

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Optimasi Sterilisasi Tunas Tin

Sterilitas eksplan merupakan salah satu faktor yang sangat mempengaruhi keberhasilan kultur *in vitro*, oleh sebab itu metode sterilisasi yang tepat sangat diperlukan untuk eksplan tunas tin yang akan ditanam. Proses sterilisasi bertujuan untuk mencegah tumbuhnya kontaminan baik berupa bakteri maupun jamur yang dapat mengganggu pertumbuhan eksplan.

Sterilisasi dilakukan pada setiap eksplan yang akan diinokulasi pada medium MS dan dilaksanakan sebelum proses inokulasi. Pengamatan dilaksanakan selama 30 hari, dengan variabel pengamatan berikut ini: 1) Persentase eksplan *browning*; 2) Persentase eksplan terkontaminasi; 3) Macam dan waktu kontaminasi, dan 4) Persentase eksplan hidup. Hasil pengamatan optimasi sterilisasi eksplan tunas tin dapat dilihat pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Optimasi Sterilisasi Tunas Tin pada Hari ke-30

Perlakuan	Eksplan <i>Browning</i> (%)	Eksplan Terkontaminasi (%)	Jenis Kontaminan	Waktu Kontaminasi (Hari ke-)	Eksplan Hidup (%)
A	66,67	100	Jamur	14,33	0
B	0	100	Jamur, Bakteri	7,33	0
C	100	100	Bakteri	12	0
D	0	66,67	Bakteri	3	33,33
E	0	0	-	-	100

Keterangan:

A = NaClO 1% 5' + fungisida dan bakterisida 4 g/L 5' + NaClO 0,1% 7'

B = NaClO 1% 5' + fungisida dan bakterisida 4 g/L 30' + NaClO 0,1% 7'

C = NaClO 10 %, 5' + fungisida dan bakterisida 4 g/L 1 jam + NaClO 5 % 7'

D = NaClO 10 %, 5' + fungisida dan bakterisida 4 g/L 2 jam + NaClO 5 % 7'

E = NaClO 10 %, 5' + fungisida dan bakterisida 4 g/L 3 jam + NaClO 5 % 7'

1. Persentase Eksplan *Browning*

Perubahan warna menjadi coklat pada eksplan tunas tin setelah diinokulasi terjadi karena adanya akumulasi polifenol yang dilepas oleh jaringan yang teroksidasi ketika jaringan itu dilukai. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sugiri (2005) pada saat pemotongan eksplan maka vakuola terpotong dan mengeluarkan fenol yang akan bereaksi dengan enzim fenol oksidase di dalam sitosol sehingga terbentuk quinon yang menyebabkan *browning* (Sugiri, 2005 dalam Zainal Muttaqin, 2011).



Gambar 2. Eksplan *Browning* pada Perlakuan Sterilisasi dengan NaClO 10% + 5% + Bakterisida dan Fungisida 4 g/L selama 1 jam pada hari ke-30

Hasil pengamatan pada tabel 2 menunjukkan bahwa eksplan yang mengalami *browning* tertinggi (100%) terjadi pada perlakuan C dengan pemberian NaClO 10% dan 5% serta penambahan fungisida 4 g/L dan bakterisida 4 g/L selama 1 jam (Gambar 2). *Browning* pertama kali terjadi pada hari ke-7 setelah inokulasi. Sebaliknya eksplan tidak mengalami *browning* pada perlakuan NaClO 1% 5' + NaClO 0,1% 7' + fungisida dan bakterisida 4 g/L 30', NaClO 10 %, 5' + NaClO 5 % 7' + fungisida dan

bakterisida 4 g/L 2 jam dan perlakuan NaClO 10 %, 5' + NaClO 5 % 7' + fungisida dan bakterisida 4 g/L 3 jam. *Browning* terjadi akibat kandungan senyawa fenol yang tinggi yang teroksidasi ketika sel dilukai atau terjadi senesens, akibatnya jaringan yang diisolasi menjadi coklat atau kehitaman dan gagal tumbuh (George dan Sherrington 1984). Menurut Lerch (1981) pencoklatan jaringan terjadi karena aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase yang dilepaskan atau disintesis dan tersedia pada kondisi oksidatif ketika jaringan dilukai.

