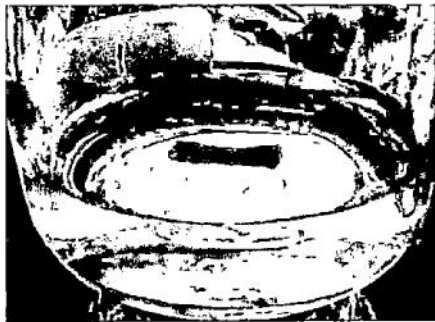
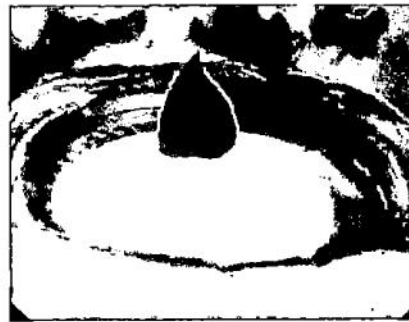


IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Eksplan yang digunakan pada penelitian ini adalah hipokotil dan daun sarang semut hasil penelitian Supriyadi (2014) (gambar 3). Secara umum eksplan hipokotil dan daun sarang semut menunjukkan respon pertumbuhan pada minggu pertama ditandai dengan eksplan membengkak dan pada beberapa eksplan sudah memunculkan tunas, tunas terbentuk melalui organogenesis langsung. Pembengkakan menunjukkan adanya penyerapan air dan unsur hara dari medium oleh sel pada jaringan eksplan. Pembengkakan eksplan merupakan tahap awal dari proses pembentukan kalus. Kemudian pada minggu 2 dan 3 MST tunas dan kalus yang berwarna hijau mulai tumbuh, pada minggu ini tunas terbentuk melalui organogenesis tidak langsung. Multiplikasi atau pelipatgandaan tunas terjadi pada minggu ke-4 dengan terbentuknya tunas lebih dari 1 pada beberapa perlakuan. Kalus yang terbentuk berkembang menjadi tunas. Dengan demikian, pembentukan tunas adventif terjadi secara langsung dan tidak langsung.



(a)



(b)

Gambar 3. Eksplan Sarang Semut (a) Hipokotil (b) Daun

Pengamatan dilakukan sampai minggu ke-12. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui laju pertumbuhan dan pengaruh perlakuan, parameter yang diamati yaitu persentase eksplan hidup, persentase eksplan kontaminasi, persentase eksplan *browning*, persentase eksplan vitrifikasi, saat muncul tunas, persentase eksplan bertunas, jumlah tunas, tinggi tunas, jumlah daun, warna tunas, saat muncul kalus, persentase eksplan berkalus, skoring persentase kalus menutupi eksplan dan warna kalus.

Hasil pengamatan persentase eksplan hidup, persentase eksplan kontaminasi, persentase eksplan *browning* dan persentase eksplan vitrifikasi disajikan pada tabel 5.

Tabel 5. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Persentase Eksplan Hidup, Persentase Eksplan Kontaminasi, Persentase Eksplan *Browning* dan Persentase Eksplan Vitrifikasi Sarang Semut pada 6 dan 12 MST.

Perlakuan	% Hidup		% Kontamnasi		% <i>Browning</i>		%Vitrifikasi	
	minggu ke-6	minggu ke-12	minggu ke-6	minggu ke-12	minggu ke-6	minggu ke-12	minggu ke-6	minggu ke-12
Hipokotil	100	90	0	10	0	0	0	0
Daun	90	83,33	0	6,66	0	0	10	10
0 mg/l Thidiazuron	70	70	0	0	0	0	30	30
1 mg/l Thidiazuron	100	100	0	0	0	0	0	0
2 mg/l Thidiazuron	100	90	0	10	0	0	0	0
3 mg/l Thidiazuron	100	60	0	40	0	0	0	0
4 mg/l Thidiazuron	100	100	0	0	0	0	0	0
5 mg/l Thidiazuron	100	100	0	0	0	0	0	0

Keterangan : Semua medium ditambahkan NAA 0,5 mg/l

A. Persentase Eksplan Hidup

Keberhasilan kultur *in vitro* dilihat dari eksplan hidup, eksplan kontaminasi dan eksplan *browning*. Persentase eksplan hidup merupakan kemampuan eksplan

untuk tumbuh pada suatu medium perlakuan dalam kultur *in vitro*. Persentase eksplan hidup dipengaruhi oleh persentase kontaminasi dan persentase *browning*.

Data pada tabel 5 menunjukkan persentase eksplan hidup minggu ke-6 pada jenis eksplan maupun konsentrasi Thidiazuron adalah 100 % kecuali pada eksplan daun sebesar 90% dan perlakuan 0 mg/l Thidiazuron sebesar 70 %. Penurunan persentase eksplan hidup pada eksplan daun menjadi 90% dan 0 mg/l Thidiazuron sebesar 70 % bukan disebabkan oleh eksplan mengalami kontaminasi atau *browning*, melainkan karena eksplan mengalami vitrifikasi 10 % dan 30%. Persentase eksplan hidup mengalami penurunan pada minggu ke-12 yaitu terjadi pada eksplan hipokotil sebesar 90 %, dan daun 83,33 %. Sementara konsentrasi Thidiazuron yang menyebabkan penurunan persentase hidup terjadi pada perlakuan 2 mg/l Thidiazuron sebesar 90% dan 3 mg/l Thidiazuron sebesar 60 %. Menurunnya persentase hidup disebabkan oleh kontaminasi jamur pada media yang terjadi pada minggu ke-7 dan 11 MST (Gambar 4).

Persentase eksplan hidup yang tinggi pada penelitian ini karena eksplan yang dipakai merupakan eksplan steril hasil penelitian Supriyadi (2014). Selain itu, eksplan masih muda. Jaringan tanaman yang masih muda memiliki daya regenerasi lebih tinggi dibandingkan jaringan tua, karena sel - selnya masih aktif membelah diri dan relatif mengandung sedikit kontaminan (Yusnita, 2004 dalam Andaryani, 2010). Selain itu tingginya kemampuan eksplan untuk bertahan hidup, dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam medium dan asal eksplan yang digunakan. Ferita *dkk.*, (2003) menyatakan penambahan ZPT ini akan memperbesar jumlah nutrisi yang dapat dipakai untuk pertumbuhan,

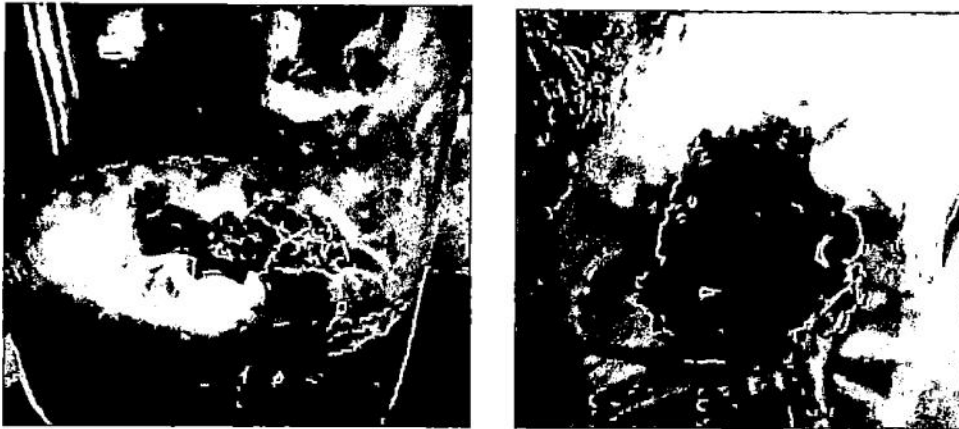
juga akan mengubah keseimbangan ZPT endogen. Keseimbangan ZPT endogen dan eksogen akan menunjang pertumbuhan eksplan. Junasti (1998) menyatakan bahwa bila pertumbuhan eksplan baik maka akan dapat meningkatkan daya tahan eksplan itu. Selain itu sebelum inokulasi, eksplan disterilkan kembali menggunakan larutan betadin, yang mengandung senyawa Povidon Iodin. Zat kimia itu bekerja secara perlahan mengeluarkan iodine, antiseptik yang dapat berperan dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan kuman seperti bakteri, jamur, virus, protozoa, atau spora bakteri.

