

IV. HASIL ANALISIS DAN PEMBAHASAN

A. Persentase Eksplan Hidup, Kontaminasi, dan Mati

Keberhasilan penelitian kultur *in vitro* dapat dipengaruhi oleh persentase eksplan hidup, persentase eksplan kontaminasi, dan persentase eksplan mati. Eksplan dapat mengalami kontaminasi akibat bakteri dan jamur. Eksplan juga dapat mengalami kematian karena terkena stres mekanik atau akibat dari pengaruh penggunaan bahan-bahan kimia dan lama perendaman yang digunakan saat tahapan sterilisasi. Eksplan hidup ditandai dengan eksplan yang berwarna hijau dan tumbuh pada media MS dengan penambahan ZPT pada berbagai konsentrasi.

1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Persentase eksplan hidup menunjukkan jumlah total eksplan yang hidup, memiliki daya tumbuh, tidak terkontaminasi dan tidak mengalami kematian lebih dari separuh eksplan pada media. Hasil pengamatan dari pengaruh BAP dan NAA terhadap rata-rata persentase eksplan hidup disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh BAP dan NAA terhadap Rata-rata Persentase Eksplan Hidup Tunas Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) pada Minggu Ke-4

Perlakuan	Persentase Eksplan Hidup (%)
BAP 0 mg/l + NAA 0 mg/l	20
BAP 1 mg/l + NAA 0,1 mg/l	20
BAP 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l	30
BAP 2 mg/l + NAA 0,1 mg/l	30
BAP 2 mg/l + NAA 0,5 mg/l	20
BAP 3 mg/l + NAA 0,1 mg/l	30
BAP 3 mg/l + NAA 0,5 mg/l	30
Rata-rata	25,71

Tujuan pengamatan persentase eksplan hidup adalah untuk mengetahui jumlah eksplan yang dapat tumbuh pada media dan perlakuan yang diberikan. Faktor utama yang mempengaruhi persentase hidup eksplan adalah jumlah kontaminasi baik berupa bakteri maupun jamur, jumlah eksplan yang mati, serta komposisi media dan pengaruh dari ZPT. Hal ini sesuai dengan pendapat Zulkarnain (2009) dalam Rahman (2010) bahwa mikroorganisme kontaminan akan tumbuh cepat pada medium yang kaya hara dan dalam waktu yang singkat akan menutupi permukaan medium serta eksplan yang ditanam, selanjutnya mikroorganisme tersebut akan menyerang eksplan melalui luka akibat pemotongan dan terjadinya kompetisi antara eksplan dan kontaminan sehingga menyebabkan kematian eksplan. Gambar eksplan hidup disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Eksplan Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) Saat Berumur 4 Minggu

Berdasarkan Tabel 3, diketahui bahwa persentase hidup eksplan pada semua perlakuan sebesar 20 - 30%, sehingga bisa dikatakan persentasenya rendah karena di bawah 50%. Kontaminasi yang terjadi diduga berasal dari sumber eksplan yang diambil langsung dari lapangan, sehingga jamur sudah

masuk dalam jaringan tanaman, walaupun telah disterilisasi eksplan tetap mengalami kontaminasi karena sterilisasi yang dilakukan hanya sterilisasi permukaan. Pada permukaan kulit pohon bambu petung terdapat rambut-rambut halus dan terdapat lapisan lilin sehingga masih ada jamur ataupun bakteri yang tertinggal dalam eksplan. Wetherell (1982) mengemukakan bahwa pada permukaan tanaman biasanya terdapat kutikula dan berlapis lilin yang berfungsi melindungi jaringan bagian dalam tanaman terhadap desinfektan yang kuat. Persentase hidup yang rendah tidak hanya disebabkan oleh persentase kontaminasi, tetapi juga disebabkan oleh persentase mati yang terjadi pada eksplan.

