaman yang akan digunakan sebagai eksplan kultur jaringan. Genotip merupakan faktor yang penting dalam frekuensi embriogenesis pada kebanyakan spesies. Perbedaan genotip tanaman donor akan menghasilkan variasi dalam embriogenik. Tiap genotip dapat merespon embriogenesis yang berbeda pada tiap tanaman (Eftoda, 2006).

b. Status Fisiologi Tanaman Donor

Kondisi lingkungan, khususnya suhu biasanya mempengaruhi fisiologi tanaman donor dan sekaligus mempengaruhi potensial androgenik dalam isolasi mikrospora. Kebanyakan tanaman tumbuh pada kondisi temperatur rendah. Umur tanaman juga mempengaruhi respon dalam kultur mikrospora. Umumnya tanaman yang digunakan dalam kultur mikrospora adalah tanaman yang

muda dan kuat walaupun demikian ada beberapa embrio yang dapat diproduksi dari tanaman yang tua.

c. Tahap Perkembangan Mikrospora

Pada kultur mikrospora, embriogenesis dapat berlangsung dengan baik hanya pada tahapan perkembangan mikrospora yang spesifik. Hal ini bervariasi pada tahap awal uninukleat atau awal binukleat tergantung jenisnya (Babbar *et al.*, 2004).

d. Perlakuan

Beberapa perlakuan secara fisika maupun kimia dapat mempengaruhi proses embriogenesis. Perlakuan dapat mengakhiri perkembangan gamet dan melanjutkan proses perkembangan spora. Salah satu perlakuan yang umum dilakukan pada kultur mikrospora adalah perlakuan panas. Perlakuan panas dapat mempengaruhi distribusi awal mikrotubul pada mikrospora kemudian menghalangi perkembangan gamet (Babbar *et al.*, 2004).

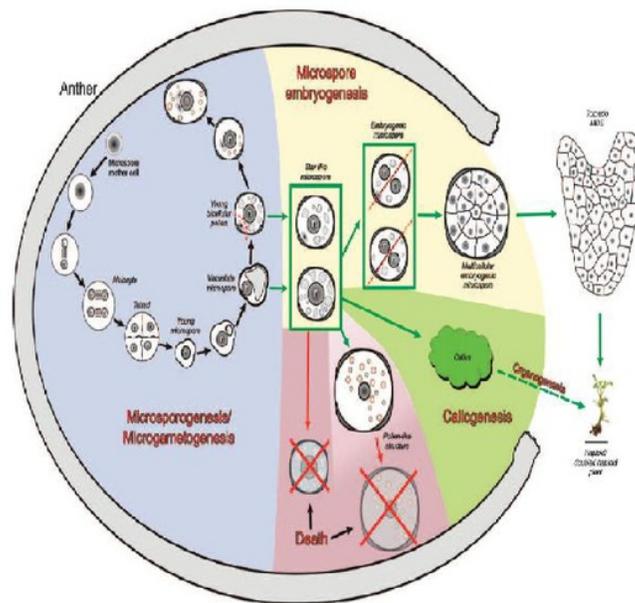
e. Komposisi media

Media kultur mikrospora terdiri dari air, karbohidrat, vitamin, mineral, asam amino dan zat pengatur tumbuh. Komponen tersebut dapat divariasikan satu sama lain sehingga mempengaruhi proses embriogenesis pada tanaman yang dikultur. Media standar yang digunakan dalam kultur mikrospora biasanya meliputi media NLN, MS, B5 yang memiliki komposisi karbohidrat yang bervariasi. Karbohidrat berupa sukrosa kebanyakan

•

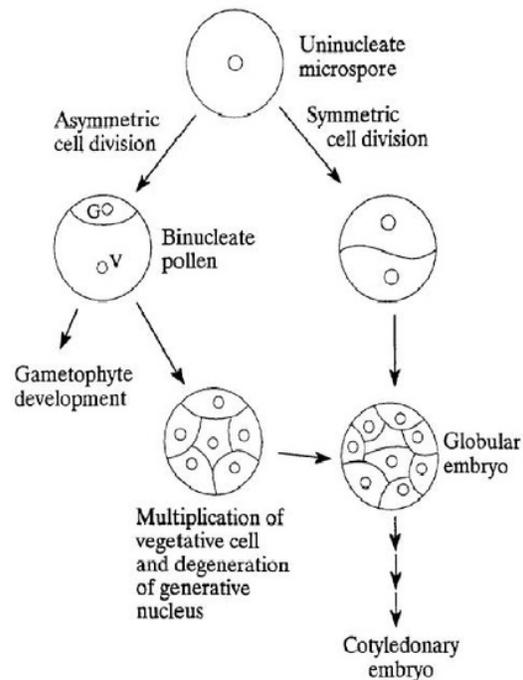
digunakan dalam kultur mikrospora (Eftoda, 2006). Untuk menstimulus produksi tanaman haploid dari Brassica dalam media dapat ditambahkan kolkhisin dan arang aktif. Kolkhisin digunakan secara *in vitro* untuk menstimulus embriogenesis mikrospora. Larutan kolkhisin dengan konsentrasi yang tepat dapat mencegah terbentuknya ²⁸ gelendong spindel sehingga pemisahan kromosom pada anafase dari mitosis tidak berlangsung (Boer *et al.*, 2000). Tidak berlangsungnya pemisahan kromosom menyebabkan penggandaan kromosom tanpa pembentukan dinding sel sehingga terbentuk tanaman homozigot *double haploid* (Heberle-Bors, 1999). Perlakuan kolkhisin pada suspensi mikrospora secara signifikan dapat meningkatkan proporsi variasi genotip dari tanaman diploid (Takahira *et al.*, 2011). Menurut Cousin *et al.* (2009).¹³ Arang aktif bukan zat pengatur tumbuh tetapi suatu bahan yang mempunyai kemampuan memodifikasi komposisi media.¹³ Arang aktif mempunyai daya serap yang kuat dan digunakan dalam proses kimiawi untuk menyerap senyawa toksik yang menghambat proses diferensiasi dan dediferensiasi (Hutami, 2006). Pada saat kultur mikrospora terkadang dihasilkan senyawa toksik sehingga menghambat embriogenesis. Senyawa penghambat yang dihasilkan dapat berupa gas etilen, senyawa fenol dan lain sebagainya. Arang aktif dapat menyerap senyawa tersebut sehingga embriogenesis dapat berlangsung (Dias, 1999).

1 Tahap perkembangan mikrospora merupakan faktor penting dalam kultur mikrospora. Hal ini dikarenakan tahapan perkembangan mikrospora yang tepat akan menghasilkan embryogenesis (Suaib *et al.*, 2007). Mikrospora dapat langsung beregenerasi membentuk embrio disebut embriogenesis. Mikrospora juga dapat membentuk jaringan kalus yang selanjutnya dapat diinduksi untuk bergenerasi menjadi tanaman atau disebut *callogenesis*. Proses embriogenesis mikrospora disajikan pada Gambar 2.4 (Segui-Simaro dan Nuez, 2008).



