

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Sarang Semut

Sarang semut (*Myrmecodia pendans*) merupakan tumbuhan epifit dari *Hydnophytinae (Rubiaceae)*, yang telah lama dikenal dan dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai salah satu obat tradisional dan memiliki potensi sebagai antioksidan alami. Sarang semut tumbuh pada pohon inang setinggi 8 m berada di ketinggian 1100-2500 m dari permukaan laut, dan sudah dikenal oleh masyarakat lokal Asia Tenggara. Tanaman berumbi yang berongga pada bagian batang ini biasanya tumbuh menempel pada beberapa jenis tanaman seperti kayu putih, cemara gunung, kaha dan *beech*. Adapun klasifikasi ilmiah dari tanaman sarang semut adalah Kingdom *Plantae*, Subkingdom *Tracheobionta*, Super Divisi *Spermatophyta*, Divisi *Magnoliophyta*, Kelas *Magnoliopsida*, Sub kelas *Asteridae*, Ordo *Rubiales*, Famili *Rubiaceae*, Genus *Myrmecodia* dan Spesies *Myrmecodia pendans* (Wikipedia, 2011).

Bagian dalam batang sarang semut berbentuk rongga bersekat-sekat, menyerupai labirin dan biasa dijadikan tempat tinggal koloni semut. Koloni semut yang tinggal di dalam rongga batang spesies *Myrmecodia pendans* adalah *Iridomyrmex cordatus*. Keunikan sarang semut terletak pada interaksi semut yang bersarang pada umbi yang terdapat lorong-lorong di dalamnya. Kestabilan suhu di dalamnya membuat koloni semut betah berlama-lama bersarang di dalam tanaman ini. Dalam jangka waktu yang lama terjadilah reaksi kimia secara alami antara senyawa yang dikeluarkan semut dengan zat yang terkandung di dalam buah sarang semut. Akar sarang semut tidak berfungsi sebagai penyerap unsur hara,

hanya sebagai pengikat terhadap pohon inangnya. Sarang semut mengandung flavonoid, tanin, antioksidan tokoferol (vitamin E) dan beberapa mineral penting untuk tubuh seperti kalsium, natrium, kalium, seng, besi, fosfor dan magnesium. Flavonoid merupakan antioksidan alam yang mampu bertindak sebagai pereduksi radikal hidroksil, superoksida dan radikal peroksil (Harun dan Syari 2002 *dalam* Nurjaman, 2015).

Kegunaan sarang semut sebagai obat tradisional menuntut terjadinya eksploitasi terhadap tanaman tersebut. Jika hal tersebut tidak diimbangi dengan pelestarian, maka dapat mengakibatkan terjadinya kepunahan mengingat tanaman sarang semut sulit untuk dikembangbiakkan secara konvensional. Perbanyakan sarang semut yang secara alami menggunakan biji mengalami beberapa kendala. Ketika buah sarang semut jatuh, semut jenis *Iridomyrmex cordatus* akan membawa biji dari buah sarang semut ke dalam rongga-rongga sarang semut untuk dimakan sehingga hanya biji yang selamat yang bisa tumbuh. Selain itu, biji sarang semut yang dapat berkecambah hanya biji dalam kondisi segar. Oleh karena itu diperlukan perbanyakan alternatif dalam pelestarian sarang semut yang salah satunya dapat melalui perbanyakan secara *in vitro*.

## **B. Kultur *In Vitro***

Kultur *in vitro* adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan, atau organ yang steril, ditumbuhkan pada medium buatan yang steril, dalam botol kultur yang steril dan dalam kondisi yang aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan

beregenerasi menjadi tanaman yang lengkap. Secara teori, perbanyakan tanaman melalui kultur *in vitro* dapat dibedakan menjadi dua, yaitu Organogenesis atau perbanyakan melalui tunas-tunas baru dari tunas axilar, serta secara Embriogenesis somatik, yaitu pembentukan tunas adventif dan embrio somatik adventif. Pembentukan tunas adventif maupun embrio somatik dapat melalui cara morfogenesis langsung maupun tidak langsung (Mulyaningsih dan Nikmatullah, 2006 dalam Nurjaman, 2015).