2. Persentase Eksplan Terkontaminasi (%)

Persentase eksplan terkontaminasi menunjukkan tingkat kontaminasi yang terjadi pada eksplan yang ditanam. Penyebab terjadinya kontaminasi adalah jamur dan bakteri. Keberadaan koloni-koloni bakteri atau spora jamur dalam media dan eksplan dapat mengakibatkan gangguan pertumbuhan sampai kematian pada eksplan yang ditanam secara *in vitro*. Ciri-ciri eksplan atau media yang mengalami kontaminasi bakteri adalah terdapatnya lendir di sekitar eksplan atau pada media. Apabila sumber kontaminasi berasal dari jamur maka akan ditemukan hifa-hifa jamur pada eksplan atau media. Hasil pengamatan dari pengaruh BAP dan NAA terhadap rata-rata persentase eksplan kontaminasi disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh BAP dan NAA terhadap Rata-rata Persentase Eksplan Kontaminasi Tunas Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) pada Minggu Ke-4.

Perlakuan	Persentase Eksplan Kontaminasi (%)
BAP 0 mg/l + NAA 0 mg/l	70
BAP 1 mg/l + NAA 0,1 mg/l	60
BAP 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l	70
BAP 2 mg/l + NAA 0,1 mg/l	20
BAP 2 mg/l + NAA 0,5 mg/l	50
BAP 3 mg/l + NAA 0,1 mg/l	50
BAP 3 mg/l + NAA 0,5 mg/l	40
Rata-rata	51,42

Berdasarkan Tabel 4, diketahui bahwa persentase eksplan terkontaminasi pada semua perlakuan sebesar 20 – 70%. Hasil rata-rata eksplan terkontaminasi dari semua perlakuan yaitu sebesar 51,42%. Data pengamatan kontaminasi eksplan nodus bambu petung sebagian besar kontaminasi disebabkan oleh jamur. Jamur terdapat di ruas cabang bambu petung tempat tumbuhnya tunas yang tersembunyi sehingga sulit untuk dihilangkan. Jamur membentuk miselium berwarna putih tetapi tidak berlendir. Semakin lama, miselium tersebut akan menutupi permukaan media dan eksplan sehingga dapat mengakibatkan kematian pada eksplan. Kontaminasi jamur ini rata-rata muncul pada hari ke-3 setelah tanam. Kontaminasi yang terjadi diduga berasal dari sumber eksplan yang diambil langsung dari lapangan, sehingga kontaminan sudah masuk dalam jaringan tanaman. Terjadinya kontaminasi disebabkan oleh kontaminan yang masih terdapat di dalam jaringan eksplan yang digunakan walaupun telah dilakukan sterilisasi, hal ini dikarenakan pada permukaan kulit bambu petung terdapat

rambut-rambut halus dan terdapat lapisan lilin sehingga masih ada jamur ataupun bakteri yang tertinggal dalam eksplan. Dengan adanya medium dan lingkungan yang cocok menyebabkan sumber kontaminan yang berupa jamur berkembang dengan cepat.

Kontaminasi juga disebabkan oleh bakteri, menurut Pierik (1987) selain kontaminan yang berada di permukaan, pada beberapa jenis tanaman ditemukan juga kontaminan yang berasal dari dalam jaringan tanaman terutama bakteri dengan ukuran yang sangat kecil, bakteri mudah masuk dalam jaringan tanaman. Bakteri ini mula-mula akan tampak pada bagian dasar eksplan membentuk lingkaran putih, kotor dan tampak berlendir. Bakteri ini kemudian berkembang di sekitar eksplan dan dapat menutupi seluruh permukaan media dan eksplan. Eksplan yang terkontaminasi disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Eksplan Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) yang Terkontaminasi Bakteri dan Jamur

3. Persentase Eksplan Mati (%)

Persentase eksplan mati menunjukkan jumlah total eksplan yang mengalami kematian dan kriteria eksplan yang mati apabila eksplan berwarna coklat bahkan kehitaman dan tidak mengalami pertumbuhan. Pencoklatan pada kultur *in vitro* terjadi akibat adanya jaringan tanaman terkena stres mekanik, seperti pelukaan saat isolasi eksplan dari tanaman induk atau proses sterilisasi merangsang pembentukan senyawa fenol yang teroksidasi akan bersifat toksik sehingga menghambat pertumbuhan bahkan kematian eksplan (Yusnita, 2003).