B. Persentase Eksplan Kontaminasi

Pengamatan kontaminasi bertujuan untuk mengetahui banyaknya eksplan yang mengalami kontaminasi akibat jamur dan bakteri. Pengamatan eksplan kontaminasi dilakukan setiap hari dengan menghitung jumlah eksplan yang terkontaminasi. Kontaminasi yang disebabkan oleh jamur ditandai dengan adanya miselium berwarna putih, abu abu atau kehitaman dan ada juga yang berwarna merah muda yang tumbuh di sekitar eksplan. Kontaminasi jamur umumnya baru terlihat pada minggu ke-2 dan 3 setelah tanam (MST). Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri dapat dilihat dengan adanya lendir berwarna putih keruh di sekitar eksplan dan akhirnya eksplan akan mati

Hasil pengamatan persentase kontaminasi dapat dilihat pada tabel 5. Eksplan hipokotil dan daun tidak mengalami kontaminasi oleh bakteri maupun jamur pada 6 MST. Hal ini diduga karena penggunaan eksplan yang steril, selain itu sebelum inokulasi eksplan disterilkan kembali menggunakan larutan betadin. Namun demikian kontaminasi terjadi pada 12 MST yaitu pada eksplan hipokotil

sebesar 10% dan daun sebesar 6,66 % serta penambahan Thidiazuron pada konsentrasi 2 mg/l sebesar 10% dan 3 mg/l Thidiazuron dengan persentase kontaminasi sebesar 40%.



Gambar 4. Eksplan Sarang Semut yang Mengalami Kontaminasi Karena Jamur

Eksplan terkontaminasi oleh jamur ditandai tumbuhnya miselium putih dan kehitaman (gambar 4). Kontaminasi terjadi diduga dikarenakan botol yang kurang steril maupun tutup botol yang kurang rapat sehingga spora jamur yang ada di udara bebas bisa masuk melalui celah tutup botol atau saat inokulasi spora jamur menempel pada eksplan. Menurut Andri (2007) keberadaan jamur ini diduga bukan berasal dari faktor internal tumbuhan, tetapi dikarenakan adanya spora jamur yang berasal dari botol kultur yang kurang steril, akibat pencucian yang kurang bersih. Selain itu juga diduga akibat kurangnya keterampilan peneliti pada saat inokulasi yang menyebabkan adanya mikroorganisme berupa spora jamur yang masuk dalam medium kultur. Kondisi lingkungan kultur pun diduga sebagai penyebab kontaminasi, karena mikroorganisme jamur dapat mudah tersebar

dengan bantuan aliran udara, dan bila mikroorganisme ini jatuh dalam medium maupun eksplan, maka jamur mampu tumbuh dan berkembang biak.

C. Persentase Eksplan *Browning*

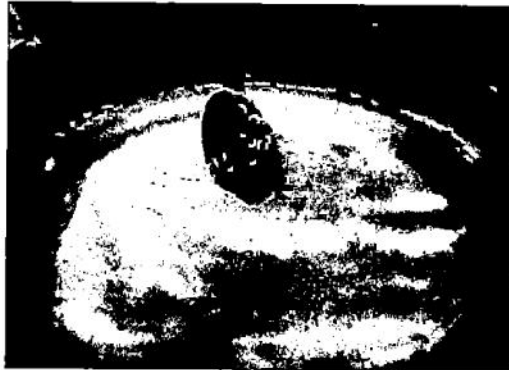
Browning merupakan suatu perubahan warna eksplan dari hijau menjadi coklat. Pengamatan eksplan *browning* meliputi seluruh permukaan eksplan yang berwarna coklat. Pengamatan ini dinyatakan dalam persen. Persentase eksplan *browning* dapat dilihat pada tabel 5. Semua perlakuan tidak mengalami *browning*. Persentase *browning* 0 % diduga karena penggunaan eksplan jaringan muda yang tidak mengandung banyak fenolik atau pengaruh spesies tanamannya. Hal ini didukung pernyataan George dan Sherrington (1984) bahwa pencoklatan pada jaringan muda lebih sedikit dibandingkan dengan jaringan yang tua.

D. Persentase Eksplan Vitrifikasi

Vitrifikasi adalah masalah dalam kultur *in vitro* yang ditandai oleh munculnya pertumbuhan dan perkembangan yang tidak normal seperti tanaman yang dihasilkan pendek-pendek, pertumbuhan batang cenderung ke arah penambahan diameter dan tanaman terlihat berwarna transparan (Rina, 2012 dalam Ajijah *dkk.*, 2010)

Hasil penelitian pada tabel 5 menunjukkan bahwa eksplan hipokotil tidak mengalami vitrifikasi tetapi pada eksplan daun mengalami vitrifikasi sebesar 10% dan pada perlakuan Thidiazuron vitrifikasi terjadi pada konsentrasi 0 mg/l sebesar 30% (gambar 5). Vitrifikasi terjadi pada minggu ke-1, diawali eksplan daun menjadi transparan (kehilangan klorofil) kemudian menjadi agak coklat. Hal ini dikuatkan oleh penelitian Ajijah *dkk.*, (2010) yang menggunakan eksplan daun

vanili mengalami vitrifikasi yaitu dengan perubahan warna eksplan dari hijau menjadi putih (kehilangan klorofil), kemudian jaringan menjadi transparan dan akhirnya berubah warna menjadi coklat. Vitrifikasi pada eksplan daun ini kemungkinan disebabkan oleh pemakaian media MS yang tinggi kandungan ion NH_4^+ nya.



Gambar 5. Eksplan Daun Sarang Semut yang Mengalami Vitrifikasi

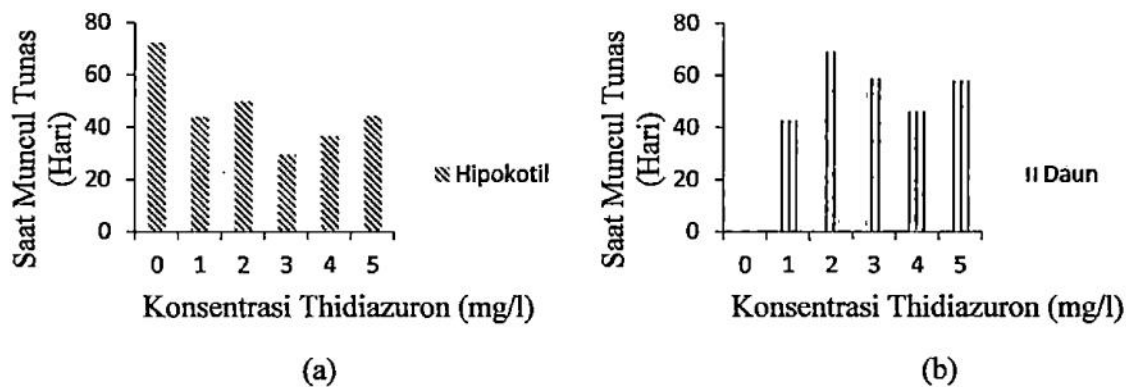
Menurut Gaspar *et.al.* (1987) dalam Ajjiah *dkk.*, (2010) terjadinya vitrifikasi dapat didorong oleh keadaan kandungan air yang tinggi pada media (pemakaian media cair), tingginya kandungan ion NH_4^+ pada media (pemakaian media MS) dan pemakaian sitokinin serta auksin. Namun demikian Gu *et al.*, (1987) dalam Ajjiah *dkk.*,(2010) memperoleh kalus vanili dari eksplan potongan daun dengan pemakaian sitokinin tanpa mengalami vitrifikasi pada media Linsmaier dan Skoog (LS) yang dimodifikasi.

E. Saat Muncul Tunas

Tunas adventif merupakan tunas yang berasal dari sel atau jaringan eksplan yang sebelumnya tidak mempunyai mata tunas (Yusnita, 2004 dalam Andaryani, 2010). Terbentuknya tunas menunjukkan keberhasilan regenerasi eksplan yang

diinokulasi pada medium kultur *in vitro*. Tunas adventif mulai terbentuk pada 20-30 HST. Pembentukan tunas adventif dimulai dengan pembentukan kalus pada pangkal batang yang tertanam dalam medium regenerasi. Kalus ini tumbuh dan berkembang, yang selanjutnya diikuti dengan pembentukan tunas adventif (Rohayati, 2012). Tunas terbentuk melalui fase organogenesis langsung dan tidak langsung. Fase organogenesis tidak langsung diawali pembengkakan eksplan kemudian eksplan membentuk kalus dan tumbuh tunas sedangkan fase organogenesis langsung, eksplan membengkak kemudian tumbuh tunas. Organogenesis dapat dipengaruhi oleh komponen nutrisi yang terkandung dalam medium atau pun zat pengatur tumbuh endogen dan eksogen. Rasio penggunaan sitokinin yang lebih tinggi dari auksin yang menginduksi eksplan ke arah pembentukan tunas.

Hasil pengamatan saat muncul tunas disajikan pada gambar 6.