Gambar 9. Embriogenesis Mikrospora (Segui-Simaro dan Nuez, 2008)

Tahap uninukleat dan awal binukleat merupakan fase yang paling baik untuk embriogenesis kultur mikrospora. Embriogenesis mikrospora dapat berlangsung pada kondisi kultur yang optimal. Embriogenesis pada kultur mikrospora dapat melalui dua tahap pembelahan asimetris dan simetris (Gambar 2.5). Mikrospora dari pembelahan tersebut berkembang menjadi binukleat. perbanyakan sel vegetatif membentuk globular embrio yang kemudian berkembang menjadi embrio kotiledon (Palmer dan Keller, 1999).



Gambar 10. Embriogenesis pada Kultur Mikrospora (Palmer dan Keller, 1999)

•

8

METODOLOGI KULTUR MIKROSPORA TEBU

TBelum banyak peneliti yang tertarik pada teknik kultur mikrospora tebu. Metodologi yang disajikan berfungsi untuk menginduksi embryogenesis mikrospora. Hasil yang didapatkan hingga pada tahap embrio globular dan tahap heart shape embrio.

²⁴ *Persiapan Alat dan Bahan*

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa cawan petri, pipet tetes, gelas beaker, pinset, penggaris, spatula, mikroskop, sentrifuge, incubator, autoklaf, filter 100 μm , erlenmeyer, kertas koran dan micropore ukuran 0,22 m. Bahan yang digunakan antara lain medium Ms, alkohol 96%, sodium hipoklorit, tween dan larutan Dapi, pupuk Urea, SP36, dan KCl.

Persiapan Bahan Tanaman Donor Kultur Mikrospora

Metode penanaman tebu yang digunakan yaitu dengan menanam potongan batang atau bagal (setts) sepanjang dua buku tebu dengan posisi horizontal di dalam parit pada kedalaman ± 25

cm. Pemeliharaan tanaman tebu dengan variasi pemberian pupuk Urea, SP36, dan KCl dengan dosis berturut-turut 100; 50 dan 50 g per 500 cm panjang parit. Semua dosis Urea, SP36, dan KCl, diberikan dua bulan setelah penanaman. Perlakuan berikutnya yaitu pengendalian hama dan penyakit secara berkala, penyiraman, pengendalian gulma serta pembumbunan tanah di sepanjang baris tanaman (Suaib *et al.*, 2008).

Identifikasi Tahapan Perkembangan mikrospora

Anther dipilih berdasarkan warna mikrospora di dalamnya yaitu khusus anther berwarna kuning. Sebanyak 100 anther ditumbuk secara perlahan dengan alat penumbuk (mortar dan stamfer) yang diberi aquadest 5 ml hingga mikrospora terbuka. Penyaringan mikrospora menggunakan filter 100 μ m. identifikasi tahap perkembangan mikrospora dilakukan dengan meneteskan larutan pada kaca objek dan diamati dibawah mikroskop.

Uji viabilitas mikrospora

Sebanyak satu tetes larutan mikrospora ditempatkannya di atas kaca obyek masing-masing di beri larutan IKI, Acetocarmin 1 % dan Laptopenol Blue kemudian ditutup dengan kaca penutup. Sel yang dapat menyerap warna diamati dibawah mikroskop. Dihitung persentase viabilitas mikrospora. Mikrospora viable ditandai oleh warna kuning/hijau yang berpendar(Winarto dan Rahmawati, 2007).Indikator dari metode ini yaitu mikrospora yang viabel menampakkan intinya, sedangkan mikrospora nonviabel tidak memberikan reaksi pewarnaan atau mikrospora terlihat tanpa inti. Inti generatif berukuran lebih kecil dan dengan intensitas

penyerapan warna yang lebih terang, sedangkan inti vegetatif berukuran lebih besar tetapi intensitas penyerapan warna yang kurang terang. Viabilitas dan status pembelahan inti mikrospora diamati menggunakan mikroskop binokuler fluorescent perbesaran 100x.

Pembuatan Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini antara lain medium mannitol, medium Ms dan NPB-199. Seluruh medium yang digunakan dalam kultur mikrospora berupa medium cair steril. Sterilisasi medium menggunakan penyaringan micropore ukuran 0,22 m kemudian dimasukkan dalam botol schott. Botol schott yang digunakan disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121° C dan tekanan 1,2 kg cm⁻² atau 0,127 Mega Pascal(MPa) selama 20 menit.

Perkecambahan Mikrospora

Masing- masing cabang malai diisolasi dengan menumbuk malai sebanyak 20 cabang malai yang dicampur media mannitol 0,3M dan ditumbuk secara perlahan dengan alat penumbuk (mortar dan stamfer). Setelah ditumbuk kemudian melakukan penyaringan dengan filter 100 µm. Kemudian mensentrifuge suspensi hasil penyaringan dengan larutan mannitol 0,3M sebanyak 15 ml dengan sentrifugasi suhu dingin 4°C dua variasi kecepatan 750 3 menit. Setelah itu memindahkan pelet yang dihasilkan dalam cawan petri sebanyak 4 ml dengan kepadatan 3×10^4 mikrospora per ml. Kemudian dimasukkan ke dalam variasi media Brewbaker dan Kwack pada cawan petri dengan lapisan parafilm. disimpan pada

variasi suhu ruang 4-25°C selama 7 hari dalam kondisi gelap agar mikrospora dapat berkecambah.

Kultur mikrospora tebu

a. Pra perlakuan malai tebu

Tahap awal yaitu memasukkan malai yang layak digunakan sebagai tanaman donor mikrospora dengan membungkusnya dengan kertas koran. Kemudian menyimpan malai tersebut selama 1 malam pada inkubator 40C dalam keadaan gelap.

b. Sterilisasi malai

1 Sterilisasi malai dilakukan di dalam LAFC (Laminar Air Flow Cabinet) dengan menyemprot malai dengan alkohol 96% sebelum dimasukkan kedalam LAFC. Tahap selanjutnya yaitu mengeluarkan cabang malai dari bungkus kelopak daun bendera menggunakan dua pasang pinset steril. Sterilasi yang menggunakan alkohol dengan memasukkan cabang malai kedalam gelas Erlenmeyer volume 250 ml yang berisi alkohol 70% selama 60 detik. Setelah itu membuang alkohol dan diganti dengan 100% sodium hipochlorite dan satu tetes "tween-20", lalu menggoyang gelas Erlenmeyer secara perlahan selama 20 menit. kemudian membilas cabang malai sebanyak tiga kali masing-masing 5 menit dengan aquadest steril.

c. Pra Perlakuan Stress dengan variasi suhu inkubasi

Pra Perlakuan Stress dengan variasi suhu inkubasi" Pra perlakuan stres dilakukan dengan memasukkan cabang malai yang terdapat anter sebanyak 100 potong berukuran ± 2 cm yang telah steril ke dalam cawan Petri steril berdiameter 3 cm yang berisi 5ml medium

mannitol 0,3M. Kemudian membungkus cawan petri dengan parafilm dan diinkubasi pada suhu berbeda diantaranya suhu rendah (4°C) dengan masa penyimpanan 7 hari.

d. Isolasi mikrospora Tebu

masing- masing cabang malai diisolasi dengan memasukkan cabang menumbuk malai dengan menumbuk 20 cabang malai yang dicampur secara perlahan dengan alat penumbuk (mortar dan stamfer) secara perlahan dalam media mannitol 0,3M. Setelah ditumbuk kemudian melakukan penyaringan dengan filter 100 µm. Kemudian mensentrifuge suspensi hasil penyaringan dengan larutan mannitol 0,3M sebanyak 15 ml dengan sentrifugasi suhu dingin 4°C dua variasi kecepatan 750-900 rpm selama 5 menit sebanyak 3 kali. Setelah itu memindahkan pelet yang dihasilkan dalam cawan petri sebanyak 4 ml dengan kepadatan 3×10^4 mikrospora per ml. Kemudian dimasukkan ke dalam variasi media MS pada cawan petri dengan lapisan parafilm. disimpan pada variasi suhu ruang 25°C dalam kondisi gelap untuk menginduksi embrio.