Penyebab lain kematian pada eksplan dapat dikarenakan saat proses sterilisasi yang menggunakan bahan-bahan kimia dan lama waktu perendaman yang bisa menyebabkan jaringan eksplan menjadi mati sehingga saat ditanam tidak mengalami pertumbuhan. Hasil pengamatan dari pengaruh BAP dan NAA terhadap rata-rata persentase eksplan mati disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Pengaruh BAP dan NAA terhadap Rata-rata Persentase Eksplan Mati Tunas Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) pada Minggu Ke-4

Perlakuan	Persentase Eksplan Mati (%)
BAP 0 mg/l + NAA 0 mg/l	10
BAP 1 mg/l + NAA 0,1 mg/l	20
BAP 1 mg/l + NAA 0,5 mg/l	0
BAP 2 mg/l + NAA 0,1 mg/l	50
BAP 2 mg/l + NAA 0,5 mg/l	30
BAP 3 mg/l + NAA 0,1 mg/l	20
BAP 3 mg/l + NAA 0,5 mg/l	30
Rerata	22,85

Berdasarkan Tabel 5 diketahui bahwa rata-rata persentase eksplan mati pada semua perlakuan yaitu 0 – 50%. Rata-rata persentase eksplan mati pada semua perlakuan mempunyai persentase sebesar 22,85%. Terjadinya kematian pada eksplan bambu petung ini diduga disebabkan oleh penggunaan bahan sterilan dan lama perendaman eksplan dalam sterilan tersebut. Saat tahapan sterilisasi di dalam LAF, eksplan direndam dalam HgCl₂ 0,01% 10 menit + aquades 5 menit kemudian NaClO 20% 7 menit + aquades 5 menit, dilanjutkan NaClO 10% 7 menit + aquades 5 menit, dan NaClO 5% 7 menit + aquades 5 menit.

Penggunaan HgCl₂ ini menyebabkan eksplan berwarna kecoklatan bahkan kehitaman sehingga akan menyebabkan kematian pada eksplan. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Suratman dkk. (2013) bahwa perlakuan sterilisasi eksplan tunas aksiler dari tanaman sirsak dengan yang menggunakan HgCl₂ 0,1 % menghasilkan eksplan yang berwarna hijau kehitaman dan mengkerut. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa keberadaan bahan sterilisasi berpengaruh terhadap warna dan tekstur eksplan. Perendaman eksplan yang lebih lama pada HgCl₂ akan menyebabkan kerusakan pada eksplan yang tidak dapat kembali seperti semula (*irreversible*). Hal ini disebabkan HgCl₂ akan lebih bersifat toksik terhadap eksplan jika diberikan dalam konsentrasi yang lebih besar dan waktu perendaman yang lebih lama sehingga menyebabkan eksplan mengalami pencoklatan (*browning*) bahkan dapat menyebabkan eksplan mengalami kematian (Farooq dkk., 2002).

Penggunaan NaClO (larutan pemutih) yang berulang-ulang juga dapat mengubah warna dan tekstur eksplan. Menurut Rismayani dan Hamzah (2010)

apabila eksplan direndam dalam NaClO dengan konsentrasi tinggi maka permukaannya bisa menjadi memar atau mencoklat. Semakin tinggi konsentrasi NaClO yang digunakan maka semakin luas permukaan eksplan yang mengalami pencoklatan dan semakin banyak jumlah eksplan yang mengalami pencoklatan bahkan kematian. Gambar eksplan yang mengalami kematian disajikan dalam Gambar 6.



