

IV. HASIL ANALISIS DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan suatu penelitian kultur *in vitro* dipengaruhi oleh eksplan yang hidup, terkontaminasi dan eksplan *Browning*. Gejala kontaminasi yang timbul dapat dicirikan dengan adanya koloni-koloni bakteri maupun spora jamur pada permukaan medium atau permukaan eksplan dengan warna putih abu-abu atau kehitaman dan berwarna merah muda. Kontaminasi jamur umumnya baru terlihat pada 1-2 minggu setelah tanam (MST). Pengamatan kontaminasi eksplan meliputi kontaminasi bakteri dan jamur, sedangkan eksplan *Browning* yaitu terjadinya pencoklatan pada eksplan dipengaruhi oleh senyawa fenol yang dikeluarkan oleh eksplan. Jumlah eksplan yang hidup dicirikan eksplan berwarna hijau atau terbentuknya kalus maupun tunas. Hasil pengamatan terhadap persentase eksplan hidup, kontaminasi dan *Browning* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Air Rebusan Kentang, BAP dan NAA terhadap Persentase Eksplan Hidup, Kontaminasi, *Browning*, *Recovery* dan Eksplan Mati Tanaman Jati Emas pada minggu ke-8.

Perlakuan	Persentase Hidup (%)	Persentase Kontaminasi (%)	Persentase <i>Browning</i> (%)	Persentase <i>Recovery</i> (%)	Persentase Mati (%)
A	80	10	60	50	10
B	100	0	50	50	0
C	90	10	30	30	0
D	90	0	40	30	10
E	100	0	30	30	0

Keterangan:

A = BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l

B = BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l

C = BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l

D = BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l

E = BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l

A. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup merupakan kemampuan suatu eksplan untuk tumbuh dan berkembang dalam kultur *in vitro*. Persentase eksplan hidup dapat dipengaruhi oleh persentase eksplan kontaminasi dan *Browning*, tujuan pengamatan persentase eksplan hidup adalah untuk mengetahui seberapa besar pengaruh sterilisasi eksplan yang digunakan dalam penelitian.

Hasil pengamatan pada tabel 1 menunjukkan pada perlakuan BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l dan BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l, persentase eksplan hidup mencapai 100%. Hal tersebut diikuti dengan jumlah persentase eksplan hidup pada perlakuan BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l dan BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l mencapai 90%, sementara persentase eksplan hidup terendah pada perlakuan BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l sebesar 80 %. Hasil pengamatan jika lebih dari 50 % persentase eksplan hidup dinyatakan tinggi, hal ini dapat dilihat bahwa dari semua perlakuan menunjukkan persentase eksplan hidup tinggi mencapai 80 % - 100%.

Tingginya persentase eksplan hidup dikarenakan eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan yang steril dari hasil penelitian sebelumnya, sehingga tingkat kontaminasi terhadap eksplan rendah, selain itu penggunaan zat pengatur tumbuh juga dapat mempengaruhi persentase hidup. Hal ini didukung hasil penelitian Triwari *et al.*, (2002) dengan penggunaan BAP terhadap persentase hidup eksplan Jati dengan perlakuan BAP 22,2 μm mencapai 76,8 %. Tingginya persentase eksplan hidup juga disebabkan oleh komposisi zat dalam medium telah cocok untuk menyokong kehidupan eksplan. Abidin (1993)

menyatakan bahwa kemampuan hidup eksplan pada kultur *in vitro* sangat tergantung dari eksplan itu sendiri, jenis dan komposisi medium sangat mempengaruhi besarnya daya tahan eksplan untuk hidup pada medium tersebut. Selain itu diduga penggunaan medium WPM untuk induksi tunas Jati Emas mampu memberikan persentase eksplan hidup yang cukup tinggi, dikarenakan medium WPM secara umum biasa digunakan dalam kultur *in vitro* pada berbagai jenis tanaman berkayu. Menurut Pardal *et al.* (2004) medium WPM banyak digunakan pada berbagai spesies tanaman berkayu, karena memiliki kandungan total ion yang rendah, tetapi kandungan sulfatnya tinggi. Unsur makro yang terdapat pada medium WPM seperti unsur magnesium yang tinggi sangat mendukung dalam pertumbuhan *in vitro* tanaman. Wetherell (1982) juga menyatakan di dalam medium terkandung mineral, gula, vitamin dan hormon dengan perbandingan yang dibutuhkan secara tepat.