Gambar 6. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Saat Muncul Tunas Sarang Semut (a) Eksplan Hipokotil (b) Eksplan Daun

Berdasarkan gambar 6 a dan 6 b, diketahui bahwa saat bertunas terjadi antara 29,4 – 72 hari. Semua perlakuan menumbuhkan tunas kecuali eksplan daun pada perlakuan daun + 0 mg/l Thidiazuron yang tidak menumbuhkan tunas.

Eksplan yang berasal dari hipokotil lebih cepat tumbuh tunasnya dibandingkan dengan eksplan yang berasal dari daun (gambar 6 a). Hal ini diduga karena berbeda serapan nutrisi pada eksplan hipokotil dan daun. Eksplan hipokotil lebih maksimal dan cepat dalam penyerapan nutrisi karena luka eksplan oleh pemotongan lebih luas sehingga jumlah nutrisi yang terserap pun lebih banyak. Selain itu cepatnya eksplan hipokotil bertunas diduga karena eksplan hipokotil mempunyai ketiak akar atau batang sehingga tunas muncul dari ketiak akar atau batang dan eksplan hipokotil masih bersifat meristematik. Penggunaan eksplan yang bersifat meristematik memberikan keberhasilan pembentukan embrio somatik yang lebih tinggi (Ragapadmi, 2002). Jaringan meristematis yang memiliki pertumbuhan cepat atau berada pada tahap awal pertumbuhan sangat baik dipergunakan sebagai eksplan dalam kultur *in vitro*. Selain itu, jaringan tanaman yang masih muda memiliki daya regenerasi lebih tinggi dibandingkan jaringan tua, karena sel-selnya masih aktif membelah diri dan relatif mengandung sedikit kontaminan (Yusnita, 2004 *dalam* Andaryani, 2010).

Gambar 6 a dan 6 b menunjukkan semua perlakuan memunculkan tunas kecuali pada perlakuan daun + 0 mg/l Thidiazuron (gambar 6 b) . Tunas pada eksplan daun dalam medium yang mengandung 0 mg/l Thidiazuron tidak tumbuh, diduga karena tidak adanya sitokinin eksogen dan endogen pada eksplan daun. Penggunaan Thidiazuron meningkatkan kemampuan multiplikasi tunas. Sementara pada eksplan hipokotil sudah ada sitokinin endogen. Suwarsono (1986) *dalam* Fathurrahman *dkk.*, (2014) menyatakan, bahwa konsentrasi sitokinin endogen pada bagian batang tanaman adalah tinggi. Hal ini sesuai penelitian

Salisbury dan Ross (1995) *dalam* Ristiana (2007) bahwa eksplan yang berasal dari irisan batang yang sedang memanjang tidak memerlukan sitokinin eksogen karena sitokinin endogen dalam jaringan nya sudah mencukupi. Supriyadi (2014) menyatakan bahwa saat muncul tunas sarang semut dari eksplan biji terjadi antara 12,2 – 20,8 hari.

F. Persentase Eksplan Bertunas

Persentase eksplan bertunas adalah jumlah eksplan yang membentuk tunas dalam medium perlakuan dengan penambahan ZPT. Persentase eksplan bertunas pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Persentase Eksplan Bertunas Sarang Semut pada Minggu ke - 6 dan 12

Perlakuan	Persentase Eksplan Bertunas (%)	
	Minggu ke - 6	Minggu ke -12
Hipokotil	53,33	86,66
Daun	40	76,66
0 mg/l Thidiazuron	10	50
1 mg/l Thidiazuron	70	100
2 mg/l Thidiazuron	20	80
3 mg/l Thidiazuron	60	60
4 mg/l Thidiazuron	70	100
5 mg/l Thidiazuron	50	100

Keterangan : Semua medium ditambahkan NAA 0,5 mg/l

Berdasarkan data tabel 6 eksplan hipokotil cenderung lebih tinggi persentase bertunasnya pada 6 dan 12 MST. Penggunaan eksplan hipokotil cenderung responsif memunculkan tunas dari pada daun, hal ini diduga eksplan yang berasal dari hipokotil sudah ada sitokinin endogennya sehingga walaupun tidak ditambah sitokinin eksogen akan memunculkan tunas. Hal ini sesuai pernyataan Salisbury dan Ross (1995) *dalam* Ristiana (2007) bahwa eksplan yang

berasal dari irisan batang yang sedang memanjang tidak memerlukan sitokinin eksogen karena sitokinin endogen dalam jaringannya sudah mencukupi.

Rendahnya eksplan bertunas pada 6 MST dan 12 MST pada perlakuan 0 mg/l Thidiazuron disebabkan tidak adanya thidiazuron yang dikombinasikan dengan NAA. Wattimena (1992) menjelaskan bahwa pembentukan tunas adventif terjadi karena pemberian sitokinin dengan konsentrasi yang tinggi tanpa auksin atau dengan auksin dalam konsentrasi yang rendah. Hal ini didukung oleh Pierik (1998) dalam Ristiana (2007) bahwa sitokinin dalam konsentrasi tinggi (1- 10 mg/l) dapat menginduksi pembentukan tunas adventif tetapi pembentukan akar akan terhambat. Penelitian Budi (2014) menyebutkan bahwa perlakuan 0,5 mg/l NAA secara tunggal memberikan hasil terbaik terhadap panjang akar sedangkan kombinasi perlakuan 0,5 mg/l NAA dan 0,5 mg/l Thidiazuron dapat memberikan jumlah tunas dalam jumlah yang banyak dari semua perlakuan. Selain itu penggunaan eksplan juga berpengaruh, eksplan daun diduga tidak memiliki sitokinin endogen sehingga sel atau kalus dari eksplan daun tidak berdiferensiasi menjadi tunas tanpa adanya sitokinin dalam media tumbuh.

Data pada tabel 6 menunjukkan bahwa persentase bertunas tertinggi eksplan hipokotil saat 6 MST sebesar 53,33% dan penambahan Thidiazuron persentase tertinggi pada 1 mg/l Thidiazuron sebesar 70 %. Hal ini diduga karena sifat ZPT yang efektif bekerja pada konsentrasi rendah dan akan menghambat apabila dalam konsentrasi yang terlalu tinggi, penggunaan thidiazuron dengan konsentrasi rendah bekerja cepat dari pada konsentrasi tinggi. Swandra *dkk.*, (2012) menyatakan bahwa penggunaan Thidiazuron 0,375 mg/l merupakan

konsentrasi optimum dalam menginduksi tunas andalas (*Morus macroua* Miq. var. *macroua*). Persentase eksplan bertunas dari eksplan hipokotil menunjukkan persentase tertinggi sebesar 86,66 pada 12 MST dan penggunaan Thidiazuron menghasilkan persentase tertinggi pada 1 mg/l Thidiazuron, 4 mg/l Thidiazuron dan 5 mg/l Thidiazuron sebesar 100%. Hal ini didukung oleh Pierik (1998) dalam Ristiana (2007) bahwa sitokinin dalam konsentrasi tinggi (1- 10 mg/l) dapat menginduksi pembentukan tunas adventif tetapi pembentukan akar akan terhambat. Khawar *et al.* (2003) dalam Rosdiana (2010) menyatakan bahwa Thidiazuron adalah senyawa mirip sitokinin yang dapat menginduksi perbanyakan tunas dalam jumlah yang lebih banyak dan dalam waktu yang lebih singkat.

G. Jumlah Tunas

Banyaknya tunas yang terbentuk dalam satu perlakuan menunjukkan respon terhadap pemberian ZPT. Pengamatan jumlah tunas untuk mengetahui seberapa efektif ZPT yang bisa diberikan pada suatu perlakuan. Penambahan jumlah tunas merupakan salah satu parameter yang dapat diukur secara kuantitatif, dan merupakan indikator keberhasilan kultur *in vitro*. Pertumbuhan tunas tidak hanya dipengaruhi oleh hormon sitokinin dan unsur hara yang tersedia, akan tetapi setiap tanaman juga memiliki hormon endogen yang akan mempengaruhi pertumbuhan tunas. Hasil analisis sidik ragam jumlah tunas disajikan pada tabel 7.

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam jumlah tunas (tabel 7 dan lampiran 3) menunjukkan tidak ada interaksi atau tidak ada saling pengaruh antara konsentrasi Thidiazuron dan eksplan terhadap jumlah tunas pada minggu ke-6 dan

12. Tidak adanya interaksi dapat diartikan bahwa penggunaan jenis eksplan dengan berbagai konsentrasi tidak saling mempengaruhi jumlah tunas yang tumbuh.