Gambar 6. Eksplan Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) yang Mengalami Kematian

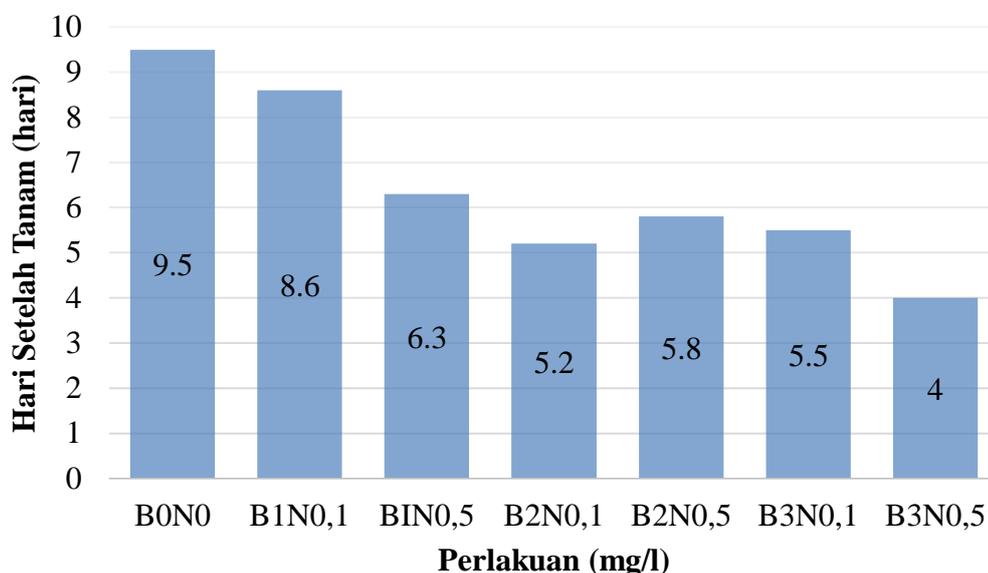
B. Induksi Tunas Dengan Perlakuan ZPT

Induksi tunas merupakan usaha untuk menghasilkan tanaman baru yang berasal dari eksplan yang kita tanam secara *in vitro*. Pada penelitian ini induksi tunas bambu petung dilakukan dengan menggunakan media MS yang diberi berbagai perlakuan zat pengatur tumbuh BAP dan NAA.

1. Waktu Munculnya Tunas (hari)

Saat kemunculan tunas merupakan salah satu faktor penting di dalam perbanyakan tanaman dengan metode kultur jaringan. Saat eksplan bertunas adalah waktu yang dibutuhkan eksplan untuk bertunas dan dinyatakan dalam

satuan hari. Tunas yang terbentuk merupakan hasil diferensiasi dari eksplan. Pengaruh BAP dan NAA terhadap waktu munculnya tunas pada semua perlakuan disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Histogram Waktu Munculnya Tunas Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) pada Semua Perlakuan

Berdasarkan gambar di atas dapat diketahui bahwa perlakuan BAP 3 mg/l dan NAA 0,5 mg/l menghasilkan kemunculan tunas yang paling cepat yaitu 4 HST. Sementara perlakuan yang paling lambat kemunculan tunasnya yaitu BAP 0 mg/l + NAA 0 mg/l yaitu (9,5 HST). BAP merupakan salah satu zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan untuk memacu pembentukan tunas dengan daya aktivitas yang kuat, mendorong proses pembelahan sel (George dan Sherrington, 1984).

Menurut Gunawan (1995) bahwa pemberian sitokinin yang optimal menyebabkan sitokinin dapat bekerja secara maksimal dan menjadi lebih aktif dalam meningkatkan gula reduksi, apabila kandungan gula reduksi dalam eksplan

meningkat maka potensial osmotik sel lebih cepat menurun dan menyebabkan air diserap lebih banyak dan tekanan turgor meningkat sehingga sel-sel dapat membesar dan akhirnya tunas dapat membuka.