2. Persentase Eksplan Terkontaminasi

Persentase eksplan yang terkontaminasi tidak terlepas dari sterilitas bahan eksplan maupun lingkungan. Kontaminasi pada bahan tanaman yang dikulturkan dapat terjadi karena adanya infeksi baik secara eksternal maupun internal. Pencegahan kontaminasi eksternal dapat dilakukan dengan sterilisasi permukaan, sementara untuk kontaminasi internal dapat dilakukan dengan pemberian fungisida atau bakterisida yang bersifat sistemik.



Gambar 3. Eksplan Terkontaminasi, a) Kontaminasi Jamur; b) Kontaminasi Bakteri

Pada uji sterilisasi ini terdapat eksplan yang terkontaminasi oleh jamur maupun bakteri (Gambar 3). Eksplan yang terkontaminasi jamur antara lain pada perlakuan (A) Fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L 5 menit dan perlakuan (B) Fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L 30 menit. Eksplan yang terkontaminasi bakteri terjadi pada perlakuan (C) dan (D) dimana masing masing menggunakan Fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L dengan lama perendaman 1 jam dan Fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L dengan lama perendaman 2 jam.

Hasil uji sterilisasi dari lima perlakuan yang diberikan 4 diantaranya mengalami kontaminasi, hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain lama perendaman oleh sterilan yang masih kurang serta sumber eksplan yang terinfeksi. Lama perendaman menggunakan fungisida dan bakterisida masing-masing 4 g/L selama 1 jam dan 2 jam belum mampu menekan pertumbuhan bakteri secara maksimal, hal ini disebabkan oleh bakteri endogen yang berada di dalam eksplan tin yang telah terlebih dahulu menginfeksi. Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari luar daerah sehingga diduga pada saat di perjalanan eksplan yang dibawa dalam keadaan sudah terpotong mengalami kontaminasi. Eksplan yang digunakan terinfeksi jamur atau bakteri dapat menyebabkan eksplan terkontaminasi pada saat pertumbuhan walaupun pada saat inokulasi tidak terlihat.

Sterilisasi pada perlakuan (E) dengan pemberian Fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L 3 jam, mampu menekan pertumbuhan kontaminan baik jamur maupun bakteri secara maksimal, hal ini ditunjukkan oleh tingkat

kontaminasi sebesar 0 %. Ini berarti lama perendaman dalam larutan fungisida dan bakterisida selama 3 jam telah mampu mematikan jamur dan bakteri dalam eksplan. Fungisida adalah bahan yang mengandung senyawa kimia beracun dan bisa digunakan untuk memberantas dan mencegah fungi/cendawan/jamur. Fungisida yang digunakan untuk sterilisasi merupakan fungisida sistemik. Fungisida sistemik adalah senyawa kimia yang bila diaplikasikan pada tanaman akan bertranslokasi ke sel-sel tanaman. Bakterisida adalah bahan yang mengandung senyawa kimia beracun dan bisa digunakan untuk memberantas dan mencegah bakteri (Wudianto 2002). Penggunaan fungisida dan bakterisida dengan konsentrasi masing-masing 4 g/L dengan lama perendaman 5 menit digunakan dalam penelitian Zainal, M (2001) terhadap eksplan jarak pagar dan mampu menekan kontaminan dengan kontaminasi 0%. Sedangkan dalam penelitian Fahmadi (2006) sterilisasi menggunakan fungisida dan bakterisida masing-masing 4 g/L selama 5 menit menghasilkan eksplan tunas aksiler jarak pagar yang steril sebesar 77,78 % .

3. Jenis dan Waktu Kontaminasi

Kontaminasi eksplan tunas tin pada masing-masing perlakuan berbeda-beda, ada kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri dan ada juga yang diakibatkan oleh jamur. Selain jenis kontaminan, waktu terjadinya kontaminasi juga berbeda setiap perlakuan. Perlakuan yang mengalami kontaminasi antara lain perlakuan (A) NaClO 1% + Fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L 5 menit. Jenis kontaminan berupa jamur yang ditandai oleh adanya hifa berwarna putih pada sekitar eksplan seperti terlihat pada gambar

3(a). Kontaminasi terjadi pada hari ke- 14,33 dengan persentase kontaminasi 100 %. Berikutnya yaitu perlakuan (B) NaClO 1% + Fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L 30 menit. Kontaminasi berupa bakteri dan jamur terjadi pada hari ke 7,33, bakteri pada hari ke-3 dan kontaminasi jamur pada hari ke 8,50 dengan persentase kontaminasi sebesar 100 %.