9

PROSPEK PENGEMBANGAN TEKNIK KULTUR MIKROSPORA

Teknologi terbaru dalam produksi galur homozigot yaitu dengan teknik kultur mikrospora. Teknik kultur mikrospora sangat berpotensi bagi program pemuliaan tanaman (Shafrin *et al.*, 2010). Kultur mikrospora merupakan teknik untuk menghasilkan bibit galur murni yang bersifat haploid dan juga dapat bersifat menjadi tanaman *double haploid* dengan variasi perlakuan pada saat kultur.

Tanaman haploid memiliki jumlah kromosom separuh dari jumlah kromosom tanaman normal. Tanaman haploid ini digunakan untuk memperoleh galur murni. Pada saat kultur mikrospora tanaman haploid dapat diinduksi menjadi *double haploid* (jumlah kromosomnya ganda) dengan variasi perlakuan kultur seperti suhu (Mishra ¹*et al.*, 2014).

Teknik kultur mikrospora menghasilkan galur murni dengan memicu embriogenesis mikrospora. Mikrospora dapat langsung beregenerasi membentuk embrio disebut embriogenesis.

Mikrospora juga dapat membentuk jaringan kalus yang selanjutnya dapat diinduksi untuk bergenerasi menjadi tanaman atau disebut *callogenesis*. (Segui-Simaro dan Nuez, 2008). Mikrospora pada tahap uninukleat dan awal binukleat merupakan fase yang paling baik untuk embriogenesis kultur mikrospora. Embriogenesis mikrospora dapat berlangsung pada kondisi kultur yang optimal. Embriogenesis pada kultur mikrospora dapat melalui dua tahap pembelahan asimetris dan simetris. Mikrospora dari pembelahan tersebut berkembang menjadi binukleat, perbanyakkan sel vegetatif membentuk globular embrio yang kemudian berkembang menjadi embrio kotiledon yang kemudian dapat berkembang menjadi tanaman utuh bersifat homozigot.

Penelitian terdahulu suaib *et al.* (2013) menyebutkan bahwa teknik kultur mikrospora di Indonesia sudah mulai dikembangkan. Namun, belum ada laporan protokol standar teknik mikrospora tanaman tebu yang menghasilkan embrio double haploid sampai menjadi tanaman utuh. Pelepasan varietas baru hasil kultur mikrospora belum pernah dilaporkan. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi teknik kultur mikrospora yaitu adanya perbedaan respons terhadap medium induksi, perbedaan genotipe tanaman tebu, perbedaan komposisi nutrisi dan ZPT, perbedaan respon dalam menghasilkan embrio serta perlakuan stres pada teknik kultur mikrospora.

Dalam penelitian Anitasari *et al.*, 2018 disebutkan bahwa stress perlakuan perendaman mannitol 0,3 M dapat memicu embryogenesis sehingga menghasilkan embrio globular hingga heart shape embrio.

Dalam penelitian tersebut, perospek pengembangan teknik kultur mikrospora memiliki prospek yang baik karena teknik yang telah dilakukan berhasil memicu embryogenesis mikrospora tebu. berikut uraian penelitian Anitasari et al., harapan kedepannya teknik ini dapat terus dikembangkan di Indonesia untuk mendukung program pemuliaan tanaman modern.

Tahap awal yang wajib dilakukan yaitu pengecekan varietas dilakukan untuk memastikan varietas tersebut layak dijadikan sebagai tanaman donor kultur mikrospora.

1. pengecekan anther

Tebu merupakan tanaman yang berbunga satu tahun sekali sekitar bulan mei- agustus sehingga dalam pengecekan sampel tebu diambil dari tiga lokasi yaitu kabupaten yaitu Bondowoso, Jember dan Lumajang. Berikut malai tebu yang dijadikan sebagai bahan penelitian.



Gambar 11. Malai tebu (lingkaran merah)

Setelah panen malai tebu tahap yang dilakukan yaitu uji laboratorium berupa pengecekan tahapan mikrospora yang terdapat dalam anter tebu dan viabilitas mikrospora masing-masing bahan tanaman. Berdasarkan seleksi awal malai tebu didapatkan hasil bahwa dalam penelitian ini menggunakan malai yang tertutup daun bendera sebagai donor eksplan untuk menghindari kontaminasi jamur maupun bakteri.

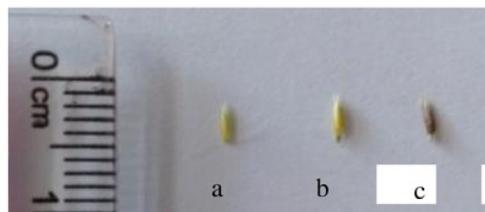


Gambar 12. Malai yang sudah dibersihkan dari daun bendera Anther dalam penelitian dibedakan dalam tiga parameter warna yaitu putih, kuning, coklat.

Berikut seleksi anther yang digunakan untuk menentukan tahapan mikrospora:

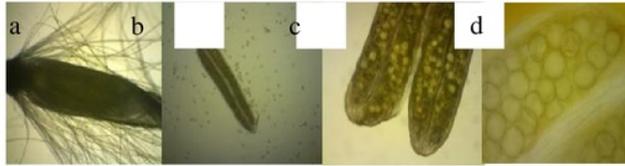


Gambar 13. Cabang malai dalam penelitian



Gambar 14. Anther berdasarkan warna
(a. putih; b. kuning; c. coklat)

Tiap malai memiliki keragaman tahapan mikrospora yang berbeda. Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan melalui pengamatan mikroskop berikut mikrospora yang ditemukan dalam anther tebu:



Gambar 15. Anther

a. anther sebelum dipecah; b. perbesaran 4x; c. perbesaran 10x; d. perbesaran 100x

Berikut data hasil penelitian yang telah dilakukan:

Tabel 1. Persentase tahapan mikrospora wilayah Jember

No	Tahapan	persentase		
		Putih	Kuning	coklat
1	Awal Uninukleat	81.44	5.73	0
2	Uninukleat	18.56	94.27	0
3	Multinukleat	0	0	18.85
4	Polen masak	0	0	81.15