2. Jumlah Tunas

Jumlah tunas memperlihatkan banyaknya tunas yang tumbuh pada eksplan dari setiap perlakuan. Jumlah tunas dapat diindikasikan sebagai keberhasilan dalam multiplikasi di dalam kultur jaringan. Semakin banyak tunas yang terbentuk maka semakin tinggi tingkat multiplikasinya. Pengamatan jumlah tunas dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh antar perlakuan yang diberikan terhadap jumlah tunas. Hasil analisis pengaruh BAP dan NAA terhadap jumlah tunas bambu petung setelah inokulasi disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Pengaruh BAP dan NAA terhadap Jumlah Tunas Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) pada Minggu Ke-4 Setelah Tanam

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)		Rerata
	0,1	0,5	
1	2,00	1,66	1,80a
2	1,33	1,50	1,40a
3	2,33	1,66	2,00a
Rata-rata	1,87a	1,62a	(-)
Perlakuan vs kontrol			
Perlakuan		1,66p	
Kontrol		1,00p	

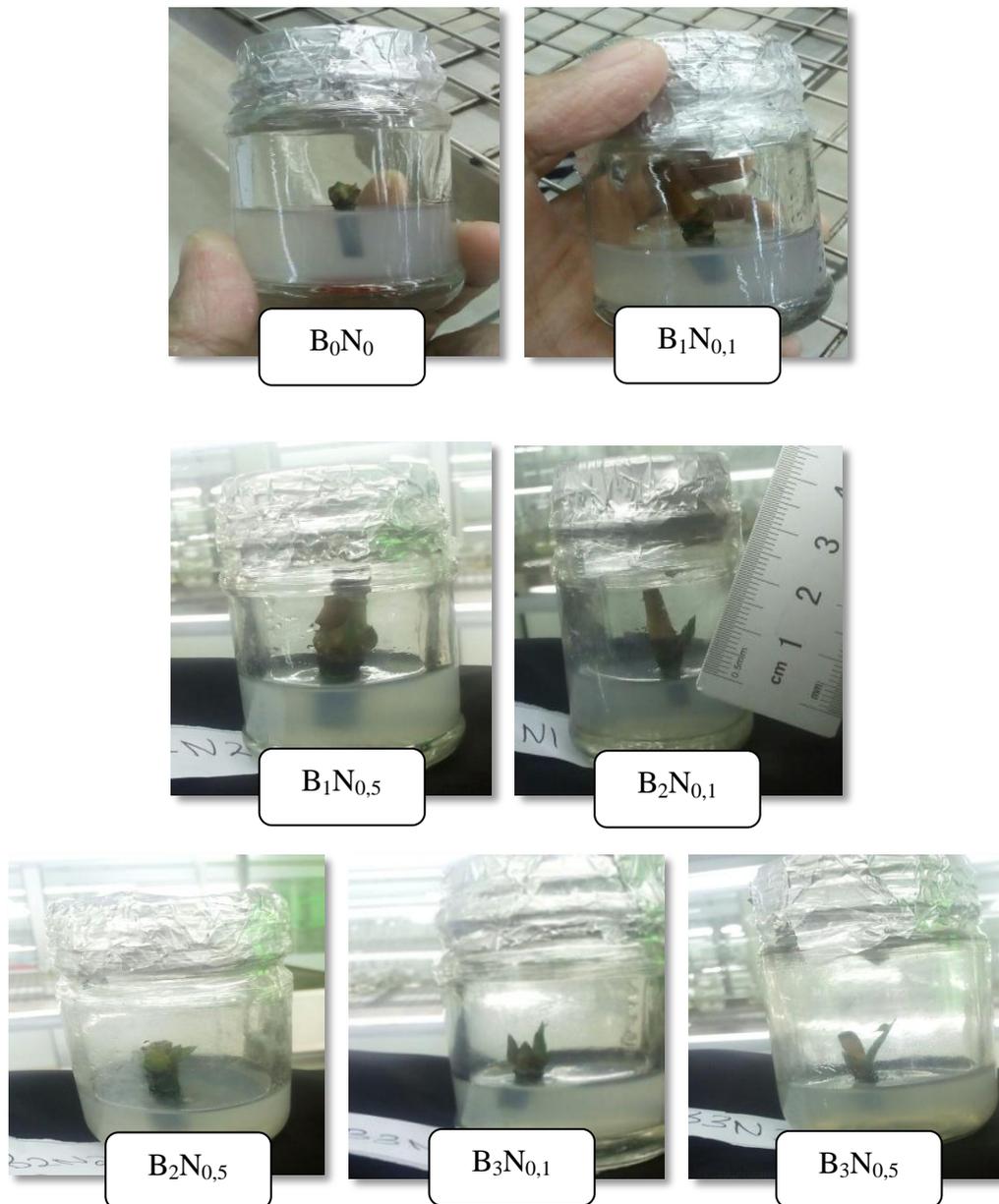
Keterangan: Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom atau baris menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kesalahan $\alpha=5\%$.
 (-) tidak ada interaksi antara perlakuan penggunaan BAP dan konsentrasi NAA terhadap jumlah tunas.