Kultur *in vitro* merupakan budidaya secara heterotrof, dimana sel tidak dapat melakukan fotosintesis untuk menghasilkan karbon seperti halnya tanaman autotrof, sehingga sumber karbon harus diperoleh dalam bentuk karbohidrat yang ditambahkan dari luar, sehingga gula merupakan sumber karbon. Jika tidak ada sukrosa, maka aktivitas dan pertumbuhan kalus tidak dapat berlangsung dan pada akhirnya sel-sel tersebut akan mati, karena tidak ada sumber energi (Campbell *et al.*, 2003). Hasil pengamatan terhadap persentase eksplan hidup yang diamati selama 8 minggu, persentase eksplan hidup minggu 1 dan 2 pada semua perlakuan menunjukkan persentase eksplan hidup mencapai 100%, tetapi pada minggu ke-3 terjadi penurunan yaitu pada perlakuan BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100

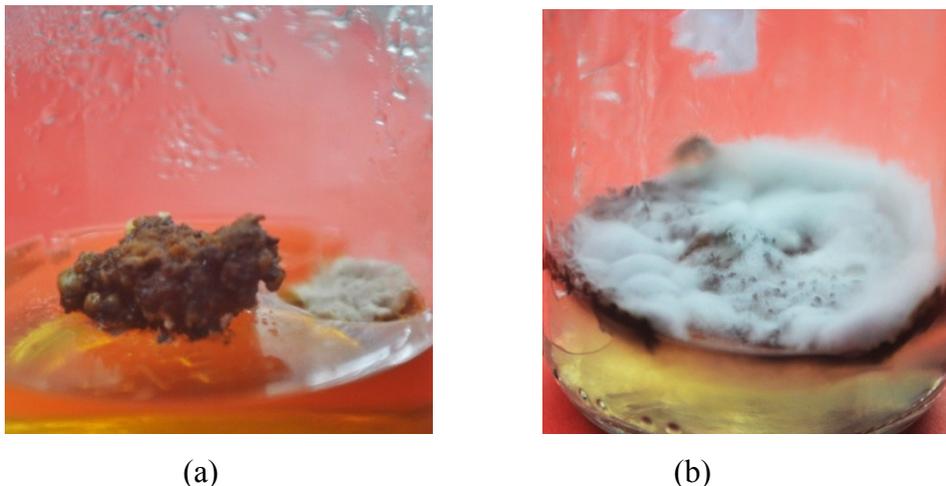
ml/l. Penurunan persentase eksplan hidup ini disebabkan oleh kontaminasi pada eksplan yang bersifat endogen, hal ini dicirikan dengan terjadinya kontaminasi pada minggu ke-3. Menurut Santoso dan Nursandi (2004) kontaminasi yang bersifat endogen atau internal yang terdapat dalam eksplan responnya muncul setelah beberapa hari bahkan sampai satu bulan. Penurunan persentase eksplan hidup tidak hanya dipengaruhi oleh mikroorganisme, penurunan persentase hidup pada eksplan juga dapat dipengaruhi oleh kematian eksplan akibat senyawa fenol yang dikeluarkan oleh eksplan terlihat pada minggu ke-6, diikuti dengan penurunan persentase eksplan hidup pada perlakuan BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l pada minggu ke-4. Denish (2007) mengungkapkan apabila pencoklatan dibiarkan terus-menerus maka penyerapan unsur hara oleh eksplan akan terhambat, sehingga pertumbuhan eksplan juga terhambat bahkan dapat menyebabkan kematian.

Penurunan persentase eksplan hidup pada perlakuan BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l, terjadi bukan disebabkan kontaminasi oleh mikroorganisme melainkan terjadinya penurunan persentase eksplan hidup pada minggu ke-4 karena eksplan mengalami kematian akibat pengeluaran senyawa fenol oleh eksplan yang bersifat toksik, sehingga menyebabkan kematian pada eksplan, sementara pada minggu ke-5 sampai minggu ke-8 persentase eksplan hidup konstan tidak terjadi kontaminasi maupun mati akibat senyawa fenol yang dikeluarkan oleh eksplan. Sari dkk, (2013) mengungkapkan bahwa akumulasi senyawa fenol pada eksplan tersebut dapat menghambat, bahkan bersifat toksik bagi pertumbuhan eksplan.

B. Persentase Eksplan Kontaminasi

Pengamatan eksplan kontaminasi bertujuan untuk mengetahui tingkat keberhasilan sterilisasi baik eksplan, alat maupun medium. Persentase eksplan kontaminasi dapat dilihat dengan adanya bakteri dan jamur yang tumbuh di permukaan eksplan maupun medium. Mencegah dan menghindari kontaminasi merupakan hal yang mutlak dilakukan pada seluruh rangkaian percobaan dalam kultur *in vitro*, karena lingkungan yang aseptik harus selalu dijaga.