Kontaminasi bakteri juga terjadi pada perlakuan (C) dan (D) dengan masing-masing pemberian NaClO 10 % + fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L 1 jam, dan NaClO 10 % + fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L 2 jam. Jenis kontaminan pada perlakuan C dan D berupa bakteri berwarna putih menyerupai lendir berwarna putih kecoklatan pada medium di sekitar eksplan seperti terlihat pada gambar 3(b). Kontaminasi bakteri pada perlakuan C terjadi pada hari ke-12 dengan persentase kontaminasi 100 %, sedangkan kontaminasi bakteri pada perlakuan D terjadi pada hari ke-3 dengan persentase kontaminasi 66,67 %.

Kontaminasi bakteri lebih cepat dibandingkan dengan kontaminasi jamur. Sementara semakin singkat masa perendaman oleh fungisida dan bakterisida maka semakin cepat pertumbuhan kontaminan. Perendaman selama 1 jam dan 2 jam mampu menekan pertumbuhan jamur namun belum mampu menekan pertumbuhan bakteri yang tumbuh lebih cepat yaitu pada hari ke-3 setelah inokulasi. Hal ini dikarenakan bakteri yang biasanya bersifat endogen dan sporanya berada di dalam eksplan sehingga tidak cukup diatasi dengan sterilisasi permukaan. Hasil penelitian ini menunjukkan perlakuan (E) dengan pemberian NaClO 10 % + fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L 3 jam

tidak terjadi kontaminasi (0 %) pada eksplan selama 30 hari pengamatan. Hal ini dikarenakan sterilan yang diberikan telah mampu membunuh spora yang berada di dalam eksplan setelah 3 jam perendaman, sehingga perendaman dengan fungisida dan bakterisida paling lama merupakan yang terbaik dalam menekan pertumbuhan kontaminan. Selain itu Cl⁻ dalam NaClO sebagai senyawa halogen mampu membunuh sel jamur dan bakteri. NaClO membunuh sel dengan cara mengoksidasi protein, sehingga merusak dan menginaktifkan enzim-enzim (Waluyo, 2007).

Persentase kontaminasi pada perlakuan A, B, C dan D yang cukup tinggi menunjukkan bahwa metode sterilisasi belum mampu membunuh kontaminan baik jamur maupun bakteri secara maksimal, hal ini diduga dikarenakan eksplan yang digunakan mengandung kontaminasi internal sehingga perendaman menggunakan fungisida dan bakterisida selama 2 jam belum efektif, sedangkan pada perlakuan E kontaminasi dapat diatasi sehingga persentase kontaminasi 0 %.

4. Persentase Eksplan Hidup

Hasil uji sterilisasi terhadap persentase eksplan hidup tunas tin pada Tabel 2 menunjukkan bahwa perlakuan (E) dengan penggunaan NaClO 10 % + Fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L 3 jam, telah mampu menekan kontaminasi baik jamur maupun bakteri dan memberikan persentase eksplan hidup sebesar 100%. Hal ini dikarenakan pemberian fungisida dan bakterisida sistemik dengan lama perendaman 3 jam mampu masuk ke dalam eksplan tin. Sesuai dengan pendapat Wudianto (2002) fungisida dan bakterisida sistemik

akan masuk ke dalam jaringan tanaman. Namun, fungisida dan bakterisida sistemik ini harus memenuhi syarat ideal, diantaranya dalam tanaman inang bekerja sebagai toksikan tidak mengurangi kuantitas dan kualitas tanaman, serta mampu meningkatkan ketahanan inang. Di samping itu, perlakuan ini juga mampu menekan terjadinya *browning* dengan persentase *browning* 0 %. Hal ini diduga semakin lama perendaman maka semakin banyak senyawa fenol yang keluar dari eksplan sehingga *browning* tidak terjadi. Perendaman yang lama prinsipnya sama dengan pembilasan yang terus menerus yang bertujuan mengeluarkan senyawa fenol. Sesuai dengan pernyataan Santoso dan Nursandi (2004) yang menyatakan untuk mengatasi masalah *browning* (pencoklatan) dapat dilakukan dengan cara mengeluarkan senyawa fenol dengan jalan membilas terus-menerus dengan air steril.