Tabel 7. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Rerata Jumlah Tunas Sarang Semut pada 6 dan 12 MST

Perlakuan	Jumlah Tunas	
	Minggu ke - 6	Minggu ke- 12
Hipokotil	1,23 a	9,18 a
Daun	1,51 a	13,24 a
0 mg /l Thidiazuron	0,42 p	2,71 r
1 mg /l Thidiazuron	1,70 p	14,80 pq
2 mg /l Thidiazuron	0,40 p	14,88 pq
3 mg /l Thidiazuron	1,80 p	15,33 p
4 mg /l Thidiazuron	2,30 p	10,60 pq
5 mg /l Thidiazuron	1,30 p	8,00 q
interaksi	(-)	(-)

Keterangan : Semua medium ditambah NAA 0,5 mg/l

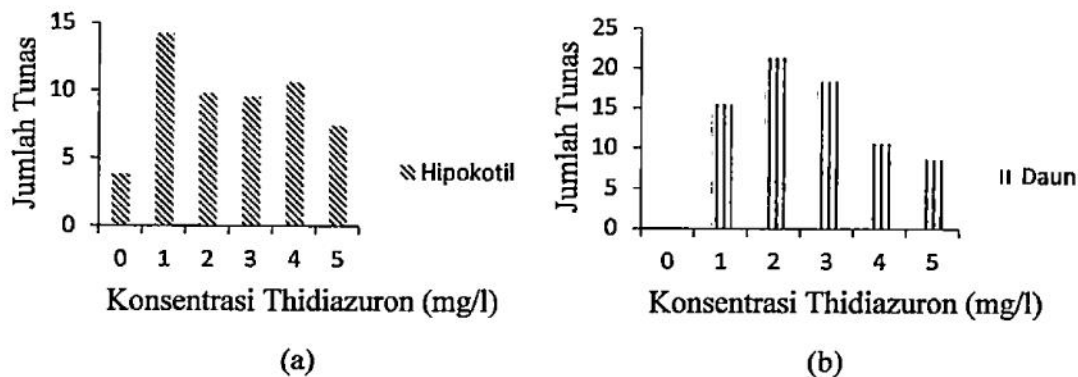
Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak beda nyata menurut UJGD pada taraf 5 %

(+) ada interaksi

(-) tidak ada interaksi

Hasil sidik ragam jumlah tunas (tabel 7 dan lampiran 3) menunjukkan bahwa penggunaan jenis eksplan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah tunas yang dihasilkan pada 6 dan 12 MST, tetapi jumlah tunas yang tumbuh pada eksplan daun cenderung lebih banyak dari pada eksplan hipokotil. Eksplan daun memberikan rata-rata jumlah tunas sebesar 1,51 tunas pada 6 MST dan 13,24 tunas pada 12 MST. Eksplan daun cenderung lebih baik dalam menumbuhkan tunas, hal ini didukung pernyataan Ramadiana (2004) bahwa eksplan yang berasal dari kotiledon dan daun muda memiliki potensi untuk membentuk tunas yang lebih banyak dibandingkan dengan jenis eksplan lainnya.

Hasil sidik ragam jumlah tunas (tabel 7 dan lampiran 3) menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi Thidiazuron memberikan pengaruh tidak nyata terhadap jumlah tunas yang dihasilkan pada 6 MST tetapi berbeda nyata pada 12 MST. Perlakuan 3 mg/l Thidiazuron (15,33 tunas) menghasilkan jumlah tunas lebih banyak dari pada 5 mg/l Thidiazuron (8,00 tunas) dan 0 mg/l Thidiazuron (2,714 tunas). Penggunaan Thidiazuron memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah tunas pada minggu 12 MST, hal ini dikarenakan eksplan perlu waktu lebih lama untuk merespon thidiazuron yang ditambahkan ke media. Hasil pengamatan jumlah tunas pada 12 MST disajikan pada gambar 7.



Gambar 7a. Pengaruh Eksplan Hipokotil dan Thidiazuron terhadap Jumlah Tunas Sarang Semut pada 12 MST. 7b. Pengaruh Eksplan Daun dan Thidiazuron terhadap Jumlah Tunas Sarang Semut pada 12 MST

Dilihat dari gambar 7a, pada eksplan hipokotil tren penggunaan Thidiazuron 0 mg/l – 1 mg/l semakin tinggi konsentrasi semakin banyak jumlah tunas yang tumbuh akan tetapi pada penggunaan 2 mg/l – 3 mg/l Thidiazuron jumlah tunas lebih sedikit dari pada 1 mg/l Thidiazuron, pada 4 mg/l Thidiazuron jumlah tunas lebih banyak dan pada 5 mg/l Thidiazuron jumlah tunas lebih sedikit dari pada 4 mg/l Thidiazuron. Hal ini diduga penggunaan Thidiazuron optimum

untuk multiplikasi tunas 1 mg/l thidiazuron, semakin tinggi penggunaan Thidiazuron lebih dari 2 mg/l maka jumlah tunas yang termultiplikasi semakin sedikit. Hal ini didukung Lee and Lee (2003) dalam Kusmianto (2008) meneliti pertunasan dengan menggunakan eksplan kalus *Cypripedium formosanum* menunjukkan bahwa perlakuan 1 mg/l Thidiazuron menghasilkan jumlah tunas terbanyak. Supriyadi (2014) juga melaporkan bahwa jumlah tunas terbaiknya dari eksplan biji sarang semut adalah perlakuan 1 mg/l Thidiazuron + NAA 0,1 mg/l menghasilkan jumlah tunas sebesar 1,4 tunas.

Gambar 7b menunjukkan bahwa pada eksplan daun, penggunaan Thidiazuron 1 – 2 mg/l, semakin tinggi konsentrasi Thidiazuron cenderung semakin banyak tunas jumlah yang tumbuh tetapi pada 3 – 5 mg/l Thidiazuron jumlah tunas semakin menurun, ini diduga konsentrasi Thidiazuron optimum untuk multiplikasi 2 mg/l Thidiazuron. Perlakuan 0 mg/l Thidiazuron tidak ada tunas yang terbentuk, hal ini diduga karena kandungan sitokinin endogen pada eksplan tidak mampu untuk menginduksi tunas atau tidak adanya sitokinin eksogen yang dikombinasikan dengan NAA. Hal ini didukung pernyataan Wattimena (1992) yang menjelaskan bahwa pembentukan tunas adventif terjadi karena pemberian sitokinin dengan konsentrasi yang tinggi tanpa auksin atau dengan auksin dalam konsentrasi yang rendah. Penurunan jumlah tunas pada penggunaan 3-5 mg/l Thidiazuron diduga karena sitokinin melebihi batas optimum sehingga menghambat pembentukan tunas bahkan penggunaan yang terlalu tinggi akan menjadi toksik bagi eksplan itu sendiri. Pemberian zat pengatur tumbuh dapat mempercepat pertumbuhan dan perkembangan eksplan sampai pada

dosis tertentu, dosis terlalu tinggi tidak akan memberi efek positif (Aslamyah, 2002 *dalam* Sudrajad, 2012).

Eksplan daun memberikan jumlah tunas terbanyak yaitu 13,24 tunas (tabel 7), hal ini sesuai dengan pernyataan Ramadiana (2004) bahwa eksplan yang berasal dari kotiledon dan daun muda memiliki potensi untuk membentuk tunas yang lebih banyak dibandingkan dengan jenis eksplan lainnya. Perlakuan 3 mg/l Thidiazuron memberikan jumlah tunas terbanyak yaitu 15,33 tunas (tabel 7). Hal ini didukung penelitian Ristiana (2007) pada multiplikasi tunas *piretrum* dengan konsentrasi 3 mg/l Thidiazuron menginduksi tunas terbanyak (7,6 tunas). Perlakuan 0 mg/l Thidiazuron memberikan jumlah tunas terendah yaitu 2,714 tunas. Rendahnya tunas pada perlakuan ini karena ke dalam medium tidak ditambahkan Thidiazuron, Thidiazuron berperan dalam pembelahan sel dan menghasilkan tunas yang banyak. Hal ini di dukung Khawar *et al.*, (2003) *dalam* Rosdiana (2010) bahwa Thidiazuron adalah senyawa mirip sitokinin yang dapat menginduksi perbanyak tunas dalam jumlah yang lebih banyak.