Hasil dari tabel 1 menunjukkan bahwa pada perlakuan BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l ;, BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l dan BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l persentase eksplan mencapai 0 %, sementara pada perlakuan BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l, dan BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l mencapai 10%. Kontaminasi diakibatkan oleh mikroorganisme yaitu jamur dan bakteri, kontaminasi yang diakibatkan bakteri dicirikan dengan timbulnya lendir pada permukaan medium maupun di permukaan eksplan (Gambar2.a), sedangkan kontaminasi yang disebabkan oleh jamur dicirikan dengan tumbuhnya miselium jamur pada permukaan medium maupun eksplan dengan warna putih keabu-abuan, sehingga miselium jamur menyelimuti eksplan dan terjadi kematian pada eksplan (Gambar 2.b). Sumber kontaminasi pada eksplan dapat dipengaruhi oleh tingkat sterilisasi eksplan, alat yang digunakan serta kontaminasi yang bersifat endogen atau internal. Menurut Ermayanti (1997) sumber kontaminasi berasal dari mikroorganisme yang tumbuh pada material tanaman yang dibiakkan, serta alat-alat yang digunakan. Ciri-ciri kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri dan jamur disajikan pada gambar 2.

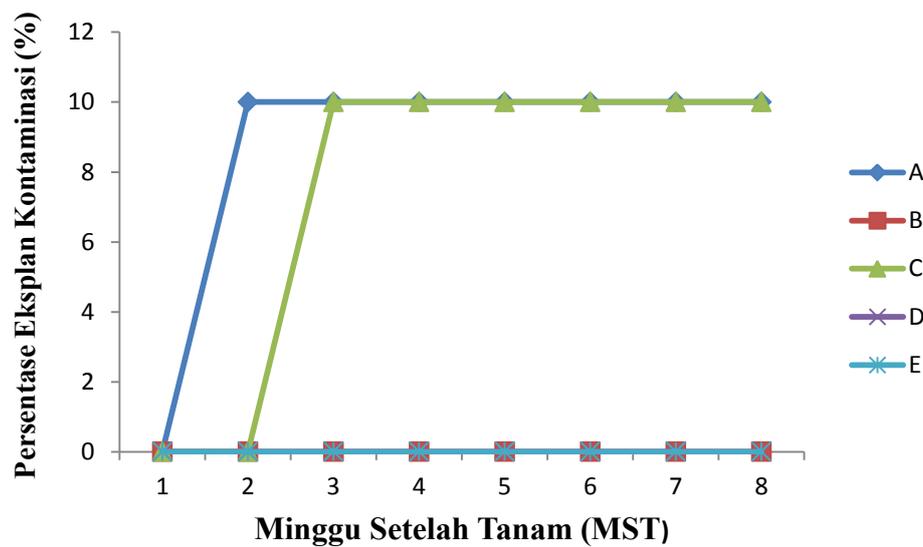


Gambar 1. (a) Eksplan Kalus Jati Kontaminasi Bakteri 2 MST dan (b) Kontaminasi Jamur 3 MST.

Eksplan yang terkontaminasi hanya dapat bertahan hidup sampai beberapa hari setelah kontaminan menyebar ke seluruh permukaan eksplan dan medium. Matinya eksplan disebabkan adanya persaingan antara eksplan dengan kontaminan dalam penyerapan unsur hara. Mengingat eksplan maupun kontaminan memerlukan suplai makanan berupa glukosa untuk dapat tumbuh dan berkembang.

Kontaminasi dalam kultur *in vitro* adalah segala bentuk organisme atau mikroorganisme lain yang tumbuh pada medium biakan *in vitro* di lingkungan aseptik. Sumber kontaminan bisa berasal dari mikroorganisme yang tumbuh pada material tanaman yang dibiakkan, alat-alat yang digunakan, dan lingkungan tempat penyimpanan biakan di ruang inkubasi. Kontaminan seringkali tumbuh lebih cepat dari *in vitro* yang sengaja ditumbuhkan sehingga akan terjadi kompetisi penyerapan nutrisi antara kontaminan dan *in vitro* yang sengaja ditumbuhkan. *In vitro* yang sengaja ditumbuhkan akan kekurangan nutrisi dan

dapat menyebabkan kematian pada eksplan yang dikulturkan. Pengamatan Persentase Eksplan Kontaminasi setiap minggu disajikan pada Gambar 3.