Tabel 2. Persentase tahapan mikrospora wilayah Lumajang

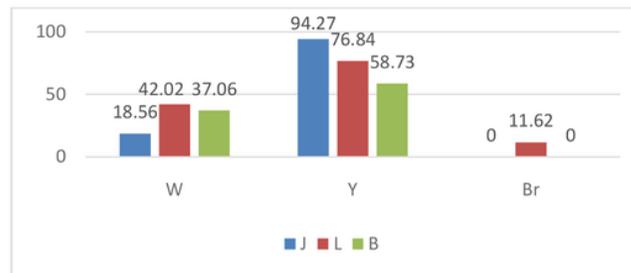
No	Tahapan	persentase		
		Putih	Kuning	coklat
1	Awal Uninukleat	52.66	33.33	0
2	Uninukleat	42.02	58.73	11.62
3	Multinukleat	5.32	4.23	39.89
4	Polen masak	0	3.7	48.48

Tabel 3. Persentase tahapan mikrospora wilayah Bondowoso

No	Tahapan	persentase		
		Putih	Kuning	coklat
1	Awal Uninukleat	62.94	23.16	0

2	Uninukleat	37.06	76.84	0
3	Multinukleat	0	0	44.57
4	Polen masak	0	0	55.43

Berikut diagram presentase mikrospora tebu (gambar 17). Berdasarkan hasil penelitian dalam diagram ini menunjukkan bahwa setiap warna anther memiliki persentase tahapan mikrospora yang berbeda. Selain itu dari tiga lokasi sampling yaitu jember, lumajang dan bondowoso, persentase jumlah tahapan mikrospora yang diperoleh juga bervariasi. Persentase tertinggi dari tahap uninukleat ditemukan pada anther berwarna kuning 94,27% dari daerah sampling Jember



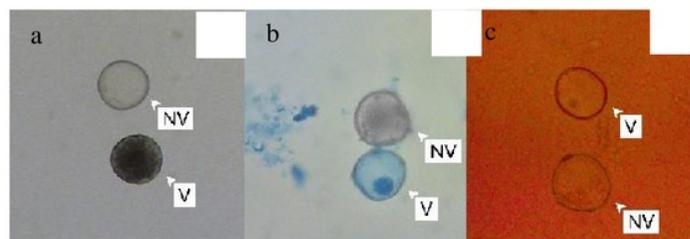
Gambar 17. Persentase tahapan mikrospora uninukleat (warna anther W: putih, Y: Kuning; Br: Coklat), Lokasi sampling (J: Jember;L: Lumajang; B: Bondowoso)

Dalam penelitian ini menggunakan tiga zat pewarna yang berbeda yaitu IKI, Laptopenol Blue dan Acetocarmin. Persentase Viabilitas mikrospora berbeda pada masing-masing zat pewarna (Tabel 4). Hasil analisis Anova 5% menunjukkan bahwa masing-masing zat pewarna memberikan pengaruh berbeda pada viabilitas mikrospora tebu (sig. 0.00).

Tabel 4. Persentase Viabilitas Mikrospora

No	Pewarna	Aquadest		Mannitol	
		viabel	Non viabel	viabel	Non viabel
1	IKI	88.72	11.28	92.89	7.12
2	Laptopenol Blue	51.29	48.70	60.84	39.15
3	Acetocarmin	43.45	56.54	46.19	53.81

Reaksi pewarnaan pada mikrospora dapat dilihat pada gambar 9. Reaksi tersebut mengindikasikan bahwa mikrospora viabel dapat menyerap zat pewarna sedangkan non viabel tidak dapat menyerap zat warna.



Gambar 18. Viabilitas mikrospora menggunakan pewarna a. IKI b. Laptopenol Blue; c. Acetocarmin;

Tiap teknik pewarnaan dapat menghasilkan perbedaan persentase viabilitas mikrospora yang signifikan. Perbandingan teknik uji viabilitas mikrospora dilakukan untuk menghasilkan data yang akurat dalam penentuan viabilitas mikrospora. Selain itu, persentase viabilitas mikrospora tergantung pada kemampuan polen dalam merespon pewarnaan yang diberikan. Hal ini dikarenakan viabilitas mikrospora dipengaruhi oleh beberapa

faktor diantaranya suhu, kepadatan mikrospora, media yang digunakan dan lama inkubasi (Mariani dan Bots, 2005)

Uji mikrospora pertama dilakukan dengan menumbuk anther pada pelarut aquadest. Setelah dilakukan penyaringan mikrospora diletakkan pada gelas objek kemudian diberi larutan pewarna. Pengamatan viabilitas mikrospora pada mikroskop cahaya menunjukkan bahwa tiap zat pewarna memiliki reaksi pewarna yang berbeda pada sel mikrospora tebu (Gambar 18). Hal ini dikarenakan tiap metode pewarnaan memberikan hasil yang berbeda dan spesifik pada tiap species (Vizintin dan Bohanec, 2004). Warid dan Palupi (2009) juga menyatakan metode standar pengujian viabilitas mikrospora belum ditetapkan sehingga dilakukan teknik lain sebagai pembanding. Pembanding tersebut bertujuan untuk mempertegas persentase viabilitas mikrospora yang dihasilkan.

Persentase viabilitas mikrospora pada standart pewarnaan mikrospora menggunakan pelarut aquadest, Viabilitas mikrospora tertinggi terdapat pada mikrospora yang diwarnai dengan IKI yaitu sebesar 88.72%. Pewarnaan IKI merupakan metode pewarnaan yang paling banyak digunakan oleh *breeder* tebu. Tingginya nilai viabilitas mikrospora pada pewarna IKI dalam pewarnaan ini karena didasarkan pada pewarnaan pati yang ada pada butir serbuk sari. Namun, zat pati bukan satu-satunya alat pembatas untuk tabung perkecambahan tabung, dan untuk alasan tersebut, validitas metode ini telah dikritik di kalangan peneliti (Melloni *et al.*, 2013). Selain itu zat pati yang terwarnai menunjukkan mikrospora sudah

.

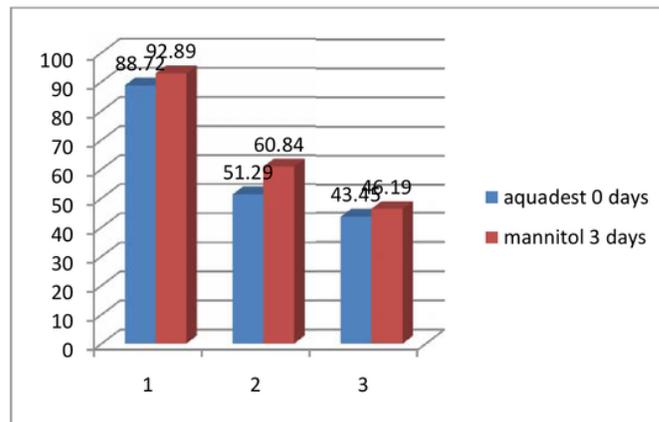
melebihi standart mikrospora yang layak digunakan sebagai donor kultur mikrospora, zat pati menunjukkan bahwa sel sudah memasuki fase masak atau disebut dengan pollen grain/ mature pollen.