(a)



(b)

Gambar 8. Jumlah Tunas Sarang Semut (a) Minggu ke-6 (b) Minggu ke-12

H. Tinggi Tunas

Tinggi tunas merupakan ukuran tanaman yang sering diamati baik sebagai indikator pertumbuhan maupun sebagai peubah yang digunakan untuk mengukur pengaruh lingkungan atau perlakuan yang diterapkan. Hal ini didasarkan atas kenyataan bahwa tinggi tunas merupakan ukuran pertumbuhan yang paling mudah dilihat. Menurut Heddy (1991) *dalam* Anwar (2007) penambahan tinggi eksplan disebabkan oleh dua proses, yaitu pembelahan dan pemanjangan sel. Kedua proses ini terjadi pada jaringan meristem, yaitu pada titik tumbuh batang. Hasil pengamatan persentase tinggi tunas pada 6 MST dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Rerata Tinggi Tunas Sarang Semut pada 6 MST

Perlakuan	Tinggi Tunas (mm)
Hipokotil	2,1 a
Daun	1,5 a
0 mg/l Thidiazuron	0,4 p
1 mg/l Thidiazuron	3,1 p
2 mg/l Thidiazuron	0,7 p
3 mg/l Thidiazuron	2,5 p
4 mg/l Thidiazuron	2,0 p
5 mg/l Thidiazuron	2,0 p
interaksi	(-)

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak beda nyata menurut UJGD pada taraf 5 %
 (+) ada interaksi
 (-) tidak ada interaksi

Berdasarkan sidik ragam tinggi tunas (lampiran 3) pada minggu ke-6 data tabel 8 menunjukkan tidak ada interaksi atau saling pengaruh antara eksplan dan konsentrasi Thidiazuron serta tidak ada beda nyata antar perlakuan.

Berdasarkan hasil sidik ragam tinggi tunas (tabel 8 dan lampiran 3) jenis eksplan tidak menunjukkan pengaruh nyata terhadap tinggi tunas sarang semut pada 6 MST tetapi tinggi eksplan hipokotil cenderung menunjukkan lebih tinggi dari pada eksplan daun. Eksplan hipokotil memberikan rata-rata tinggi tunas sebesar 2,1 mm sedangkan pada eksplan daun memberikan rata-rata tinggi tunas sebesar 1,5 mm. Hal ini dikarenakan eksplan hipokotil merupakan tempat biasa tunas tumbuh dan eksplan hipokotil masih melakukan pemanjangan sehingga tunas yang tumbuh di eksplan hipokotil akan cenderung lebih tinggi dari pada eksplan daun.

Berdasarkan hasil sidik ragam tinggi tunas (tabel 8 dan lampiran 3), penggunaan berbagai konsentrasi Thidiazuron tidak memberikan pengaruh nyata terhadap tinggi tunas sarang semut pada 6 MST. Penggunaan Thidiazuron 1 mg/l Thidiazuron cenderung memberikan hasil lebih baik sebesar 3,1 mm. Dilihat dari tabel 8, konsentrasi Thidiazuron dengan konsentrasi tinggi cenderung menghasilkan tinggi tunas semakin rendah. Ini diduga karena efek sitokinin menekan aktivitas auksin. Ini sesuai pernyataan Isnaeni (2008) bahwa Thidiazuron merupakan sitokinin yang juga bersifat merangsang multiplikasi tunas dalam konsentrasi rendah dan dapat menghasilkan tunas kerdil dengan kualitas rendah pada konsentrasi yang tinggi, semakin tinggi konsentrasi Thidiazuron yang diberikan dapat mengurangi tinggi tanaman. Hal ini didukung Swandra *dkk.*, (2012), rendahnya tinggi tunas diduga akibat dari aktivitas Thidiazuron sendiri yaitu peningkatan Thidiazuron akan memperbanyak tunas yang dihasilkan sehingga menekan aktivitas auksin dalam pemanjangan sel.

Thidiazuron akan memperbanyak tunas yang dihasilkan sehingga menekan aktivitas auksin dan hormon endogen lainnya dalam elongasi batang dan menyebabkan tanaman terlihat roset.

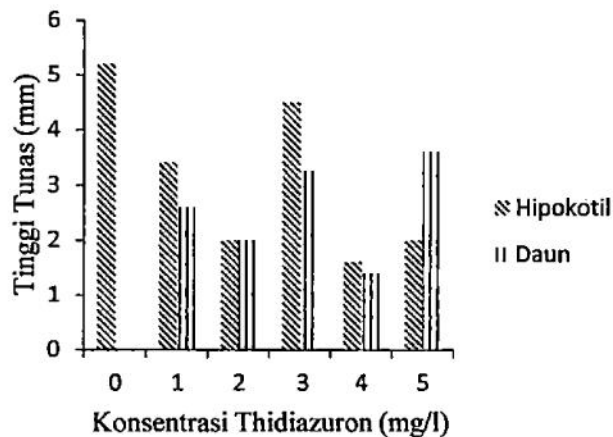
Hasil pengamatan tinggi tunas pada 12 MST disajikan pada tabel 9.

Tabel 9. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Rerata Tinggi (mm) Tunas Sarang Semut pada 12 MST

Eksplan	Thidiazuron (mg/l)						Rerata
	0	1	2	3	4	5	
Hipokotil	5,20 a	3,40abc	2,00 c	4,50 ab	1,60 c	2,00 bc	2,96
Daun	0,00 d	2,60 abc	2,00 bc	3,25abc	1,40 c	3,60 abc	2,36
Rerata	3,71	3,00	2,00	3,66	1,50	2,80	(+)

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak beda nyata menurut UJGD pada taraf 5 %
 (+) ada interaksi
 (-) tidak ada interaksi

Hasil pengamatan tinggi tunas pada 12 MST disajikan pada gambar 9.



Gambar 9. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Rerata Tinggi Tunas Sarang Semut pada 12 MST

Hasil sidik ragam tinggi tunas (tabel 9 lampiran 4) menunjukkan ada interaksi antara jenis eksplan dan konsentrasi Thidiazuron pada 12 MST. Adanya

interaksi antara jenis eksplan dan konsentrasi Thidiazuron dapat diartikan bahwa penggunaan jenis eksplan dengan berbagai konsentrasi Thidiazuron akan saling mempengaruhi tinggi tunas yang tumbuh. Eksplan hipokotil dalam medium yang mengandung 0 mg/l Thidiazuron cenderung memberikan tunas tertinggi (5,2 mm) namun tidak berbeda nyata dengan hipokotil dalam medium yang mengandung 1 mg/l Thidiazuron dan 3 mg/l Thidiazuron serta daun dalam medium dengan penambahan 1 mg/l Thidiazuron, 3 mg/l Thidiazuron dan 5 mg/l Thidiazuron (gambar 9).

Gambar 9 menunjukkan bahwa pada eksplan hipokotil pada penggunaan 0-2 mg/l Thidiazuron semakin tinggi konsentrasi Thidiazuron semakin rendah tinggi tunas yang terbentuk, pada 3 mg/l Thidiazuron tinggi tunas lebih tinggi dari 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l dan 5 mg/l Thidiazuron dan pada konsentrasi 4 dan 5 mg/l Thidiazuron tinggi tunas lebih rendah dari pada 1mg/l dan 4 mg/l Thidiazuron. Eksplan daun penggunaan 1-2 mg/l semakin tinggi konsentrasi Thidiazuron semakin rendah tunas yang terbentuk, pada 3 mg/l Thidiazuron tinggi tunas lebih tinggi dari pada 1,2 dan 4 mg/l Thidiazuron dan pada konsentrasi 5 mg/l Thidiazuron tinggi tunas lebih tinggi dari pada 1mg/l,2 mg/l,3 mg/l dan 4 mg/l Thidiazuron.

Penggunaan jenis eksplan dan konsentrasi Thidiazuron berpengaruh terhadap tinggi tunas yang tumbuh. Pernyataan Salisbury dan Ross (1995) *dalam* Ristiana (2007) menunjukkan bahwa jika irisan batang atau akar ditumbuhkan secara *in vitro* dengan penambahan sitokinin, maka pemanjangan batang hampir selalu terhambat. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa batang yang

sedang memanjang tidak memerlukan sitokinin karena sitokinin endogen dalam jaringan nya sudah mencukupi.

Tingginya tunas pada perlakuan hipokotil + 0 mg/l Thidiazuron (5,2 mm) (gambar 10 b) dikarenakan pada perlakuan ini tidak ditambahkan Thidiazuron atau tanpa Thidiazuron. Thidiazuron berperan dalam pembelahan sel dan menghasilkan tunas yang banyak sehingga akan menekan aktivitas auksin dalam pemanjangan sel. Hal ini didukung Swandra *dkk.*, (2012) rendah nya tinggi tunas diduga akibat dari aktivitas Thidiazuron sendiri bahwa peningkatan Thidiazuron akan memperbanyak tunas yang dihasilkan sehingga menekan aktivitas auksin dalam pemanjangan sel. Thidiazuron akan memperbanyak tunas yang dihasilkan sehingga menekan aktivitas auksin dan hormon endogen lainnya dalam elongasi batang dan menyebabkan tanaman terlihat roset. Oleh karena itu, ketiadaan Thidiazuron pada perlakuan ini menyebabkan eksplan cenderung menghasilkan tunas tertinggi. Al-Wasel (2000) dalam Isnaeni (2008) menyatakan bahwa Thidiazuron mampu menginduksi tunas tetapi menghambat pertumbuhan tanaman. Hal ini didukung oleh Salisbury dan Ross (1995) dalam Ristiana (2007) bahwa efek negatif sitokinin terhadap pemanjangan batang bersifat tidak langsung. Salah satu sifat sitokinin adalah merangsang pembentukan etilen yang mempunyai efek menghambat pemanjangan batang. Supriyadi (2014) menyatakan bahwa eksplan biji sarang semut memberikan tinggi tunas terbaik (41,6 mm) pada perlakuan 0 mg/l Thidiazuron.