Keterangan:

- A = BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l
- B = BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l
- C = BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l
- D = BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l
- E = BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l

Gambar 2. Grafik Persentase Eksplan Kontaminasi 1-8 MST

Hasil pengamatan terhadap persentase eksplan kontaminasi yang diamati selama 8 minggu pada gambar 3 menunjukkan bahwa persentase eksplan kontaminasi pada minggu 1 semua perlakuan mencapai 0 %. Kontaminasi mulai terjadi pada minggu ke-2 pada perlakuan BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l mencapai 10 % , diikuti dengan terjadinya kontaminasi pada minggu ke-3 pada perlakuan BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l mencapai 10%, sedangkan pada perlakuan BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l ; BAP 2,0

mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l dan BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l persentase eksplan kontaminasi sebesar 0 %.

Kontaminasi pada minggu ke-2 diakibatkan oleh bakteri dengan ciri-ciri lendir berwarna kuning maupun merah muda. Kontaminasi bakteri dapat diketahui dengan terlihatnya lapisan seperti lendir yang membentuk koloni-koloni di sekitar bawah eksplan, serta di tepi medium dengan koloni bakteri yang berwarna kekuning-kuningan. Ciri-ciri eksplan terkontaminasi oleh jamur pada minggu ke-3, kontaminasi akibat jamur pertumbuhannya lebih cepat dibandingkan dengan bakteri, hal ini disebabkan dalam medium terdapat nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan jamur, tumbuhnya miselium jamur pada permukaan medium maupun eksplan dengan warna putih keabu-abuan, sehingga miselium jamur menyelimuti eksplan dan terjadi kematian pada eksplan.

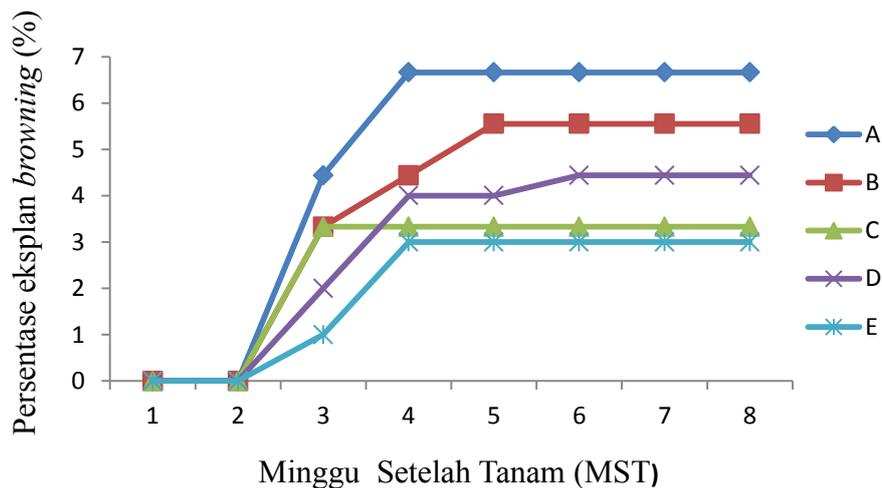
Bidwell (1979) mengungkapkan bahwa sifat spora jamur yang kecil dan ringan membuatnya mudah terbawa oleh aliran udara. Kontaminasi yang terjadi bersifat endogen ditunjukkan dengan kontaminasi muncul pada minggu ke-2 dan ke-3. Menurut Andriyani (2005) kontaminan endogen yang berada dalam *in vitro* tanaman muncul satu minggu setelah inokulasi, sedangkan menurut Santoso dan Nursandi (2003) bakteri internal yang terdapat dalam eksplan, responnya muncul setelah beberapa hari bahkan sampai satu bulan. Mikroorganisme dapat mensekresikan senyawa tertentu yang bersifat toksik pada medium tumbuh sehingga jika terserap menyebabkan kematian pada eksplan (Ermayanti, 1997).

C. Persentase Eksplan *Browning*

Pencoklatan atau *Browning* merupakan suatu karakter munculnya warna coklat atau hitam yang mengakibatkan tidak terjadinya pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Selain itu *Browning* juga timbul karena adanya senyawa fenol yang dikeluarkan akibat pemotongan atau pelukaan pada eksplan.