Teknik pewarnaan lain dalam uji viabilitas mikrospora dapat menggunakan Lactopenol blue. Persentase viabilitas mikrospora menggunakan Lactopenol Blue yaitu 51.29%. Mikrospora viabel ditandai dengan perubahan warna sel menjadi biru dan mikrospora non viable tidak dapat menyerap warna sehingga tidak terjadi perubahan warna sel (Vizintin dan Bohanec, 2004). Dalam penelitian ini lactopenol blue efektif digunakan sebagai pewarna dalam uji viabilitas mikrospora tebu sebagai persiapan tanaman donor mikrospora (gambar 18. Hal ini dikarenakan nukleus terwarnai dengan sempurna (Biru tua). Inti sel yang terwarnai menunjukkan bahwa terdapat mikrospora uninukleat yang viabel sehingga dapat dijadikan tanaman donor kultur mikrospora. Uji viabilitas mikrospora berfungsi untuk mengetahui persentase sel yang memiliki potensi embriogenesis sehingga dapat merespon embriogenesis pada saat kultur mikrospora. Dalam kultur mikrospora tahap uninukleat merupakan tahapan yang efektif dalam merubah jalur gametofitik kearah sporofitik (Wahidah, 2010). Dafni *et al.* (2000) juga menyebutkan bahwa polen dikatakan viabel apabila memiliki persentase viabilitas polen di atas 50%.

Pewarna acetocarmin banyak digunakan peneliti untuk menguji viabilitas mikrospora pada poacea seperti gandum (Wang *et al.*, 2015) dan jagung (hosseini, 2015). Dalam penelitian ini

penggunaan acetocarmin kurang efektif untuk menentukan mikrospora yang viabel. Persentase mikrospora yang dihasilkan yaitu sebesar 43.45%. sel yang terwarnai juga hanya sebatas pada dinding sel mikrospora sehingga inti sel tidak bias dipastikan viabel apa tidak.

Perendaman anther sebelum uji viabilitas mikrospora menggunakan mannitol pada suhu rendah 4⁰C dapat meningkatkan viabilitas mikrospora tebu.



Gambar 19. Peningkatan viabilitas mikrospora setelah perendaman mannitol 3 hari(Pewarna 1. IKI; 2. Laptophenol Blue; 3. Acetocarmin)

Pada species tertentu, penggunaan mannitol dapat meningkatkan viabilitas mikrospora (Neumann *et al.*, 2008). Pada tembakau, perlakuan suhu rendah dapat meningkatkan viabilitas mikrospora sebelum dilakukan kultur (Jain *et al.*, 2013). Pada tanaman brassica, perendaman anther pada larutan mannitol pada

suhu rendah 4⁰C memiliki efek sinergis pada perkembangan tahap microspora. Selain itu, perlakuan gabungan menghasilkan frekuensi regenerasi tanaman yang lebih tinggi pada populasi yang diregenerasi (Zeng *et al.*, 2015).

Perkecambahan tebu pada media brewbaker dan kwack cenderung rendah sehingga menurut metode ini viabilitas mikrospora berdasarkan teknik perkecambahan rendah karena presentase dibawah 50%. Berikut tabel presentase perkecambahan

Tabel 5. Persentase Viabilitas Polen Tebu

Ulangan	Media brewbaker	Media kwack
1	0,96 %	0,99 %
2	32,03 %	0
3	2,06 %	0
4	7 %	0
5	3,96 %	0
6	3,96 %	0
7	4,85 %	0
8	3,22 %	0
9	2,19 %	0
10	7,44 %	0
11	6,31 %	0
12	6,48 %	0
13	7,40 %	0
14	7,07 %	0
15	8,16 %	0
16	8,33 %	0

Berdasarkan hasil uji T menunjukkan adanya pengaruh perbedaan yang signifikan dari variasi media terhadap presentase perkecambahan mikrospora. Pada dasarnya memang viabilitas mikrospora pada tebu sedikit. Penelitian terdahulu suaib *et al.* (2013) menyebutkan bahwa teknik kultur mikrospora di Indonesia sudah mulai dikembangkan. Namun, belum ada laporan standar

teknik mikrospora tanaman tebu yang menghasilkan embrio dobel haploid sampai menjadi tanaman utuh. Pelepasan varietas baru hasil kultur mikrospora belum pernah dilaporkan. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi teknik kultur mikrospora yaitu adanya perbedaan respons terhadap medium induksi, perbedaan genotipe tanaman tebu, perbedaan komposisi nutrisi dan ZPT, perbedaan respon dalam menghasilkan embrio serta perlakuan stres pada teknik kultur mikrospora (Santosa ET AL., 2004).

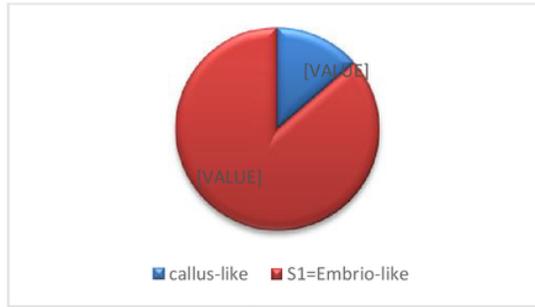
Rendahnya viabilitas polen dengan teknik perkecambahan polen di duga karena polen tidak mampu membentuk buluh kecambah pada saat inkubasi. Viabilitas polen sangat di pengaruhi oleh faktor kondisi lingkungan pada saat inkubasi. Mariana dan Bots (2005) menyebutkan bahwa persentase viabilitas mikrospora tergantung pada kemampuan mikrospora dalam merespon perlakuan yang di berikan. Hambatan sebelum terjadinya pembuahan (*pre-fertilization barrier*), berupa kegagalan dalam perkecambahan serbuk sari atau lambatnya pertumbuhan tabung serbuk sari, adanya mekanisme yang bisa mempengaruhi perkembangan zigot sejak pembelahan sel pertama hingga pembuahan bahkan hingga diferensiasi akhir organ reproduktif dan pembentukan gamet, adanya aksi gen spesifik, tidak ada keserasian antara inti dan sitoplasma atau antara embrio dan endosperm dari spesies yang digunakan dalam persilangan (Yunianti., 2007)

Persentase mikrospora yang berkecambah menggunakan media Brewbaker lebih tinggi dari pada media Kwack. Hal ini dikarenakan Setiap polen memerlukan media perkecambahan yang

berbeda, sehingga di perlukan pengujian awal untuk mendapatkan komposisi dan konsentrasi bahan kimia yang tepat, medium atau konsentrasi bahan kimianya. (Warid, Endah retno Palupi., 2009). Tinggi rendahnya nilai daya berkecambah polen di pengaruhi juga oleh banyak faktor eksternal, seperti sumber karbon, boron dan kalsium, potensial air, derajat kemasaman media, kerapatan polen dalam media dan aerasi dalam media kultur (Rihova *et al.*, 2000). Sukrosa merupakan senyawa gula sebagai sumber karbon yang mudah di absorbs oleh sel tanaman, sehingga sukrosa sering di gunakan dalam pembuatan media perkecambahan polen karena dapat menghasilkan presentase perkecambahan yang lebih tinggi dan perpanjangan tabung polen. Komposisi dari media brewbaker sendiri berbeda dengan media kwack yaitu adanya potassium nitrate pada brewbaker dan di duga bisa menumbuhkan perkecambahan lebih banyak.