Hasil sidik ragam (Lampiran 4) dan Tabel 6 menunjukkan bahwa setiap perlakuan yang diujikan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah tunas

pada eksplan. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan berbagai konsentrasi BAP dan NAA tidak ada saling interaksi dan tidak ada pengaruh terhadap jumlah tunas pada eksplan bambu petung yang dihasilkan selama 4 MST.

Berdasarkan Tabel 6 dapat diketahui bahwa tidak ada beda nyata antar perlakuan BAP 1, 2, dan 3 mg/l pada eksplan bambu petung selama 4 MST. Penggunaan NAA dengan konsentrasi 0,1 dan 0,5 mg/l juga menunjukkan tidak ada pengaruh nyata terhadap jumlah tunas antar perlakuan pada eksplan bambu petung yang dihasilkan selama 4 MST. Hal tersebut diduga bahwa pada semua perlakuan mampu mendorong pertumbuhan dan pembentukan tunas. Walaupun tidak ada beda nyata antar perlakuan dan kontrol tetapi perlakuan penambahan BAP dan NAA ke dalam media cenderung menghasilkan rata-rata jumlah tunas (1,66 tunas), dibandingkan dengan kontrol yang hanya menghasilkan rata-rata jumlah tunas (1,00).

Menurut Katuuk (1989) bahwa pertumbuhan dan perkembangan eksplan untuk membentuk tunas ditentukan oleh konsentrasi antara sitokinin dan auksin yang tepat. Konsentrasi auksin yang lebih rendah daripada sitokinin akan mempercepat pembentukan tunas. Pemberian sitokinin tinggi mempengaruhi eksplan melakukan multiplikasi melalui perkembangan sel sehingga menghasilkan tunas-tunas baru, seperti yang dikemukakan oleh Wetherell (1982) bahwa sitokinin berperan dalam merangsang pembelahan sel dan pertumbuhan tunas. Gambar jumlah tunas disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Jumlah Tunas Eksplan Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) Saat Berumur 4 Minggu

3. Tinggi Tunas (cm)

Tinggi tunas dianggap sebagai indikator pertumbuhan bagi tanaman maupun sebagai parameter untuk mengukur pengaruh lingkungan atau perlakuan yang diberikan. Tinggi tunas diamati dari awal munculnya tunas sampai titik

tumbuh dan dilakukan pengamatan seminggu sekali selama 4 minggu. Hasil analisis pengaruh BAP dan NAA terhadap tinggi tunas bambu petung (cm) terhadap tinggi tunas bambu petung disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Pengaruh BAP dan NAA Terhadap Tinggi Tunas (cm) Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) pada Minggu Ke-4 Setelah Tanam

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)		Rerata
	0,1	0,5	
1	0,60c	0,86bc	0,76
2	1,43ab	0,500c	1,06
3	0,93bc	2,16a	1,55
Rata-rata	1,03	1,26	(+)
Perlakuan vs kontrol			
Perlakuan			1,08p
Kontrol			0,55q

Keterangan: Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom atau baris menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kesalahan $\alpha=5\%$. (+) ada interaksi antara perlakuan penggunaan BAP dan konsentrasi NAA terhadap panjang tunas.