Perbanyakan secara *in vitro* dapat menghasilkan tanaman dengan sifat sama seperti induknya, pembiakan ini termasuk pembiakan secara vegetatif, yaitu individu baru terjadi dari bagian tubuh suatu induk. Oleh karena itu, individu yang baru terbentuk mempunyai sifat yang sama dengan induknya. Perbanyakan tanaman dengan teknik ini membuat tanaman bebas dari penyakit karena dilakukan secara aseptik. Beberapa keuntungan yang lain dari perbanyakan kultur *in vitro* antara lain: perbanyakan generatif dan vegetatif yang cepat dan efisien, mempermudah seleksi mutan, menghindari sterilitas yang menghambat hibridisasi, produksi tanaman bebas pathogen dan sebagai pelestarian plasma nutfah (Widiastoety *et al.*, 1997 dalam Lutfi, 2015 ).

Perbanyakan kultur *in vitro* telah dilakukan pada tanaman sarang semut. Masrukhan *et al.* (2012) telah melakukan kultur *in vitro* tanaman sarang semut menggunakan eksplan daun dan bonggol. Hasil terbaik pada penelitian itu yaitu eksplan daun yang ditanam pada medium VW tanpa ekstrak kurma dengan persentase kontaminasi 50%, sedangkan eksplan bonggol mengalami tingkat kontaminasi mencapai 100%. Pengujian dilakukan menggunakan tiga jenis

medium yaitu medium *Vacint Went* (VW), medium Murashige and Skoog (MS) dan *New Dogashima Medium* (NDM). Pada penelitian ini akar mampu tumbuh dari eksplan daun pada medium VW, karena medium VW merupakan medium dengan kandungan unsur hara yang paling sederhana dibandingkan dengan medium lainnya. Sementara Supriyadi (2014) melakukan multiplikasi tanaman sarang semut dari eksplan biji dengan penambahan Thidiazuron dan NAA pada medium MS. Hasil terbaik diperoleh pada perlakuan Thidiazuron 1 mg/L dan NAA 0,1 mg/L. Selain itu, Nurjaman (2015) melakukan penelitian tentang pengaruh jenis eksplan dan Thidiazuron terhadap multiplikasi tunas adventif, menghasilkan bahwa Thidiazuron dapat menginduksi multiplikasi sarang semut dengan konsentrasi terbaik pada Thidiazuron 3 mg/L+0,5 mg/L NAA dengan jumlah tunas sebanyak 15,33 tunas. Keberhasilan teknik *in vitro* tergantung juga pada kebutuhan hara sel dan jaringan yang dikulturkan. Hara terdiri dari komponen yang utama dan komponen tambahan. Komponen utama meliputi garam mineral, sumber karbon (gula), vitamin dan zat pengatur tumbuh. Komponen lain seperti senyawa nitrogen organik, berbagai asam organik dan metabolit serta ekstra tambahan tidak mutlak dibutuhkan, tetapi dapat menguntungkan ketahanan sel dan perbanyakannya.

### C. Medium MS

Medium adalah faktor utama dalam perbanyakan *in vitro*. Keberhasilan perbanyakan dan perkembangbiakan tanaman dengan metode kultur *in vitro* secara umum sangat tergantung pada jenis medium yang digunakan. Ada dua penggolongan medium tumbuh: medium padat dan medium cair. Medium padat

pada umumnya berupa padatan gel, seperti agar, dimana nutrisi dicampurkan pada agar. Medium cair adalah nutrisi yang dilarutkan di air. Medium cair dapat bersifat tenang atau dalam kondisi selalu bergerak, tergantung kebutuhan. Komposisi medium yang digunakan dalam kultur jaringan dapat berbeda komposisinya. Perbedaan komposisi medium dapat mengakibatkan perbedaan pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang ditumbuhkan secara *in vitro*.

Medium yang digunakan pada kultur *in vitro* berpengaruh besar terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang akan dihasilkan. Oleh karena itu, bermacam-macam medium kultur *in vitro* dibuat untuk menyesuaikan dengan berbagai jenis kebutuhan nutrisi eksplan yang digunakan. Medium tumbuh untuk eksplan berisi kualitatif komponen bahan kimia yang hampir sama, hanya berbeda pada tingkat konsentrasi tiap-tiap persenyawaan. Medium dasar yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* adalah medium MS dan modifikasinya (Chen *et al.*, 2004 dalam Nurjaman, 2015)

Medium Murashige dan Skoog (MS) paling banyak digunakan dalam Kultur *in vitro*. Medium MS diciptakan oleh Toshio Murashige dan Skoog Folke K. pada tahun 1962. Medium MS merupakan perbaikan komposisi medium Skoog, terutama kebutuhan garam anorganik yang mendukung pertumbuhan optimum pada kultur *in vitro* tembakau. Medium MS mengandung 40 mM N dalam bentuk  $\text{NO}_3$  dan 29 mM N dalam bentuk  $\text{NH}_4^+$ . Kandungan lainnya berupa Kalium 20 mM dan P 1,25 mM. Komposisi medium yang digunakan dalam kultur *in vitro* memiliki kandungan dan komposisi yang berbeda. Perbedaan komposisi pada medium menghasilkan pertumbuhan dan perkembangan yang berbeda pada

eksplan. Medium Murashige dan Skoog (MS) sangat sering digunakan karena cukup memenuhi unsur hara makro, mikro dan vitamin untuk pertumbuhan tanaman (Marlina, 2004, *dalam* Nurjaman, 2015).