Berdasarkan hasil pengamatan, perlakuan (E) yaitu penggunaan NaClO 10 % + Fungisida 4 g/L + bakterisida 4 g/L 3 jam merupakan metode paling tepat dan efektif dalam sterilisasi eksplan tunas tin ditunjukkan oleh persentase eksplan *browning* terendah (0 %), persentase eksplan terkontaminasi terendah (0 %), dan persentase eksplan hidup terbesar 100%, sehingga metode sterilisasi ini yang digunakan dalam penelitian berikutnya yaitu induksi tunas tin.

B. Induksi Tunas Tin

Keberhasilan induksi tunas tin secara *in vitro* sangat dipengaruhi oleh eksplan yang hidup serta tingkat pertumbuhan. Pertumbuhan pada eksplan yang diamati secara visual yaitu dengan adanya pemanjangan dan pembesaran jaringan eksplan.

Hal ini sesuai dengan pernyataan Evans *et al.* (1981), bahwa jaringan disebut tumbuh apabila terjadi penambahan massa jaringan atau ukuran jaringan menjadi lebih besar. Parameter pertumbuhan yang diamati meliputi persentase pembentukan tunas, jumlah tunas, tinggi eksplan, jumlah daun dan eksplan berakar. Dalam penelitian ini diamati juga pertumbuhan kalus. Kalus yang tumbuh sebagai respon eksplan terhadap zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam medium. Selain pertumbuhan, keberhasilan induksi tunas tin ditunjukkan dengan parameter persentase hidup, persentase kontaminasi dan persentase *browning*.

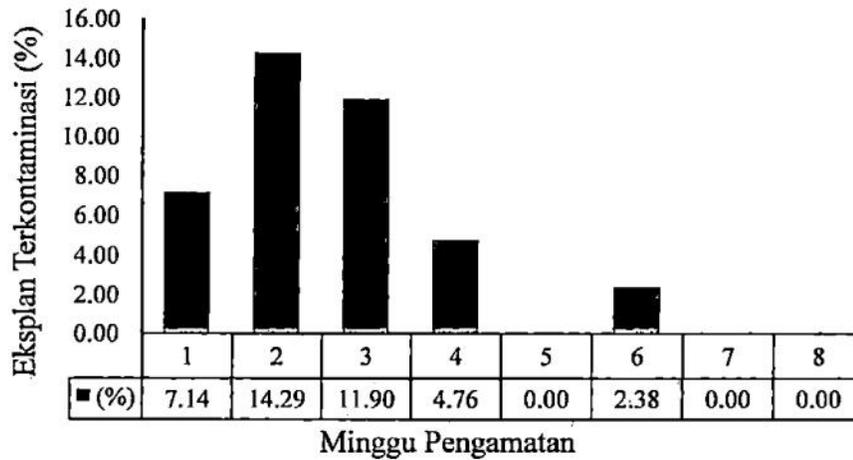
Hasil pengamatan induksi tunas tin secara *in vitro* dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 3. Pengaruh BAP dan NAA terhadap Persentase Eksplan Kontaminasi, Eksplan Hidup, Pertumbuhan Kalus, Pembentukan Tunas dan Eksplan *Browning* pada Minggu ke-8

Perlakuan	Eksplan Kontaminasi (%)	Eksplan Hidup (%)	Eksplan <i>Browning</i> (%)	Pertumbuhan Kalus (%)	Pembentukan Tunas (%)
Tanpa BAP + NAA		50,00	16,67	0,00	0,00
2mg/L BAP+0.5 mg/L NAA		50,00	0,00	16,67	33,33
4mg/L BAP+0.5 mg/L NAA		66,67	33,33	33,33	16,67
6mg/L BAP+0.5 mg/L NAA	40,48	66,67	16,67	33,33	0,00
2mg/L BAP+1 mg/L NAA		66,67	16,67	16,67	16,67
4mg/L BAP+1mg/L NAA		50,00	16,67	33,33	16,67
6mg/L BAP+1 mg/L NAA		66,67	16,67	16,67	16,67