(a)

(b)

Gambar 10. Tinggi Tunas Sarang Semut (a) Minggu ke- 6 (b) Minggu ke -12

I. Jumlah Daun

Jumlah daun adalah jumlah keseluruhan daun yang tumbuh pada tiap perlakuan yang diujicobakan. Hasil pengamatan jumlah daun dapat dilihat pada tabel 10.

Data pada tabel 10 dan hasil analisis sidik ragam jumlah daun (lampiran 4) pada 12 MST menunjukkan tidak ada interaksi atau tidak ada saling pengaruh antara konsentrasi thidiazuron dan jenis eksplan terhadap jumlah daun. Penggunaan jenis eksplan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah daun yang terbentuk pada 6 dan 12 MST (tabel 10 dan lampiran 4), tetapi jumlah daun yang tumbuh pada eksplan daun cenderung lebih banyak dari pada eksplan hipokotil (Gambar 11 a). Eksplan daun memberikan rata-rata jumlah daun sebesar 2,48 lembar pada 6 MST dan rata-rata jumlah tunas sebesar 21,52 lembar pada 12 MST (tabel 10). Jumlah daun pada eksplan daun cenderung banyak dikarenakan korelasi antara jumlah tunas yang tumbuh. Syahid dan Kristina (2008) pada kultur *in vitro* daun encok menyatakan bahwa produksi daun berhubungan erat

dengan jumlah tunas yang dihasilkan. Makin banyak jumlah tunas semakin banyak pula jumlah daun yang diperoleh.

Tabel 10. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Rerata Jumlah Daun Sarang Semut pada 6 dan 12 MST

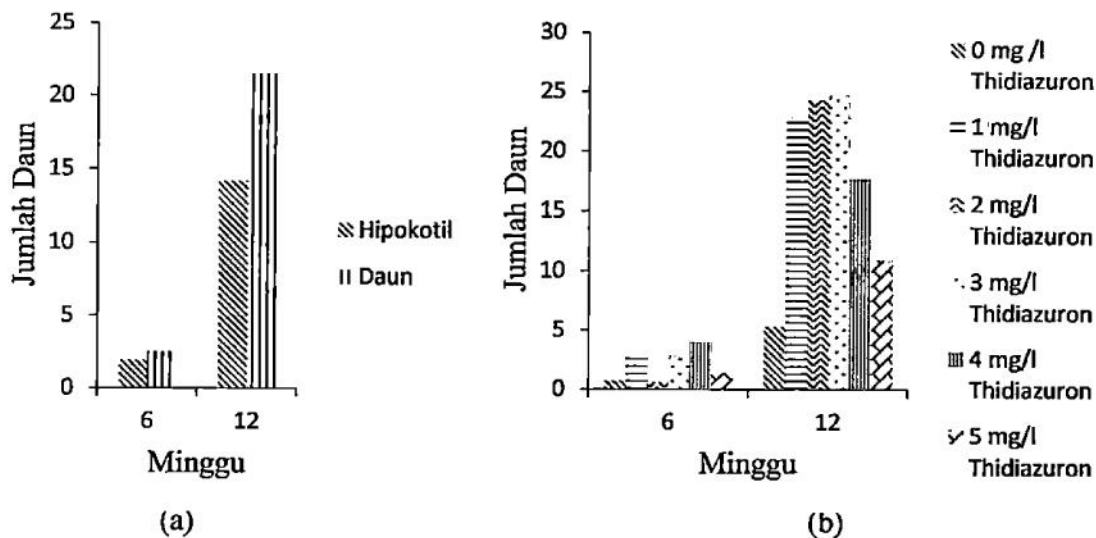
Perlakuan	Jumlah Daun	
	Minggu ke-6	Minggu ke-12
Hipokotil	1,90 a	14,14a
Daun	2,48a	21,52 a
0 mg/l Thidiazuron	0,71 q	5,28 r
1 mg/l Thidiazuron	3,00 pq	22,90 pq
2 mg/l Thidiazuron	0,60 q	24,33 pq
3 mg/l Thidiazuron	2,90 pq	24,83 p
4 mg/l Thidiazuron	4,00 p	17,70 pq
5 mg/l Thidiazuron	1,40 pq	10,90 qr
Interaksi	(-)	(-)

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak beda nyata menurut UJGD pada taraf 5 %
 (+) ada interaksi
 (-) tidak ada interaksi

Berdasarkan tabel 10 jumlah daun pada 6 MST yang terbaik yaitu pada perlakuan 4 mg/l thidiazuron tetapi tidak beda nyata dengan perlakuan 1 mg/l thidiazuron, 3 mg/l thidiazuron dan 5 mg/l thidiazuron. Jumlah daun pada 12 MST terbaik yaitu pada perlakuan 3 mg/l Thidiazuron tetapi tidak beda nyata dengan perlakuan 1 mg/l , 2 mg/l dan 4 mg/l Thidiazuron. Jumlah daun yang tumbuh berbanding lurus dengan penambahan Thidiazuron yang diberikan tetapi pada konsentrasi tinggi mengalami penurunan. Penelitian Syahid dan Kristina (2008) menyebutkan bahwa meningkatnya jumlah daun yang dihasilkan berhubungan erat dengan penambahan Thidiazuron ke dalam media perlakuan, tanpa pemberian Thidiazuron atau Thidiazuron rendah (0,1 mg/l) pada tanaman encok

menghasilkan jumlah daun yang lebih sedikit dibandingkan dengan penggunaan konsentrasi yang lebih tinggi.

Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Jumlah Daun Sarang Semut pada 6 dan 12 MST disajikan pada gambar 11.



Gambar 11. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Jumlah Daun Sarang Semut (a) Eksplan Hipokotil dan Daun pada 6 dan 12 MST (b) Konsentrasi Thidiazuron pada 6 dan 12 MST.

Gambar 11 a menunjukkan pada minggu ke-6 dan 12 bahwa penggunaan eksplan daun cenderung memberikan jumlah daun yang terbentuk lebih banyak dari pada eksplan hipokotil. Gambar 11 b menunjukkan pada minggu ke-6 ada tren dari perlakuan 0-1 mg/l Thidiazuron semakin tinggi konsentrasi Thidiazuron semakin banyak jumlah daun yang terbentuk, perlakuan 2 mg/l Thidiazuron jumlah tunas yang terbentuk lebih sedikit dari pada 1 mg/l, 3 mg/l, 4 mg/l dan 5 mg/l Thidiazuron, dan pada konsentrasi 3-4 mg/l ada tren konsentrasi Thidiazuron semakin tinggi semakin banyak jumlah daun yang terbentuk sementara pada 5

mg/l Thidiazuron jumlah daun yang terbentuk semakin berkurang lebih sedikit dari perlakuan 1,3 dan 4 mg/l Thidiazuron. Pada minggu ke-12 ada tren peningkatan dari perlakuan 0 - 3 mg/l Thidiazuron, semakin tinggi konsentrasi Thidiazuron semakin banyak jumlah daun yang terbentuk, pada perlakuan 4-5 mg/l Thidiazuron semakin tinggi konsentrasi maka semakin sedikit jumlah daun yang terbentuk dan jumlah daun lebih sedikit dari pada 1 mg/l, 2 mg/l dan 3 mg/l.

Pemberian zat pengatur tumbuh dapat mempercepat pertumbuhan dan perkembangan eksplan sampai pada dosis tertentu, dosis terlalu tinggi atau terlalu rendah tidak akan memberi efek positif (Aslamyah, 2002 *cit.* Sudrajad 2012). Wetherell (1982) menambahkan, bahwa kombinasi antara sitokinin dan auksin harus mempertimbangkan kadar maupun perbandingannya dalam media, perbandingan antara sitokinin dan auksin yang tinggi baik untuk pembentukan daun, sedangkan perbandingan yang rendah baik untuk pembentukan akar. Hasil penelitian (Supriyadi, 2014) menunjukkan sumber eksplan biji menghasilkan daun terbanyak sebesar 2,2 lembar pada media dengan penambahan 0 mg/l Thidiazuron + 0,1 NAA.