#### **D. Arang Aktif**

Arang aktif atau sering juga disebut sebagai Karbon aktif, adalah suatu jenis karbon yang memiliki luas permukaan yang sangat besar. Karbon aktif adalah karbon padat yang memiliki luas permukaan yang cukup tinggi berkisar antara 100 sampai dengan 2000 m<sup>2</sup>/g. Arang aktif memiliki pori – pori yang sangat kompleks dengan ukuran mikro dibawah 20 A (Angstrom), ukuran meso 20 sampai 50 Angstrom dan ukuran makro yang melebihi 500 A, pembagian ukuran pori berdasarkan IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Karbon aktif sangat cocok digunakan untuk aplikasi yang membutuhkan luas kontak yang besar seperti pada bidang adsorpsi (penjerapan), dan pada bidang reaksi katalisis, karena karbon aktif memiliki luas permukaan yang sangat besar. Secara umum karbon aktif ini dibuat dari bahan dasar batu bara dan biomasa. Proses pembuatan arang aktif dapat dibagi menjadi dua jenis yaitu pengaktifan secara fisika dan secara kimia. Pengaktifan secara fisika pada dasarnya dilakukan dengan cara memanaskan bahan baku pada suhu yang cukup tinggi (600 – 900<sup>0</sup> C) pada kondisi miskin udara (oksigen), kemudian pada suhu tinggi tersebut dialirkan medium pengaktif berupa uap air dan CO<sub>2</sub>. Pada

pengaktifan kimiawi, bahan baku sebelum dipanaskan dicampur dengan bahan kimia tertentu seperti KOH, NaOH dan  $K_2CO_3$  (Wikipedia, 2014).

Penambahan arang aktif kedalam medium kultur mempunyai pengaruh memacu atau menghambat pertumbuhan dan perkembangan, tergantung pada medium, jaringan yang digunakan, dan atau tujuan penelitian. Pengaruh arang aktif didalam medium kultur *in vitro* adalah sebagai berikut:

1. Memberikan lingkungan gelap pada medium

Sinar merupakan faktor utama dalam lingkungan kultur dan terbukti berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan secara *in vitro*. Kebutuhan sinar untuk diferensiasi meliputi kombinasi dari beberapa komponen termasuk intensitas, periode harian, dan kualitas. Intensitas cahaya yang rendah dapat merangsang zat tumbuh endogen bekerja lebih aktif dalam melakukan proses inisiasi akar. Dengan tersuspensinya arang aktif dalam medium padat, maka jumlah sinar yang melewati medium juga berkurang. Proskauer dan Berman (1970) menemukan bahwa dalam keadaan tersebut menyebabkan rhizoid dan lumut tumbuh di dalam medium dan filamen hijaunya berkembang diatas permukaan. Pan dan Staden (1998) mengemukakan bahwa pengurangan sinar pada dasar tunas akan memberikan lingkungan kodusif unuk akumulasi photosensitif auksin atau co-faktor. Arang aktif juga mempengaruhi aktivitas dan/atau stabilitas zat pengatur tumbuh dengan mengurangi cahaya di dalam kultur *in vitro* (Nissen dan Sutter, 1990). Menurut Wareing dan Phillips (1986) auksin dapat bekerja dengan aktif bila dalam keadaan gelap walaupun sintesisnya harus berlangsung dalam keadaan terang.