1. Persentase Eksplan Terkontaminasi dan Eksplan Hidup

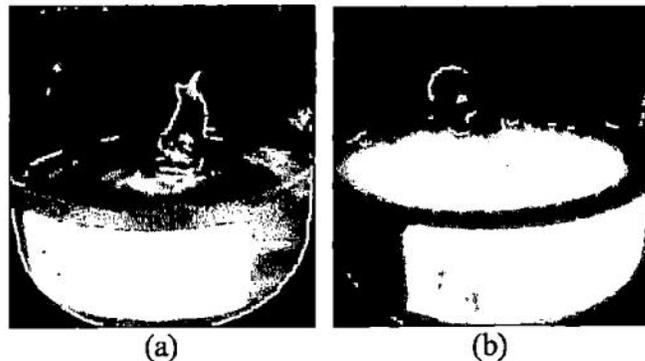
Persentase eksplan yang mengalami kontaminasi pada minggu ke-8 sebesar 40,48 % (Tabel 3). Kontaminasi ini disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Berdasarkan waktu terjadinya kontaminasi, kontaminasi terjadi pada minggu ke-1 sampai dengan minggu ke-6 seperti terlihat pada gambar 4.



Gambar 4. Histogram Persentase Eksplan yang Terkontaminasi Setiap Minggu Pengamatan

Gambar 4 menunjukkan kontaminasi pertama terjadi pada minggu ke-1 dengan persentase kontaminasi sebanyak 7,14 %, dan kontaminasi paling tinggi pada minggu ke-2 sebanyak 14,29 % dengan jenis kontaminan bakteri dan jamur. Kontaminasi ini diduga disebabkan oleh kontaminan berupa mikrobia endogen yang berada di dalam jaringan tanaman. Hal ini sesuai dengan pendapat Fahmadi (2006) kontaminasi yang bersifat endogen adalah sumber kontaminasi berasal dari mikrobia yang ada dalam jaringan tanaman, seperti mikrobia endofit. Mikrobia ini tidak terkena sterilisasi karena berada dalam eksplan, sehingga ketika eksplan sudah diinokulasi, mikrobia keluar bersama hasil metabolisme eksplan yang dapat menyebabkan kontaminasi. Sumber eksplan yang berasal dari luar kota dan dibawa dalam keadaan belum steril diduga merupakan penyebab masuknya sumber kontaminan. Mikrobia masuk ketika dalam perjalanan melalui air dan udara yang diserap oleh eksplan yang telah dipotong. Pada minggu ke-1 kontaminasi bakteri mulai tumbuh menyerupai lendir berwarna putih kekuningan di sekitar eksplan dan

sebagian lagi tumbuh pada medium (Gambar 5a). Kontaminasi jamur terlihat pertama kali berupa hifa menyerupai kapas berwarna putih pada pangkal batang eksplan yang kemudian menyebar ke sekeliling eksplan dan pada minggu ke-3 jamur menutupi seluruh medium (Gambar 5b). Pada minggu ke-7 dan minggu ke-8 tidak terdapat lagi eksplan yang terkontaminasi. Hal ini dikarenakan pada minggu ke-7 dan minggu ke-8 pertumbuhan eksplan sudah stabil dan mampu menyerap unsur hara dari medium. Selain itu sumber kontaminan baik jamur maupun bakteri sudah tidak aktif dan tidak dapat tumbuh.

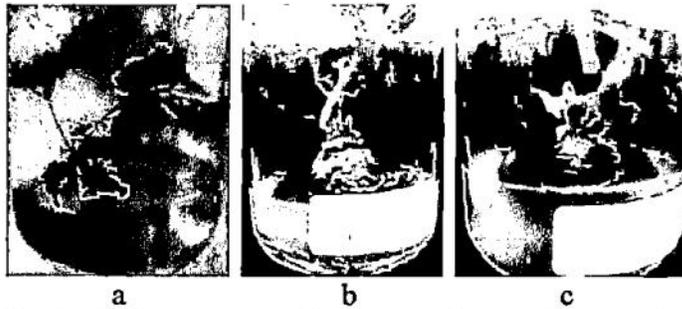


Gambar 5. Eksplan Tin yang Mengalami Kontaminasi. a) Kontaminasi Bakteri, b) Kontaminasi Jamur