Hasil pengamatan persentase *Browning* pada Tabel 1 menunjukkan bahwa terjadinya pencoklatan eksplan pada minggu ke-2 setelah inokulasi sebesar 60 % pada perlakuan BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l dan pada perlakuan BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l, mencapai 50%, sementara pada perlakuan BAP 2,0 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 400 ml/l mencapai 40%. Pengamatan persentase eksplan mengalami pencoklatan diakibatkan oleh senyawa fenol yang dikeluarkan eksplan. Sementara persentase eksplan *Browning* yang terendah pada perlakuan BAP 1,5 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 300 ml/l dan BAP 2,5 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 500 ml/l sebesar 30 %. Tingginya persentase eksplan *Browning* diakibatkan oleh proses biologis tanaman yang mengeluarkan senyawa berupa senyawa fenol. Pengeluaran senyawa fenol tinggi dapat mengakibatkan kematian pada eksplan. Senyawa fenol merupakan enzim polifenol oksidase dan tirosinase, dalam kondisi oksidatif akibat pelukaan enzim secara alami disintesis oleh eksplan dimana saat sel rusak isi dari sitoplasma dan vakuola menjadi tercampur, kemudian senyawa fenol akan teroksidasi yang bersifat racun dan dapat merusak *in vitro* tanaman (Laukkanen *et al.*, 1999). Santoso dan Nursandi (2003) mengungkapkan bahwa terjadinya pencoklatan diakibatkan oleh sistem biologis tanaman sebagai respon terhadap pengaruh fisik

atau biokimia seperti pengupasan, memar, pemotongan, serangan penyakit dan kondisi yang tidak normal. Sementara rendahnya persentase *Browning* pada eksplan diduga akibat respon eksplan terhadap senyawa atau zat pengatur tumbuh yang diberikan dapat mendorong pertumbuhan mengarah pada pembelahan sel sehingga eksplan dapat pulih kembali setelah perlakuan fisik berupa pemotongan eksplan. Hasil pengamatan persentase *Browning* setiap minggu disajikan pada gambar 4.



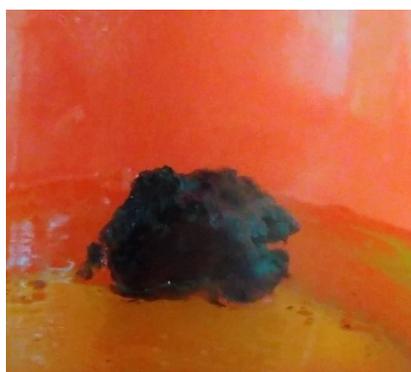
Keterangan:

- A = BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l
- B = BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l
- C = BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l
- D = BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l
- E = BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l

Gambar 3. Grafik Persentase Eksplan *Browning* 1-8 MST

Hasil pengamatan terhadap persentase eksplan *Browning* yang diamati selama 8 minggu, menunjukkan bahwa persentase eksplan *Browning* semua perlakuan pada minggu pertama mencapai 0 %. Pencoklatan pada eksplan mulai

terlihat pada minggu ke-2. Gambar 4 menunjukkan bahwa persentase eksplan *Browning* pada perlakuan BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l mencapai 60 % sampai minggu ke- 4, sementara pada perlakuan BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l persentase *Browning* 50 % sampai minggu ke- 5 dan diikuti persentase eksplan *Browning* pada perlakuan BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l mencapai 40 % sampai minggu ke-6, sedangkan laju eksplan *Browning* terendah pada perlakuan BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l dan BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l mencapai 30 % hanya sampai minggu ke-3 dan 4 (Gambar 4). Peningkatan laju persentase *Browning* disebabkan oleh meningkatnya produksi senyawa fenol yang diikuti oleh aktivitas oksidasi senyawa fenol sehingga terjadi pencoklatan pada eksplan (Prawiranata dkk. 1995). Pencoklatan yang terjadi tidak selalu mengakibatkan kematian pada eksplan sebagaimana terlihat pada gambar 5.



(a)



(b)

Gambar 4. (a) Persentase Eksplan *Browning* dan (b) Persentase Eksplan *Recovery*

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa beberapa eksplan dapat tumbuh kembali setelah mengalami pencoklatan atau *recovery*. *Recovery* merupakan suatu perubahan kalus yang mengalami *Browning* menjadi hijau kembali,

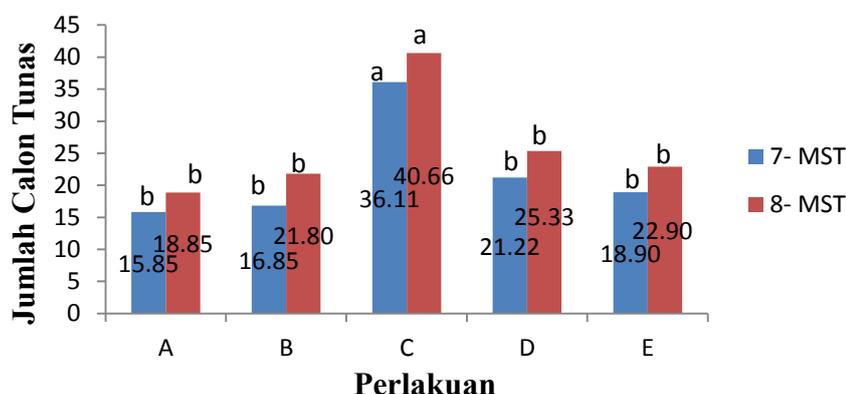
sebagaimana terlihat pada gambar (5.b). Sebaliknya beberapa eksplan yang mengalami pencoklatan atau *Browning* tidak mengalami *recovery* atau mati (Gambar 5.a).