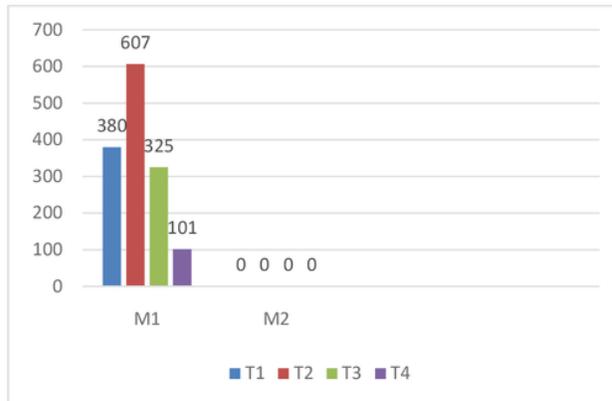
Penelitian ini menggunakan varietas tebu Bululawang sebagai tanaman donor kultur mikrospora. Penentuan malai tersebut didasarkan pada hasil seleksi anther, tahapan perkembangan mikrospora dan uji viabilitas mikrospora melalui pewarnaan dan perkecambahan. Malai yang dipilih sebagai tanaman donor yaitu malai yang tertutup bendera dan usia tanaman tebu 10 bulan. Berikut Hasil optimasi kultur mikrospora dengan dua variasi optimasi kultur yang telah dilakukan

Optimasi yang dilakukan pada penelitian ini yaitu stress perlakuan perendaman anther pada larutan mannitol 0.3M selama 7 hari kemudian diisolasi kultur mikrospora menggunakan media MS dengan variasi suhu inkubasi 4⁰C dan 25⁰C.



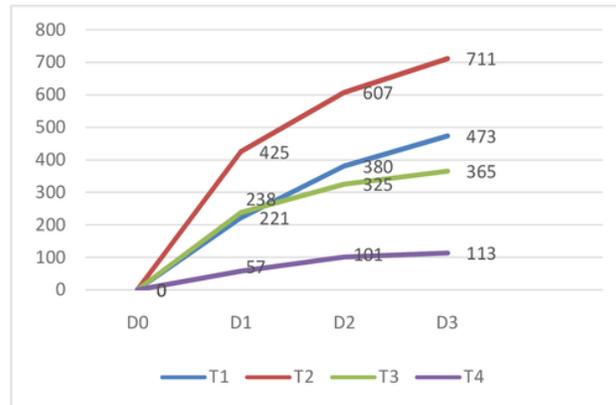
Gambar 20. Rata2 Jumlah Embrio setelah 30 hari Kultur berdasarkan suhu penyimpanan yang berbeda
 *Ket: S (Suhu penyimpanan kultur): S1 = suhu 4⁰C, S2 (Suhu 25⁰C)

Berdasarkan hasil optimasi 1 teknik kultur dalam optimasi kedua tetap menggunakan stress pra perlakuan perendaman mannitol 0.3M 7 hari pada anther sebelum isolasi menggunakan suhu ruang untuk inkubasi kultur karena penggunaan suhu ruang terbukti menghasilkan struktur embrio. Variabel dalam optimasi 2 ini yaitu menambah variasi media untuk melihat jumlah embrio yang dihasilkan. Variasi media yang digunakan yaitu media MS dan NPB-99. Namun hasil penelitian pada optimasi 2 menunjukkan bahwa media NPB-99 tidak efektif digunakan untuk kultur mikrospora karena tidak dapat menginduksi embrio.



Gambar 21. Rata-rata jumlah mikrospora embrionik setelah isolasi mikrospora. Ket: *T* (pre treatment mannitol sebelum isolasi): *T1* (0 hari), *T2* (7 hari), *T3* (14 hari), *T4* (21 Hari) dan *M* (media kultur): *M1* (*Ms*), *M2* (*NPB-199*)

Berdasarkan hasil optimasi 1 dan 2 secara deskriptif maka optimasi ke 3 dalam penelitian ini mengoptimalkan metode kultur dengan variasi lama perendaman mannitol untuk stress pra perlakuan terhadap perkembangan mikrospora embrionik selama 90 hari kultur. Berikut diagram perkembangan embrio hasil kultur mikrospora selama 90 hari kultur



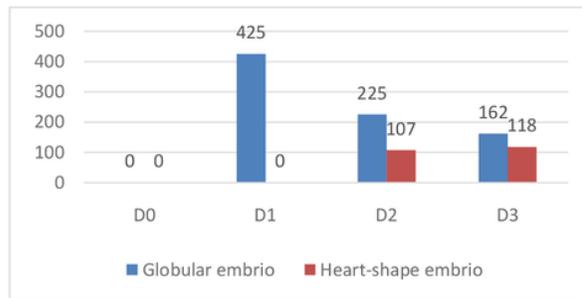
Gambar 22. Perkembangan embrio selama 90 hari kultur.
 Ket: T (pre treatment mannitol sebelum isolasi): T1 (0 hari), T2 (7 hari), T3 (14 hari), T4 (21 Hari) dan D (Lama penyimpanan kultur): D0 (Awal isolasi), D1 (30hari), D2 (60 hari), D3 (90hari)

Berdasarkan hasil Uji Anova didapatkan hasil bahwa variasi waktu inkubasi pada perlakuan stres memiliki pengaruh yang signifikan terhadap jumlah embrio yang dihasilkan. Uji Duncan menunjukkan bahwa terdapat pengaruh rata-rata jumlah embrio berbeda secara signifikan pada setiap perlakuan (Tabel 1). Perkembangan teknik kultur mikrospora dalam penelitian ini berhasil menginduksi mikrospora uninukleat menjadi embrio. embrio yang dihasilkan adalah embrio berbentuk bulat dan berbentuk hati (Gambar 1).

Tabel. 6 Uji Anova optimasi kultur mikrospora 3

Pra Perlakuan Mannitol	Jumlah Embrio
T1(0 hari)	475,2 ± 4,97 ^c
T2 (7 hari)	711,2 ± 8,26 ^d
T3 (14 hari)	365,0 ± 7,65 ^b
T4 (21 hari)	115,6 ± 5,12 ^a

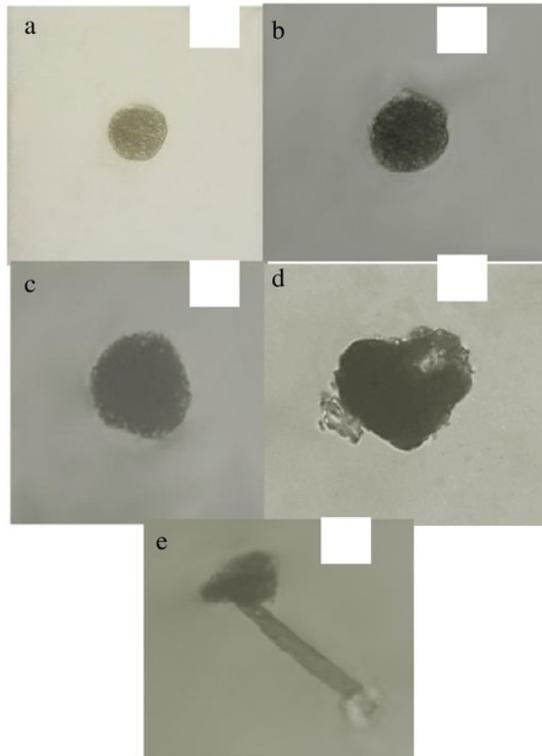
*Ket: T (pre treatment mannitol sebelum isolasi): T1 (0 hari), T2 (7 hari), T3 (14 hari), T4 (21 Hari)