2. Menyerap zat penghambat tertentu yang diproduksi baik oleh medium ataupun eksplan di dalam kultur

Masalah yang sering terjadi pada fase awal kultur *in vitro* adalah pencoklatan dan diikuti kematian jaringan karena produksi polyphenol yang berlebihan. Phenol sering dikonotasikan sebagai zat penghambat yang harus dihilangkan dari kultur *in vitro*. Arang aktif berguna untuk menyerap racun atau senyawa inhibitor yang disekresikan oleh plantlet ke dalam medium. Arang aktif dapat menyerap senyawa fenol yang keluar dari jaringan tanaman yang terluka pada saat inisiasi. Pan dan Staden (1998) menyatakan arang aktif menghilangkan pewarnaan dengan menyerap phenol dan *rendered* oksidase phenol dan menginaktifkan peroksidase. Disamping itu, arang aktif dapat mengurangi pencoklatan medium akibat pemanasan tinggi setelah sterilisasi (Madhusudhanan dan Rahiman, 2000 dalam Widiastoety dan Marwoto, 2004). Arang aktif mengurangi pencoklatan pada eksplan palm dan kultur medium (Tisserat, 1979) sehingga memacu eksplan untuk tumbuh secara organogenesis. Arang aktif juga mengontrol pencoklatan medium dan menstimulasi pertumbuhan tunas *Strelitzia regnae* dan *Anemone aronaria* (Mensuali-Sodi *et al.*, 1993). Pan dan Staden (1998) menyatakan bahwa arang aktif juga menyerap vitamin, thiamin-HCl dan asam nikotik. Arang aktif yang diinkubasi di dalam medium, dapat menyerap 5-hidroksymethyl-fulfural (HMF). Senyawa tersebut diperkirakan berasal dari sukrosa didalam medium yang diautoklaf dalam kondisi



asam. Selanjutnya HMF juga memperlihatkan daya penghambatan didalam embriogenesis kultur anther tembakau, kecuali dengan pemberian arang aktif.

### 3. Menyerap zat pengatur tumbuh dan komponen organik lainnya

Zat pengatur tumbuh khususnya auksin dan sitokinin seringkali digunakan dalam kultur *in vitro*. Konsentrasi dan kombinasi auksin dan sitokinin didalam medium kultur merupakan kunci kesuksesan regenerasi tanaman. Nissen dan Sutter (1990) mengemukakan bahwa arang aktif juga dapat menyerap zat pengatur tumbuh (BA, IAA, IBA, NAA, dan kinetin dalam konsentrasi tinggi baik pada medium cair maupun padat). Fridborg dan Ericsson (1975) mengemukakan bahwa arang aktif juga dapat menghilangkan zat pengatur tumbuh khususnya auksin dari medium.

Tunas beberapa tanaman di dalam kultur *in vitro* terbukti lebih cepat membentuk akar dengan penambahan arang aktif ke dalam medium. Arang aktif juga dilaporkan memacu pertumbuhan akar pada saat akar sudah berinisiasi. Pemacuan tersebut disebabkan arang aktif berperan sebagai zat penghambat (melindungi jaringan dari pencoklatan), menyerap auksin, atau pengaruhnya dalam membuat lingkungan medium menjadi gelap (George dan Sherington, 1984). Penelitian Widiastoety dan Marwoto (2004) menunjukkan bahwa pemberian arang aktif proanalisis dan norit dapat meningkatkan jumlah akar terbanyak dibandingkan dengan perlakuan lainnya yaitu dengan arang aktif teknis dan arang kayu. Hal ini disebabkan arang aktif proanalisis dan norit dalam medium tumbuh mampu mengurangi cahaya yang masuk dalam medium tumbuh, karena

mengandung persentase arang aktif yang lebih tinggi yaitu sekitar 99% pada arang aktif proanalisis dan 25% pada norit.

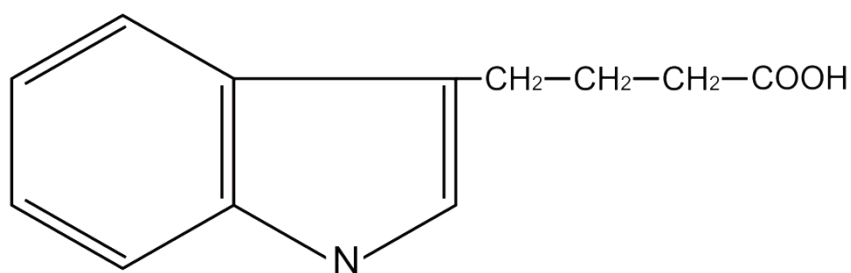
### **E. Zat Pengatur Tumbuh**

Zat pengatur tumbuh adalah senyawa organik bukan hara yang dibuat untuk memacu pembentukan fitohormon (hormon tumbuhan) yang sudah ada di dalam tanaman atau menggantikan fungsi dan peran hormon bila tanaman kurang dapat memproduksi hormon dengan baik. Hormon adalah sekumpulan senyawa organik bukan hara (nutrien) yang dalam kadar sangat kecil mampu mendorong, menghambat, atau mengubah pertumbuhan, perkembangan, dan pergerakan (taksis) tumbuhan. Setiap hormon mempengaruhi respon pada banyak bagian tumbuhan. Respon itu bergantung pada spesies, bagian tumbuhan, fase perkembangan, konsentrasi hormon, interaksi antar hormon yang diketahui, dan berbagai faktor lingkungan. Jadi jaringan yang berbeda akan memberikan respon yang berbeda terhadap zat kimia yang berbeda (Wikipedia, 2013).