Hasil pengamatan menunjukkan perlakuan yang mengalami *recovery* dari *Browning* yaitu BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l sebesar 50 % dan BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l terjadi *recovery* sebesar 50 % dari eksplan yang *Browning*. Sementara perlakuan BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l, perlakuan BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l dan BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l terdapat 30 % eksplan mengalami *recovery* dari keseluruhan eksplan yang mengalami pencoklatan (*Browning*). *Recovery* dimungkinkan bahwa eksplan telah mampu beradaptasi dan dapat menyerap nutrisi yang terdapat dalam medium, eksplan yang mengalami *recovery* mengalami perubahan dari sebelumnya yaitu dengan terbentuknya kalus baru hasil dari diferensiasi pembelahan sel baru, hal ini didukung oleh Andriyani (2005) bahwa *recovery* terjadi karena eksplan telah mampu beradaptasi dengan medium tumbuh dan ZPT yang cukup tinggi.

Pierik (1987) mengungkapkan bahwa sel-sel yang telah terdiferensiasi menjadi hidup kembali, hal ini disebabkan eksplan sebenarnya tidak mati namun karena adanya air, nutrisi, dan zat pengatur tumbuh pada medium maka eksplan mengalami imbibisi dan terjadi metabolisme sel sehingga eksplan yang awalnya mengalami pencoklatan dapat tumbuh dan warnanya menjadi hijau kembali.

D. Jumlah Calon Tunas

Pembentukan tunas merupakan salah satu faktor penting di dalam perbanyakan tanaman dengan metode kultur *in vitro*. Hasil pengamatan menunjukkan pada minggu ke-1 sampai 6 calon tunas belum muncul pada semua perlakuan. Munculnya calon tunas terbentuk mulai pada minggu ke-7 dicirikan dengan terbentuknya tonjolan-tonjolan warna hijau pada eksplan. Pengamatan jumlah calon tunas pada eksplan Jati Emas disajikan pada gambar 6.



Keterangan :

A = BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l

B = BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l

C = BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l

D = BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l

E = BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l

Gambar 5. Pengaruh Air Rebusan Kentang, BAP dan NAA terhadap Jumlah Calon Tunas Jati Emas pada 7 dan 8 MST

Hasil analisis sidik ragam pada minggu ke-6 dan 7 menunjukkan adanya beda nyata terhadap jumlah calon tunas Jati Emas (Lampiran 5, Tabel Anova). Pembentukan calon tunas pada kalus Jati Emas pada perlakuan BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l+ K 300 ml/l minggu ke-7 mencapai 36,11 calon tunas, sedangkan

pembentukan calon tunas pada minggu ke-8 mencapai 40,66 calon tunas (Gambar 6 dan Lampiran 6). Jumlah calon tunas tertinggi pada perlakuan BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l baik pada minggu ke-7 maupun ke-8. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan mampu merespon zat organik kompleks berupa air rebusan kentang dengan kombinasi BAP dan NAA ke dalam medium. Sumardi (1996), menyatakan bahwa auksin dan sitokinin bekerja bersama-sama dalam menciptakan kondisi optimum untuk pertumbuhan eksplan dan mendorong pembentukan tunas maupun akar.

Manfaat dari hormon sitokinin ini diantaranya adalah untuk mempercepat pertumbuhan tunas, mempercepat penambahan jumlah daun, memperbanyak anakan, dan menghambat penuaan organ tanaman. Wetherell (1992) menyatakan bahwa sitokinin mempunyai peran yang penting untuk propagasi secara *in vitro*, yaitu mendorong pembelahan sel dalam *in vitro* eksplan dan mendorong pertumbuhan tunas. Wareing dan Phillips (1970) mengemukakan bahwa sitokinin merangsang pembelahan sel tanaman dan berinteraksi dengan auksin dalam menentukan arah diferensiasi sel.