Hasil analisis pada Tabel 7 menunjukkan pengaruh kombinasi perlakuan BAP dan NAA terdapat beda nyata terhadap tinggi tunas, sehingga ada interaksi antara penambahan BAP dan NAA terhadap tinggi tunas eksplan bambu petung. Jika melihat dari nilai rata-rata pada Tabel 7 kombinasi perlakuan antara BAP 3 mg/l + NAA 0,5 mg/l memberikan hasil tinggi tunas tertinggi yaitu (2,16 cm) tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan BAP 2 mg/l + NAA 0,1 mg/l. Tinggi tunas terjadi sebagai akibat dari pembesaran sel yang dipacu oleh NAA sehingga pembesaran sel terjadi lebih cepat. NAA berperan dalam memacu peningkatan kerja sel dan pembesaran sel, hal ini berkaitan dengan pengaruh fisiologi auksin yaitu untuk perpanjangan sel dan pembesaran jaringan (Pierik, 1987). Mekanisme kerja auksin adalah dengan menginisiasi pemanjangan sel dan juga memacu

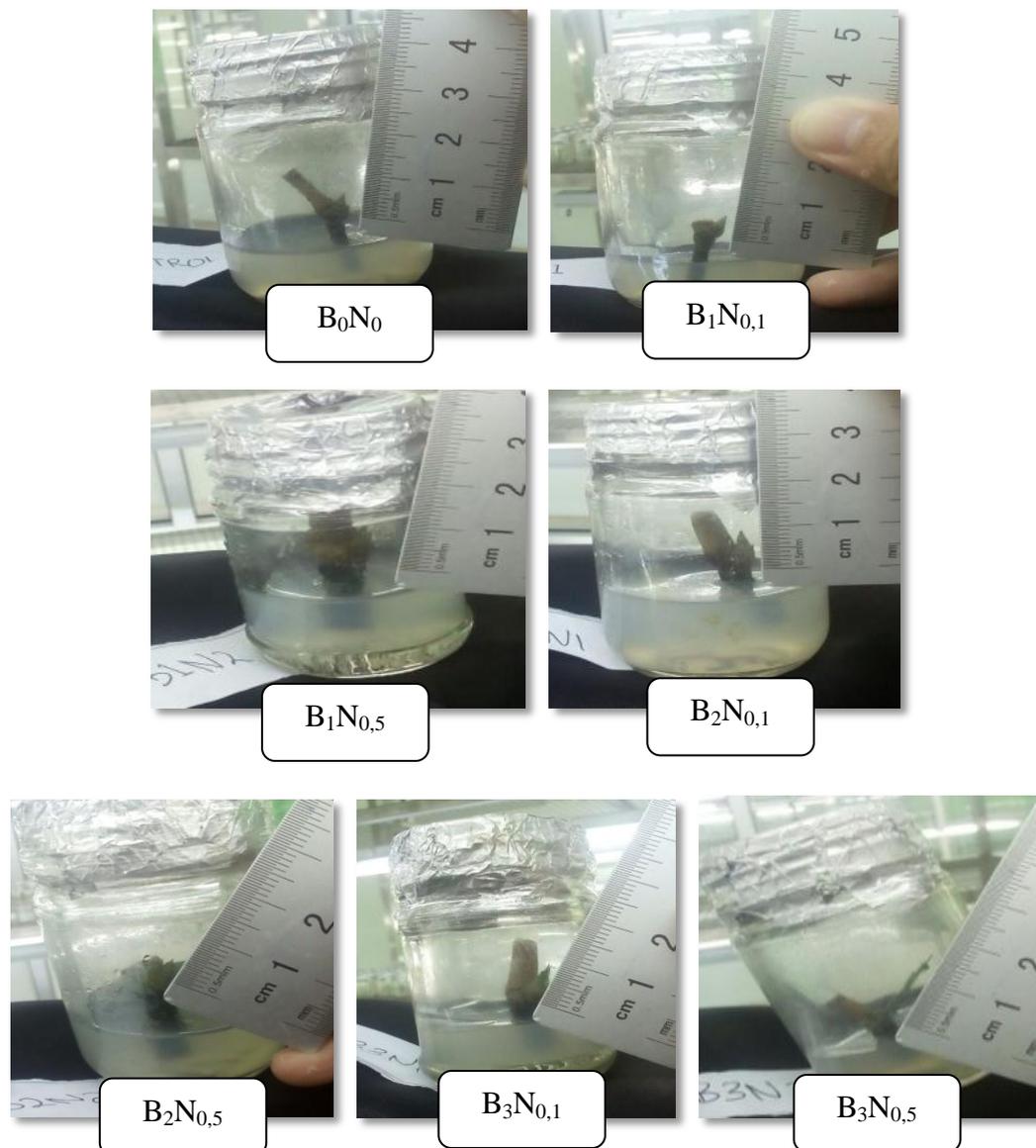
protein tertentu yang ada di membran plasma sel tumbuhan untuk memompa ion H^+ ke dinding sel. Ion H^+ mengaktifkan enzim tertentu sehingga memutuskan beberapa ikatan silang hidrogen rantai molekul selulosa penyusun dinding sel. Sel tumbuhan kemudian memanjang akibat air yang masuk secara osmosis (Fahmi, 2014).