ZPT yang sering digunakan pada kultur *in vitro* yaitu auksin dan sitokinin. Jika konsentrasi auksin lebih besar dari pada sitokinin maka akar akan tumbuh, dan apabila konsentrasi sitokinin lebih besar daripada auksin maka tunas akan tumbuh. Interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam medium dan yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur. Auksin adalah salah satu golongan fitihormon, baik alamiah maupun sintetik yang mampu menginduksi pemanjangan sel dan juga dalam kasus tertentu pembelahan sel. Golongan senyawa ini juga mempengaruhi

dominansi apikal, penghambatan pucuk aksilar dan adventif, serta inisiasi pengakaran (Wattimena, 1992 dalam Nurjaman, 2015).

IBA merupakan jenis auksin yang paling sering digunakan dalam menginduksi akar dibandingkan jenis auksin lainnya. Selain karena kemampuannya dalam merangsang terbentuknya akar pada eksplan, IBA (Gambar 1) memiliki kemampuan yang tinggi dalam mengendalikan inisiasi akar. Disamping itu, IBA juga memiliki kestabilan yang baik dibanding IAA dan tingkat toksisitas yang rendah dibandingkan NAA (Wikipedia, 2016).



Gambar 1. Rumus Bangun IBA

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Haque *et al.* (1997) jumlah akar terbanyak dihasilkan dari tunas yang dikulturkan pada medium MS  $\frac{1}{2}$  konsentrasi dengan penambahan IBA 0,2 mg/L. Pada pengakaran, ukuran tunas saat dipindahkan ke dalam medium pengakaran adalah  $\pm$  2cm (Ndoye *et al.*, 2003). Akar yang terbentuk secara *in vitro* seringkali tebal atau gemuk (memiliki diameter lebih besar) dan memiliki rambut-rambut akar. Perlakuan perendaman biji dalam larutan Rooton F 2 g/L selama 30 menit cenderung menghasilkan akar jumlah akar terbanyak (Rineksane, 2000., dalam Nurjaman, 2015). Selain itu, pada perlakuan tersebut mampu menghasilkan akar primer terpanjang. Hal ini

dikarenakan dalam Rooton F terkandung IBA yang berperan dalam meningkatkan jumlah dan panjang akar (Poerwanto, 1994 *dalam* Rineksane, 2000). Penambahan IBA dengan konsentrasi 0,5 mg/L memberikan hasil terbaik pada pengakaran tanaman *Pelargonium tomentosum* (Gati dan Mariska *dalam* Rostiana-Seswita, 2007). Pada penelitian Rostiana dan Seswita (2007), penambahan IBA dengan konsentrasi rendah (0,2 – 0,4 mg/L) dalam menginduksi tunas *Piretrum* mampu menghasilkan jumlah akar yang banyak dibandingkan dengan perlakuan pemberian NAA.

Sementara itu, pengaplikasian IBA 2 ppm dalam kultur *ex vitro* pada tunas *Sansiviera* dapat meningkatkan jumlah akar sekunder, panjang akar dan bobot basah akar. Khawar dan Ozcan (2002) berhasil menginduksi akar tanaman *Lens culinaris* menggunakan IBA pada konsentrasi 0,25 – 2 mg/L pada medium MS dengan hasil terbaik diperoleh pada perlakuan IBA 0,25 mg/L dengan persentase perakaran sebesar 25% selama empat minggu (Riyadi dan Sumaryono, 2010). Hasil penelitian pada pucuk tanaman *Azalea* dilaporkan bahwa penggunaan ZPT yang mengandung senyawa auksin seperti IBA dan NAA sangat berperan dalam mempercepat dan merangsang pembentukan akar dalam jumlah cukup serta mempercepat penyembuhan luka akibat pemotongan (Sadjadiputra, 1988 *dalam* Riyadi dan Sumaryono, 2010).

## **F. Hipotesis**

Penggunaan medium MS dengan penambahan arang aktif dan IBA 2 mg/L diduga memberikan respon terbaik pada perakaran sarang semut.