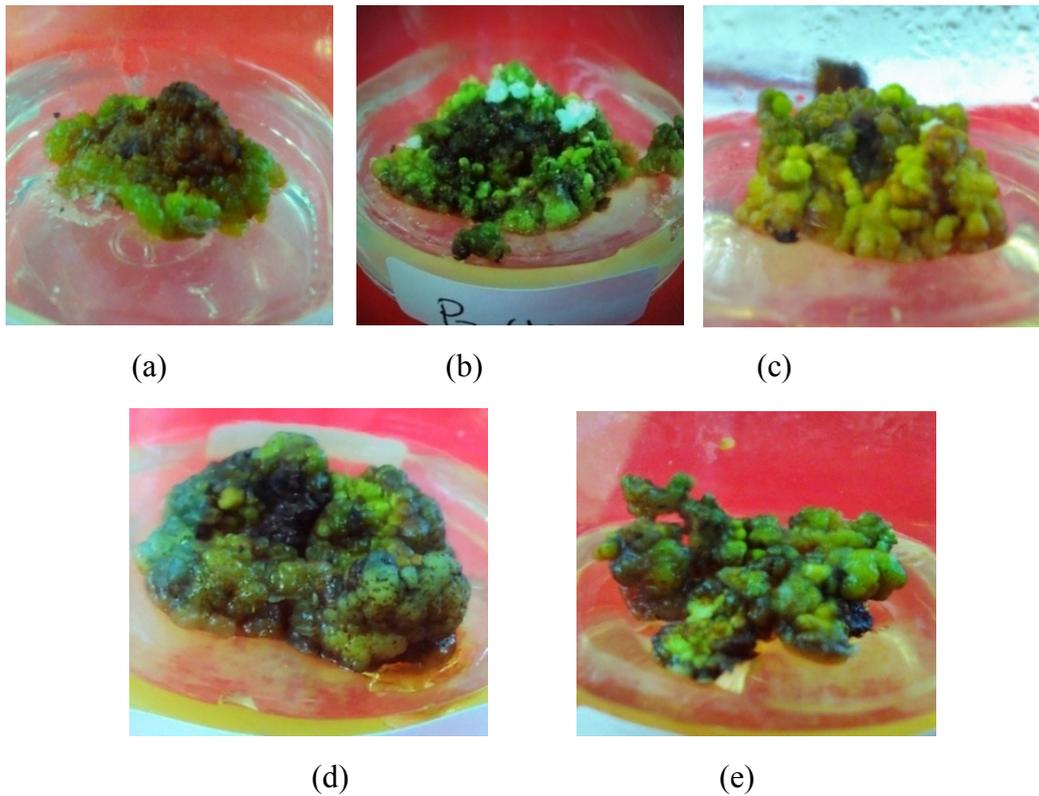
Peambahan NAA sejenis hormon auksin berfungsi untuk merangsang pemanjangan sel karena auksin terdapat pada pucuk-pucuk tunas muda atau pada *in vitro* meristem di pucuk, menyebar luas ke dalam seluruh tubuh tanaman. Penyebarluasan auksin ini arahnya dari atas ke bawah hingga sampai pada titik tumbuh akar, melalui *in vitro* pembuluh tipis (*floem*) atau *in vitro* parenkhim (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Mekanisme kerja auksin salah satunya adalah mempengaruhi pemanjangan sel. NAA membantu meningkatkan pertumbuhan

akar dikarenakan dapat menginduksi sekresi ion H^+ keluar melalui dinding sel, pengasaman dinding sel menyebabkan K^+ diambil dan pengambilan ini mengurangi potensial air dalam sel. Akibatnya air masuk ke dalam sel juga mendorong enzim selulase memotong-motong ikatan selulosa pada dinding primer hingga dinding elastis dan sel membesar (Gunawan, 1987) .

Penambahan air rebusan kentang sebagai bahan organik yang banyak mengandung hara berperan baik bagi pertumbuhan tanaman secara *in vitro*. Vitamin yang terkandung dalam Air rebusan kentang dapat membantu dalam pertumbuhan tanaman secara *in vitro*. Hal ini dikarenakan sel bagian tanaman yang dikulturkan belum mampu membuat vitamin sendiri untuk kehidupannya, sehingga air rebusan kentang yang mengandung tiamin (vitamin B1), piridoksin (vitamin B6), riboflavin (vitamin B2) dan vitamin C (asam askorbat), sebagai zat suplemen untuk mendorong pertumbuhan dan morfogenesis (George dan Sherrington, 1984). Menurut Wetherell (1992), vitamin berfungsi sebagai katalisator, stimulator pertumbuhan dan meminimalkan stres eksplan dalam kultur. Hendaryono dan Wijayani (1994), menambahkan bahwa tiamin adalah vitamin esensial untuk hampir semua kultur *in vitro* tanaman. Fungsi tiamin adalah untuk mempercepat pembelahan sel pada meristem akar dan juga berperan sebagai koenzim dalam reaksi yang menghasilkan energi dari karbohidrat.