Pembelahan sel dimulai setelah adanya auksin yang mempengaruhi sintesis protein dan mitosis, seterusnya pembesaran sel akan berlangsung dengan bantuan hormon sitokinin yang akhirnya dapat menambah pemanjangan tunas. George dan Sherrington (1984) menyatakan bahwa inisiasi tunas dan akar ditentukan oleh konsentrasi sitokinin dan auksin yang diberikan ke dalam media dan interaksinya dengan sitokinin atau auksin endogen yang dikandung oleh eksplan.

Hasil kontras menunjukkan pengaruh perlakuan kombinasi BAP dan NAA dengan kontrol terdapat beda nyata, hal itu disebabkan tidak adanya penambahan hormon sitokinin dan auksin ke dalam media sehingga mengakibatkan pertumbuhan tunasnya lebih pendek dibandingkan dengan perlakuan kombinasi BAP dan NAA.

Pada perlakuan BAP 3 mg/l + NAA 0,5 mg/l menghasilkan tinggi tunas yang lebih tinggi. Pada perlakuan ini tinggi tunas yang dihasilkan berkaitan dengan jumlah tunas yang terbentuk. Jumlah tunas yang terbentuk pada perlakuan ini cenderung lebih sedikit, diduga persaingan dalam memanfaatkan unsur hara yang diserap untuk memacu pertumbuhan tinggi tunas. Hal ini sesuai dengan pendapat Lisan (2005) bahwa perbedaan tinggi tunas disebabkan unsur-unsur hara

dan vitamin yang terdapat pada media terbagi untuk tunas-tunas yang tumbuh sehingga jumlah tunas yang banyak menyebabkan tinggi tunas terhambat. Selain itu, pembentukan tunas dapat terjadi karena adanya aktivitas pembelahan sel oleh sitokinin. Tinggi tunas eksplan bambu petung (*Dendrocalamus asper*) disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Tinggi Tunas Eksplan Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) Saat Berumur 4 Minggu

Pada perlakuan BAP 3 mg/l + NAA 0,5 mg/l juga terdapat daun yang membuka di ujung tunas. Daun yang membuka hanya satu pada setiap eksplan. Pada awal pertumbuhan tanaman daun belum aktif berfotosintesis. Daun baru aktif berfotosintesis pada fase perkembangan selanjutnya dan memiliki peranan penting dalam proses pertumbuhan selama akar belum muncul. Daun menggantikan peran akar dalam menyerap mineral yang dibutuhkan untuk proses pertumbuhan (Sitompul dan Guritno, 1995). Penambahan BAP memacu pertumbuhan, pembelahan sel, morfogenesis, dan pembentukan klorofil (Katuuk, 1989). Namun penelitian ini belum mendapatkan hasil terbaik dari masing-masing perlakuan, hal ini disebabkan karena waktu pengamatan yang cukup singkat yaitu 4 minggu sehingga belum mendapatkan pertumbuhan yang signifikan dari masing-masing perlakuan. Gambar yang menunjukkan membukanya daun pada eksplan setelah berumur 4 minggu disajikan pada Gambar 10.



Gambar 10. Daun yang Membuka pada Eksplan Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*) Setelah Berumur 4 Minggu