J. Warna Tunas

Indikator perkembangan eksplan pada budidaya *in vitro* berupa warna tunas merupakan gambaran visual tunas sehingga dapat diketahui bahwa tunas yang terbentuk sel-sel-nya masih aktif membelah atau mati. Hasil pengamatan warna tunas disajikan pada tabel 11.

Berdasarkan tabel 11, warna tunas pada semua perlakuan menunjukkan kondisi tunas dengan warna normal. Warna tunas dari mulai hijau muda, hijau

cerah sampai hijau. Persentase warna tunas (tabel 11) menunjukkan bahwa semakin tinggi persentase warna tunas maka warna tunas semakin hijau.

Data pada tabel 11 menunjukkan pada minggu ke-6 hampir semua warna tunas berwarna hijau cerah dan hijau berubah menjadi hijau muda serta hijau cerah pada minggu ke-12. Persentase warna tunas menunjukkan bahwa semakin tinggi persentase warna tunas maka semakin hijau warna tunasnya. Perubahan warna hijau menunjukkan bahwa eksplan tumbuh dengan baik dan merespon Thidiazuron yang diberikan. Persentase warna tunas tertinggi pada 6 MST yaitu pada perlakuan 4 mg/l Thidiazuron sebesar 66,6 % dan persentase warna tertinggi pada 12 MST yaitu pada perlakuan 4 mg/l Thidiazuron sebesar 100 %. Perubahan warna ini terjadi diduga karena pengaruh pemberian sitokinin, pemberian Thidiazuron berpengaruh terhadap terbentuknya klorofil pada daun. Pemberian thidiazuron mempengaruhi jumlah mRNA yang menyediakan beberapa protein yang mengikat klorofil sehingga warna tunas berubah (Cholif, 2007 *cit.* Supiyadi, 2014).

Tabel 11. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Warna Tunas Sarang Semut pada 6 dan 12 MST

Perlakuan	Warna Tunas (%)	
	Skoring Minggu ke-6	Skoring Minggu ke-12
Hipokotil	50	66,6
Daun	33,3	61,6
0 mg/l Thidiazuron	8,3	41,66
1 mg/l Thidiazuron	58,3	73,3
2 mg/l Thidiazuron	20	66,6
3 mg/l Thidiazuron	58,3	45
4 mg/l Thidiazuron	66,6	100
5 mg/l Thidiazuron	48,3	91,6

Keterangan : Semua medium ditambahkan NAA 0,5 mg/l

K. Saat Muncul Kalus

Kalus merupakan sekumpulan sel yang mengalami pembelahan secara tidak teratur. Kalus dapat terbentuk secara alami oleh semua tanaman yang dikulturkan dan merupakan salah satu cara perlindungan tanaman terhadap luka yang ditumbuhkan pada saat proses pemotongan. Peristiwa pengkalusan dapat juga terjadi bila tanaman mengalami stres (Fitrianti, 2006).

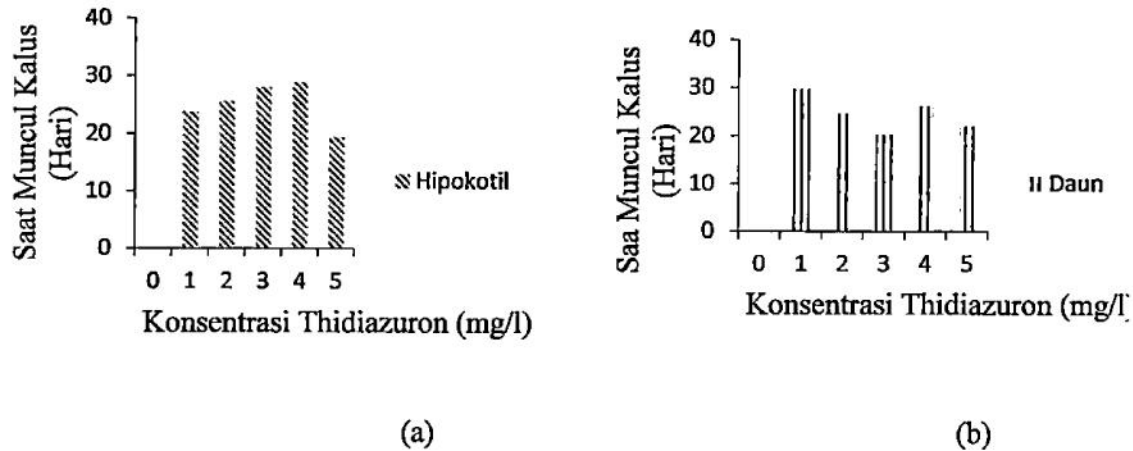
Pembentukan kalus merupakan salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro*. Lama atau tidaknya eksplan membentuk kalus tergantung dari bagian tanaman yang dipakai sebagai eksplan serta komposisi medium induksi yang digunakan.

Pembentukan kalus terjadi karena adanya pelukaan yang diberikan pada eksplan, sehingga sel-sel pada eksplan akan memperbaiki sel-sel yang rusak tersebut. Pada awalnya terjadi pembentangan dinding sel dan penyerapan air, sehingga sel akan membengkak selanjutnya terjadi pembelahan sel. Sel melakukan aktivitas metabolik tersebut membutuhkan energi. Sukrosa yang ditambahkan dalam medium, akan menjadi sumber energi sel-sel eksplan, sehingga sel dapat mengalami pembentangan dan pembelahan selanjutnya akan membentuk kalus.

Berdasarkan Gambar 12, diketahui bahwa pembentukan kalus terjadi antara 19,4 – 29,6 hari. Semua perlakuan menumbuhkan kalus kecuali pada perlakuan hipokotil + 0 mg/l Thidiazuron dan daun + 0 mg/l Thidiazuron. Eksplan yang berasal dari daun cenderung lebih cepat tumbuh kalus dibandingkan dengan eksplan yang berasal dari hipokotil (gambar 12). Ini sesuai pernyataan Santoso

(1995) dalam Khoiriah (2009) bahwa macam eksplan sangat mempengaruhi kecepatan membentuk kalus. Eksplan daun mempunyai kemampuan tumbuh lebih cepat dibandingkan eksplan batang utama, atau tangkai bunga.

Hasil pengamatan saat muncul kalus disajikan pada gambar 12.



Gambar 12. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Munculnya Kalus Sarang Semut (a) Eksplan Hipokotil (b) Eksplan Daun

Gambar 12 a, menunjukkan pada eksplan hipokotil, pada penggunaan 1-4 mg/l Thidiazuron, semakin tinggi konsentrasi Thidiazuron, semakin lambat kalus yang terbentuk dan pada konsentrasi 5 mg/l Thidiazuron kalus yang tumbuh lebih cepat dari pada 1, 2, 3 dan 4 mg/l Thidiazuron. Gambar 12 b, menunjukkan pada eksplan daun, pada penggunaan 1-3 mg/l Thidiazuron, semakin tinggi konsentrasi Thidiazuron maka semakin cepat juga kalus yang terbentuk, tetapi pada konsentrasi 4 mg/l Thidiazuron kalus yang terbentuk lebih lambat dari pada 2 serta 3 mg/l Thidiazuron dan pada penggunaan 5 mg/l Thidiazuron kalus yang terbentuk lebih cepat dari 1, 2 dan 4 mg/l Thidiazuron. Berdasarkan Gambar 12 a dan 12 b semua eksplan hipokotil dan daun memunculkan kalus kecuali pada

perlakuan eksplan hipokotil dalam medium 0 mg/l Thidiazuron dan eksplan daun dalam medium 0 mg/l Thidiazuron.

Ketiadaan tumbuhnya kalus diduga tidak cukupnya sitokinin endogen untuk menginduksi kalus, sehingga diperlukan sitokinin eksogen. Hal ini dikuatkan oleh Hendaryono dan Wijayani (1994) bahwa kombinasi antara auksin dan sitokinin akan memacu pertumbuhan kalus. Indah dan Ermavitalini (2013) pada penelitiannya menyatakan kalus yang tidak muncul ini dimungkinkan karena kombinasi ZPT pada media belum mampu menginduksi kalus, dengan kata lain eksplan mempunyai kandungan sitokinin dan auksin endogen yang rendah, sehingga masih membutuhkan tambahan sitokinin eksogen yang lebih banyak pada media kultur

Khumaida dan Handayani (2010) *dalam* Lizawati (2012) melaporkan bahwa eksplan kotiledon muda tanaman kedelai mulai berkalus pada umur 7-14 hari setelah kultur. Pada penelitian Supriyadi (2014) muncul kalus tercepat pada hari ke-52 pada perlakuan 1 mg/l Thidiazuron + 0 mg/l NAA.