Hasil pengamatan pada perlakuan BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l; BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l dan BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l; BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l, dengan penambahan nutrisi dalam jumlah rendah maupun jumlah yang lebih tinggi,

jumlah calon tunas cenderung setara (Gambar 6). Menurut Tripepi (1997) hal ini kemungkinan berhubungan dengan kemampuan sel dalam mencapai batas optimum, sehingga dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang optimum dapat memacu diferensiasi pembentukan tunas. Eksplan mempunyai batas fisiologi untuk dapat berdiferensiasi dapat dilihat pada gambar 7.



Keterangan:

- a = BAP 0,5 mg/l + NAA 0,1 mg/l + K 100 ml/l.
- b = BAP 1,0 mg/l + NAA 0,2 mg/l + K 200 ml/l.
- c = BAP 1,5 mg/l + NAA 0,3 mg/l + K 300 ml/l.
- d = BAP 2,0 mg/l + NAA 0,4 mg/l + K 400 ml/l.
- e = BAP 2,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l + K 500 ml/l.

Gambar 6. Pengaruh Air Rebusan Kentang terhadap Jumlah Calon Tunas Jati Emas Minggu ke-8

Hasil pengamatan menunjukkan pada minggu ke-8 lebih terlihat jelas pada calon tunas dengan meningkatnya jumlah calon tunas pada eksplan, pembentukan

calon tunas ditandai dengan adanya tonjolan-tonjolan berwarna kehijauan pada eksplan (gambar 7). Perbedaan warna yang terjadi pada kalus menunjukkan tingkat perkembangan kalus yang berbeda-beda pula, hal ini dipengaruhi oleh konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan pada medium tumbuh. Warna hijau pada kalus adalah akibat efek sitokinin dalam pembentukan klorofil. Menurut Wattimena (1992), sitokinin berperan dalam memperlambat proses senesensi (penuaan) sel dengan menghambat perombakan butir-butir klorofil dan protein dalam sel. Pada penambahan sitokinin dengan konsentrasi yang semakin meningkat cenderung menunjukkan warna hijau cerah. Kalus dengan warna yang hijau tidak hanya dimungkinkan mengandung banyak pigmen klorofil akan tetapi, kalus yang terbentuk juga memiliki ukuran cukup besar yang menandakan bahwa kalus beregenerasi dengan baik dan sel-selnya masih aktif membelah dan memiliki kemampuan untuk membentuk tunas (Lizawati 2012).

Pembentukan calon tunas pertama kali muncul pada eksplan merupakan hasil dari diferensiasi kalus yang terus membelah dan berkembang sehingga dengan adanya hormon sitokinin yang seimbang dapat memacu dalam pembentukan calon tunas pada eksplan Jati Emas. Sitokinin yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* adalah BAP (*Benzyl Amino Purine*). BAP adalah sitokinin yang sering digunakan karena paling efektif untuk merangsang pembentukan tunas, lebih stabil dan tahan terhadap oksidasi serta paling murah diantara sitokinin lainnya. Mekanisme kerja sitokinin dipengaruhi oleh konsentrasi auksin. Sitokinin berperan dalam menghambat pertumbuhan akar melalui peningkatan konsentrasi etilen, sitokinin dapat menghambat pembentukan

akar lateral melalui sel perikel dan memblok program pengembangan pembentukan akar lateral sehingga mendorong pembentukan tunas (Santoso dan Nursandi, 2003). Sitokinin mempunyai peran yang penting untuk propagasi secara *in vitro*, yaitu mendorong pembelahan sel *in vitro* eksplan dan mendorong pembentukan tunas (Wetherell, 1992).

Pengamatan terhadap parameter jumlah calon tunas bertujuan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh efektifitas BAP dan NAA yang dikombinasikan dengan air rebusan kentang dengan konsentrasi tertentu untuk menginduksi tunas pada kalus Jati Emas secara *in vitro*. Penambahan konsentrasi BAP lebih dari 2 mg/l dan NAA 0,5 mg/l ke dalam medium mengakibatkan terjadi penurunan calon tunas, diduga bahwa pemberian nutrisi dan zat pengatur tumbuh melebihi batas optimum sehingga terjadinya penurunan jumlah calon tunas (Gambar 7.e). Selain itu diduga bahwa eksplan Jati sudah memiliki senyawa endogen sehingga eksplan tercukupi. George dan Sherrington (1984) menyatakan bahwa kemampuan suatu eksplan untuk berdiferensiasi tidak hanya bergantung pada penambahan sitokinin dan auksin pada medium pertumbuhan tetapi bergantung pula pada interaksi antara auksin endogen dan eksogen.