Gambar 23. Karakteristik Mikrospora Embrionik Hasil Kultur Mikrospora *Ket: Lama Inkubasi kultur: D0 (Awal isolasi),D1 (30hari), D2 (60 hari), D3 (90hari)

Perkembangan mikrospora secara mikroskopis hingga menjadi embrio berbentuk *heart-shape* embrio berlangsung hingga 90 hari kultur. Pada bulan berikutnya yaitu inkubasi 120 hari sudah tampak bentuk *young torpedo shape*. Berdasarkan pengamatan selama penelitian berikut deskripsi gambar perkembangan mikrospora dari awal isolasi hingga 120 hari kultur:

a



Gambar 24. Bentuk Embrio pada isolasi kultur mikrospora tebu a. Globular Embrio; b. young heart-shape embryo, c, d. Heart-shape embryo, e. young torpedo embryo pada perbesaran 100x

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa prospek pengembangan teknik kultur mikrospora kedepannya sangat bagus karena variasi optimasi teknik kultur mikrospora pada tanaman tebu varietas BL efektif menginduksi mikrospora menghasilkan embrio dengan bentuk yang bervariasi diantaranya kalus, globular embrio, *heart-shape* embrio hingga *young torpedo shape*.

.

10

KESIMPULAN

Hasil pengembangan teknologi kultur mikrospora pada saat ini yaitu masih pada tahap embryogenesis mikrospora tebu. Untuk itu pengembangan penelitian kultur mikrospora terus digalakkan. Prospek kultur mikrospora ini sangat bagus dikembangkan kedepannya untuk memajukan budidaya tebu di Indonesia. diharapkan banyak peneliti yang berhasil mengembangkan teknik ini hingga menghasilkan tanaman utuh yang bisa dijadikan tetua galur murni haploid bagi tanaman tebu

DAFTAR PUSTAKA

- ¹² Ayed, O., Buysen, J., Picard, E., Trifa, Y dan Amara, H. 2010. *Effect of Pre-treatment on isolated microspore culture ability in durum wheat (Triticum turgidum subsp. Durum Desf.)*. Journal of Plant Breeding and Crop Science 2(2):30-38.
- ²³ Behera, K., Sahoo, S. 2009. *Rapid In Vitro Micropropagation of Sugarcane (Saccarum officinarum L.cv. Nayana)Trough Callus Culture*. Nature and Science 7 (4).
- Godheja, J., K, Sudhir., Shekhar., Modi, D. ²⁵ 2014. *The Standardization of Protocol For Large Production of Sugarcane (CO-86032) Through Microspore Propagation*. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences 4(4).
- ³² Indrawanto, C., Purwono, Siswanto, Syakir, M., Rumini, W. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Tebu*. Jakarta: Eska Media.
- Islam, S., Ara, I., Tuteja, N dan Subramaniam, S. ¹⁴ 2013. *Efficient Microspore Isolation Methods for High Yield Embryoids and Regeneration in Rice (Oryza sativa L.)*. International Journal of biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering (7)12.
- Kalashnikova, E., Chung, M., Solov'ev, A., Sheelukha, S. 2011. *Technology of In Vitro Production of Dihaploid Brassica Plants*. Russian Agriculture Sciences 37(1):4-7.
- ⁴ Mishra, V dan Goswami, R. 2014. *Haploid Production in Higher Plant*. IJCBS REVIEW PAPER 1(1).

National Center for Biotechnology Information. 2016. *Taxonomy of Saccharum Officinarum*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [diakses pada 25 Februari 2016]

4 Tarique, H., Mannan, M., Bhuiyan, m dan Rahaman, M. 2010. *Micropropagation of Sugarcane through leaf sheath culture*. *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 5(2):13-15

Rizal, R dan Rahmawati, D. 2015. 35 *Penetapan Kawasan Sentra Produksi Pengolahan Pertanian Berbasis Komoditas Unggulan di Kabupaten Jember*. [<http://digilib.its.ac.id>] diakses pada 24 Februari 2016.

Segui-Simaro, J dan 22 Nuez, F. 2008. *How microspore transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore derived embryogenesis*. *Physiologia Plantarum* 134: 1-12.

Shafrin, F., 27 Nath, U., Alam, M dan Akhter, D. 2010. *Development of Double Haploid Rapeseed Genotypes through Microspore Culture*. *Intl. J. BioRes.* 2(11): 07-10

4 Suaib, Woerjono, Mirzawan dan Indrianto, A. 2013. *Kultur Mikrospora, Alternatif, Peluang dan Prospek Perbaikan Genetik Pada Populasi Tanaman Tebu (Saccharum spp.)*. *Berkala Penelitian Agronomi* April 2013 Vol. 2 No. 1 Hal. 79 – 87.

9 Sukmadjaja, D dan Mulyana, A. 2011. *Regenerasi dan Pertumbuhan Beberapa Varietas Tebu (Saccharum officinarum L.) secara In Vitro*. *Jurnal AgroBiogen* 7(2):106-118).

Winarto dan Rachmawati. ³⁷ 2007. *TEKNIK KULTUR ANTHE PADA PEMULIAAN ANTHURIUM*. Jurnal Hortikultura 17 (2): 127-137

²¹ Yin, T., Tian, S., Luo, S., Chen, X., Wang, Y dan Shen, S. 2010. *Studies on isolated microspore embryoid induction of C. annum L*. Front. Agric. China 4(4):438-442.

GLOSARIUM

AERASI, ⁸ suatu proses penambahan udara/oksigen dalam air dengan membawa air dan udara ke dalam kontak yang dekat, dengan cara menyempotkan air ke udara (air ke dalam udara) atau dengan memberikan gelembung-gelembung halus udara dan membiarkannya naik melalui air (udara ke dalam air).

EMBRIO, tahap paling awal dari perkembangan setelah sel dibuahi

HIBRIDA, ¹⁵ generasi hasil persilangan antara dua atau lebih populasi yang berbeda, baik fenotipe maupun genotipenya. Pengertian ini dapat mencakup generasi langsung (dekat) hasil persilangan, ataupun generasi lanjut hasil segregasi dari persilangan tersebut.

KONVENSIONAL, ¹⁷ kegiatan penanaman yang masih menggunakan alat-alat yang masih sederhana seperti cangkul dan perkakas pertanian lainnya

MORFOLOGI, ¹⁷ ilmu yang mengkaji berbagai organ tumbuhan, baik bagian-bagian, bentuk maupun fungsinya.

MUTASI, ³⁰ perubahan yang terjadi pada bahagenetik (DNA maupun RNA), baik pada taraf urutanen (disebut mutasi titik) maupun pada taraf kromosom.