L. Persentase Eksplan Berkalus

Persentase eksplan berkalus merupakan kemampuan eksplan membentuk kalus dalam medium perlakuan dengan penambahan ZPT, semakin besar persentase eksplan berkalus maka respon eksplan terhadap ZPT yang diberikan dalam medium semakin baik (Andriyani, 2005).

Hasil pengamatan persentase eksplan berkalus dapat dilihat pada tabel 12.

Tabel 12. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Persentase Eksplan Berkalus sarang Semut Pada Minggu ke-6 dan 12

Perlakuan	Persentase Eksplan Berkalus (%)	
	Minggu ke - 6	Minggu ke -12
Hipokotil	83,33	73,33
Daun	76,66	76,66
0 mg/l Thidiazuron	0	0
1 mg/l Thidiazuron	100	100
2 mg/l Thidiazuron	90	90
3 mg/l Thidiazuron	90	60
4 mg/l Thidiazuron	100	100
5 mg/l Thidiazuron	100	100

Keterangan : Semua medium ditambahkan NAA 0,5 mg/l

Data tabel 12 menunjukkan pada minggu 6 MST eksplan hipokotil cenderung memberikan persentase eksplan berkalus lebih tinggi sebesar 83,33% dibandingkan eksplan daun. Penambahan 1 mg/l Thidiazuron, 4 mg/l Thidiazuron dan 5 mg/l Thidiazuron menunjukkan persentase eksplan berkalus sebesar 100%. Sementara persentase pada 12 MST eksplan daun menunjukkan persentase eksplan berkalus tertinggi sebesar 76,66% dan pada perlakuan 1 mg/l Thidiazuron, 4 mg/l Thidiazuron dan 5 mg/l Thidiazuron menunjukkan persentase eksplan berkalus sebesar 100%. Berdasarkan tabel 12 dapat dilihat tren penurunan persentase berkalus yang terjadi pada perlakuan hipokotil menjadi 73.33% dan 3 mg/l Thidiazuron dari 90 % menjadi 60 %, ini terjadi karena adanya kontaminasi. Pada perlakuan 0 mg/l Thidiazuron tidak tumbuh kalus. Ketiadaan tumbuhnya kalus diduga karena sitokinin endogen rendah atau tidak ditamapkannya sitokinin eksogen dalam penelitian ini ke dalam medium. Hal ini didukung dengan pernyataan Indah dan Ermavitalani (2013) bahwa kalus yang tidak muncul ini

dimungkinkan karena kombinasi ZPT pada media belum mampu menginduksi kalus, dengan kata lain eksplan mempunyai kandungan sitokinin dan auksin endogen yang rendah, sehingga masih membutuhkan tambahan sitokinin eksogen yang lebih banyak pada medium kultur. Hal ini dikuatkan oleh Hendaryono dan Wijayani (1994) bahwa kombinasi antara auksin dan sitokinin akan memacu pertumbuhan kalus.

Selain itu, diduga karena konsentrasi NAA yang ditambahkan ke dalam medium konsentrasinya terlalu rendah. Hal ini didukung Pierik (1997) *dalam* Anwar (2007) auksin digunakan untuk merangsang pertumbuhan kalus, perpanjangan tunas dan pembentukan akar. Konsentrasi auksin yang rendah akan meningkatkan pembentukan akar adventif, sedangkan auksin konsentrasi tinggi akan merangsang pembentukan kalus dan menekan morfogenesis. Bakti *dalam* Marlin *dkk.*, (2013) juga menyatakan bahwa untuk tujuan induksi kalus embriogenik, NAA tunggal tidak bisa digunakan karena tidak bisa menginduksi terbentuknya kalus.

M. Skoring Persentase Kalus Menutupi Eksplan (%)

Luas kalus menutupi eksplan menunjukkan seberapa besar luas pertumbuhan kalus yang tumbuh pada eksplan dan dinyatakan dalam persen. Pengamatan dilakukan sampai minggu ke 8 dan 12 dengan mengamati luas kalus yang menutupi eksplan. Skoring kalus menggunakan skor 0 = 0 %, 1 => 0 – 25 %, 2 = 26 – 50 %, 3 = 51 – 75 % dan 4 = 76 – 100 %. Luas kalus menutupi eksplan dapat dilihat pada tabel 13.

Tabel 13. Pengaruh Jenis Eksplan dan Thidiazuron terhadap Pertumbuhan Luas Kalus Sarang Semut pada 6 dan 12 MST

Perlakuan	Persentase Kalus Menutupi Eksplan (%)	
	6 MST	12 MST
Hipokotil	85,2	88
Daun	59,2	89,6
0 mg/l Thidiazuron	0	0
1 mg/l Thidiazuron	66	100
2 mg/l Thidiazuron	58	86
3 mg/l Thidiazuron	79	58
4 mg/l Thidiazuron	84	100
5 mg/l Thidiazuron	74	100

Keterangan : Semua medium ditambahkan NAA 0,5 mg/l

Berdasarkan tabel 13, skoring tertinggi pada 6 MST yaitu pada eksplan hipokotil 85,2 % dan pada perlakuan 4 mg/l Thidiazuron sebesar 84%. Skoring luas kalus mengalami peningkatan pada 12 MST kecuali pada perlakuan 3 mg/l Thidiazuron mengalami penurunan menjadi 58%. Skoring terendah pada 6 dan 12 MST yaitu 0 % pada perlakuan 0 mg/l Thidiazuron. Rendahnya skoring kalus disebabkan pada perlakuan tanpa Thidiazuron atau 0 mg/l Thidiazuron tidak terbentuk kalus. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) kombinasi antara auksin dan sitokinin akan memacu pertumbuhan kalus.

N. Warna Kalus

Indikator perkembangan eksplan pada budidaya *in vitro* berupa warna kalus merupakan gambaran visual kalus sehingga dapat diketahui bahwa kalus yang terbentuk sel-sel-nya masih aktif membelah atau mati. Kalus yang terbentuk dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda.

Beberapa pendapat menyatakan bahwa kalus yang berkualitas untuk pembentukan kalus adalah kalus yang berwarna hijau. Menurut Fatmawati (2008)

dalam Andaryani (2010), warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, sehingga semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya.

Hasil pengamatan warna kalus dapat dilihat pada tabel 14.

Tabel 14. Pengaruh Jenis Eksplan terhadap Warna Kalus Sarang Semut pada 6 dan 12 MST

Perlakuan	Warna Tunas (%)	
	Skoring Minggu ke-6	Skoring Minggu ke-12
Hipokotil	61,1	66,6
Daun	76,6	61,6
0 mg/l Thidiazuron	0	0
1 mg/l Thidiazuron	86,6	73,3
2 mg/l Thidiazuron	85,5	66,6
3 mg/l Thidiazuron	85	45
4 mg/l Thidiazuron	83,3	100
5 mg/l Thidiazuron	86	91,6

Keterangan : Semua medium ditambahkan NAA 0,5 mg/l

Berdasarkan data pada tabel 14, warna kalus yang terbentuk antara hijau muda, hijau cerah dan hijau. Persentase warna kalus tertinggi pada 6 MST yaitu pada perlakuan 1 mg/l Thidiazuron sebesar 86,6 % dan persentase warna tertinggi pada 12 MST yaitu pada perlakuan 4 mg/l Thidiazuron sebesar 100%. Berdasarkan data pada tabel 14 perubahan warna dari minggu ke-6 ke minggu 12 warna menunjukkan warna yang normal. Terbentuknya kalus warna hijau diduga karena penggunaan konsentrasi Thidiazuron yang tinggi

Perbedaan warna kalus yang terjadi pada kalus menunjukkan tingkat perkembangan kalus yang berbeda-beda pula, hal ini dipengaruhi oleh konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan oleh medium tumbuh. Penelitian Lizawati (2012) menyatakan bahwa pada medium yang diberikan 0 ppm 2,4- D +

Thidiazuron secara bertingkat antara 0,5 ppm sampai 2 ppm rata-rata kalus yang terbentuk berwarna hijau. 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.

Kalus yang berwarna hijau menunjukkan adanya klorofil dalam jaringan eksplan yang berperan penting dalam proses fotosintesis. Mayasari (2007) menyatakan, bahwa semakin hijau warna kalus pada eksplan, maka kemampuan berfotosintesis akan semakin tinggi dalam mempertahankan hidupnya. Santoso dan Nursandi (2003) dalam Andaryani (2010) menambahkan bahwa peran zat pengatur tumbuh sitokinin dalam kegiatan kultur *in vitro* dapat menstimulir terjadinya pembelahan sel, proliferasi kalus, pembentukan tunas, mendorong proliferasi meristem ujung, menghambat pembentukan akar, dan mendorong pembentukan klorofil pada kalus.