POACEAE, suku padi-padian dalam taksonomi tumbuhan

REKOMBINAN, ¹⁹ suatu bentuk DNA buatan yang dibuat dengan cara menggabungkan atau merekombinasi dua atau lebih untaian benang DNA yang dalam keadaan normal tidak berpasangan atau terjadi bersama.

VARIETAS, suatu peringkat taksonomi (tumbuhan) di bawah jenis/spesies

VIALIBILITAS, ³⁶ daya hidup benih yang ditunjukkan dengan gejala pertumbuhan atau gejala metabolisme

INDEKS BUKU

AERASI ,15;50
EMBRIO ,24;25;26
HIBRIDA , 24
KONVENSIONAL ,1;5;18
MORFOLOGI ,8; 9;11;13;14
MUTASI , 24
POACEAE , 3; 7
REKOMBINAN ,24
SUBTROPIS ,15
TROPIS ,3; 4; 15
VARIETAS ,1; 5; 6; 8
VIABILITAS, 33; 34; 43

T E N T A N G P E N U L I S

Buku ini ditulis oleh beberapa peneliti yang berkolaborasi untuk mengembangkan teknik kultur mikrospora di Indonesia. Para peneliti telah memulai riset kultur mikrospora sejak tahun 2011. Berlanjut dengan adanya Kerjasama penelitian antar perguruan tinggi selama dua tahun 2017-2018 membuat para peneliti berkomitmen untuk mengembangkan teknik kultur mikrospora di Indonesia. Berdasarkan komitmen tersebut, terbitlah buku “Teknik Kultur Mikrospora Tebu- Prospek dan Pengembangan di Indonesia”. Latar belakang penulis terdiri atas perpaduan dari beberapa bidang ilmu yang berbeda. Berikut sekilas cv penulis buku ini:

1. Septarini Dian Anitasari, S.Si., M.Si

NIDN : 0728098703

Tempat dan Tanggal : Jember, 28 September 1987

Lahir

Riwayat Pendidikan : S1 Universitas Jember
S2 Universitas Udayana

E-mail : septarinidian@yahoo.co.id

Alamat Kantor : Jalan Jawa 10 Jember

Mata Kuliah yang : Biologi dasar

Diampu : Anatomi Tumbuhan
Fisiologi Tumbuhan

.

2. ⁴⁶ Dwi Nur Rikhma Sari, S.Si., M.Si

NIDN : 0712098602
Tempat dan Tanggal Lahir : Lumajang, 12 September 1986
Riwayat Pendidikan : S1 Universitas Airlangga
S2 Universitas Airlangga
E-mail : dnrs129_dinnurrisa@yahoo.com
Nomor Telepon/Hp : 081553786620 / 085649609186
Alamat Kantor : Jalan Jawa No. 10 Jember
Mata Kuliah yang Diampu : Biologi Sel
Mikrobiologi
Statistika

3. Ir. Ida Ayu Astarini, MSc. PhD

NIDN : 0027036809
Tempat dan Tanggal Lahir : Denpasar, 27 Maret 1968
Riwayat Pendidikan : S1 Institut Pertanian Bogor
³⁴ S2 The University of
Western Australia
S3 The University of
Western Australia
Alamat e-mail : idaastarini@yahoo.com
Alamat Kantor : Jurusan Biologi, FMIPA,
Kampus Bukit Jimbaran,
Bali, 703137
Mata Kuliah yang Diampu : Kultur Jaringan Tumbuhan

Pemuliaan Tanaman
Hortikultura
Genetika Tumbuhan
Bioteknologi Lanjut
Ekoturisme
Metodologi Penelitian

4. Dr. Ir. Made Ria Defiani, MSc.(Hons).

NIDN : 0020086608

Tempat dan Tanggal Lahir : Denpasar, 20 Agustus 1966

Riwayat Pendidikan : S1 Institut Pertanian Bogor
S2 University of Western
Sydney , NSW,Australia
S3 Universitas Udayana

Alamat Kantor : Jurusan Biologi, FMIPA,
Kampus Bukit Jimbaran,
Bali, 703137

Alamat e-mail : defiani_ria@yahoo.com

Mata Kuliah yg Diampu : Kultur Jaringan Tumbuhan
Fisiologi tumbuhan
Hortikultura
Fitohormon

•

ARTIKEL

ORIGINALITY REPORT

19%

SIMILARITY INDEX

18%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

11%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	media.neliti.com Internet Source	3%
2	www.slideshare.net Internet Source	2%
3	www.scribd.com Internet Source	1%
4	www.isisn.org Internet Source	1%
5	romisibuak.blogspot.com Internet Source	1%
6	text-id.123dok.com Internet Source	1%
7	anzdoc.com Internet Source	1%
8	e-journal.uajy.ac.id Internet Source	1%
9	Submitted to Sriwijaya University Student Paper	<1%

10	repository.unair.ac.id Internet Source	<1%
11	putratani.com Internet Source	<1%
12	www.msmbb.org.my Internet Source	<1%
13	e-journal.biologi.lipi.go.id Internet Source	<1%
14	core.ac.uk Internet Source	<1%
15	tristansutrisman.blogspot.com Internet Source	<1%
16	aguskrisnoblog.wordpress.com Internet Source	<1%
17	es.scribd.com Internet Source	<1%
18	docplayer.info Internet Source	<1%
19	catatantentangbiologi.blogspot.com Internet Source	<1%
20	repository.usu.ac.id Internet Source	<1%
21	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Student Paper	<1%

22	d-nb.info Internet Source	<1%
23	Submitted to CONACYT Student Paper	<1%
24	docobook.com Internet Source	<1%
25	Submitted to Zambia Centre for Accountancy Studies Student Paper	<1%
26	ronyastrajingga.blogspot.com Internet Source	<1%
27	sau.ac.bd Internet Source	<1%
28	tissuecultureandorchidologi.blogspot.com Internet Source	<1%
29	id.123dok.com Internet Source	<1%
30	documents.mx Internet Source	<1%
31	biologi.fst.unair.ac.id Internet Source	<1%
32	journal.ipb.ac.id Internet Source	<1%

33

Submitted to Universitas Muria Kudus

Student Paper

<1%

34

Submitted to Universitas Islam Indonesia

Student Paper

<1%

35

adoc.tips

Internet Source

<1%

36

putrikusumaningdewi14.blogspot.com

Internet Source

<1%

37

Submitted to Universitas Jenderal Soedirman

Student Paper

<1%

38

Submitted to Universitas Muhammadiyah
Ponorogo

Student Paper

<1%

39

Submitted to Universitas Diponegoro

Student Paper

<1%

40

de.slideshare.net

Internet Source

<1%

41

repository.politanipyk.ac.id

Internet Source

<1%

42

eprints.umm.ac.id

Internet Source

<1%

43

Submitted to Universitas Muhammadiyah
Sumatera Utara

Student Paper

<1%

44

jualwalatrazedoril7.com

Internet Source

<1%

45

lipi.go.id

Internet Source

<1%

46

ikipjember.ac.id

Internet Source

<1%

47

Submitted to Universitas Jenderal Achmad Yani

Student Paper

<1%

48

peripi.org

Internet Source

<1%

49

eprints.umpo.ac.id

Internet Source

<1%

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On