Faktor utama yang mempengaruhi persentase hidup eksplan adalah jumlah kontaminasi eksplan baik berupa bakteri maupun jamur. Kontaminan yang menyerang eksplan tunas tin mengakibatkan kematian, sehingga mengurangi jumlah eksplan yang hidup. Hal ini sesuai dengan pendapat Zulkarnain (2009) bahwa mikroorganisme kontaminan akan tumbuh cepat pada medium yang kaya hara dan dalam waktu yang singkat akan menutupi permukaan medium serta eksplan yang ditanam, selanjutnya mikroorganisme

tersebut akan menyerang eksplan melalui luka akibat pemotongan dan terjadinya kompetisi antara eksplan dan kontaminan sehingga menyebabkan kematian eksplan.

Tabel 3 menunjukkan bahwa persentase eksplan hidup terbaik sebesar 66,67 %, dan persentase eksplan hidup terendah sebesar 50,00 %. Persentase eksplan hidup terendah sebesar 50 % masih menunjukkan keberhasilan kultur *in vitro* tunas tin dan juga mengindikasikan keberhasilan metode sterilisasi yang digunakan (Gambar 6a, b, c).



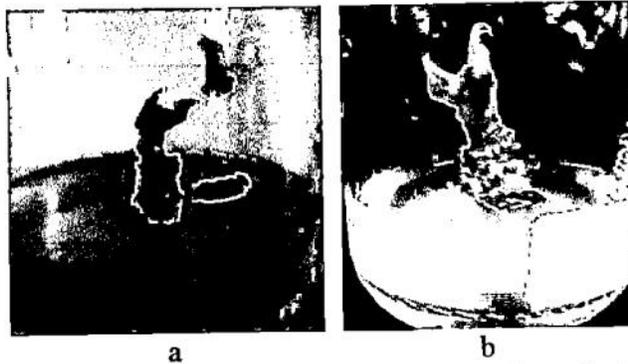
Gambar 6. Eksplan Hidup Berumur Delapan Minggu. a) Kontrol, b) 2 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA, c) 6 mg/L BAP + 1 mg/L NAA

2. Persentase Eksplan *Browning*

Pada kultur *in vitro* eksplan seringkali berubah menjadi coklat (*browning*) atau hitam (*blackening*) sesaat setelah isolasi yang selanjutnya dapat menghambat pertumbuhan dan akhirnya menyebabkan kematian jaringan. Penghambatan pertumbuhan biasanya sangat kuat pada beberapa spesies yang umumnya mengandung senyawa tanin atau hidroksifenol dengan konsentrasi tinggi (George dan Sherrington, 1984).

Berdasarkan hasil pengamatan pada tabel 3 diketahui bahwa persentase eksplan *browning* tertinggi terjadi pada perlakuan 4 mg/L BAP + 0,5 mg/L

NAA yaitu 33,33% (Gambar 7a). Sementara persentase eksplan *browning* terendah terjadi pada perlakuan 2 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA yaitu 0,00% (Gambar 7b). *Browning* pertama kali terjadi pada hari ke-20 setelah inokulasi. *Browning* ini diduga diakibatkan oleh getah yang keluar pada saat pemotongan eksplan, jaringan yang terluka terus mengeluarkan hidroksifenol setelah diinokulasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Tabiyeh *et al.* (2006) bahwa pencoklatan dalam kultur *in vitro* disebabkan meningkatnya produksi senyawa fenolat yang diikuti oksidasi oleh aktivitas enzim oksidase (PPO) dan polimerasinya. Fenilalanin amonia liase (PAL) adalah salah satu enzim dalam fenilpropanoid yang sangat berpengaruh terhadap terjadinya pencoklatan. Salah satu penyebab utama pencoklatan dalam kultur *in vitro* adalah luka karena pemotongan pada jaringan, luka tersebut memacu stres dan menyebabkan peningkatan aktivitas PAL yang diikuti oleh produksi fenilpropanoid dan menyebabkan pencoklatan. Tin yang digunakan sebagai eksplan dalam penelitian ini merupakan tanaman tahunan berkayu yang banyak mengandung getah sehingga ketika dipotong mengeluarkan senyawa polifenol dan ketika teroksidasi menyebabkan pencoklatan pada eksplan.



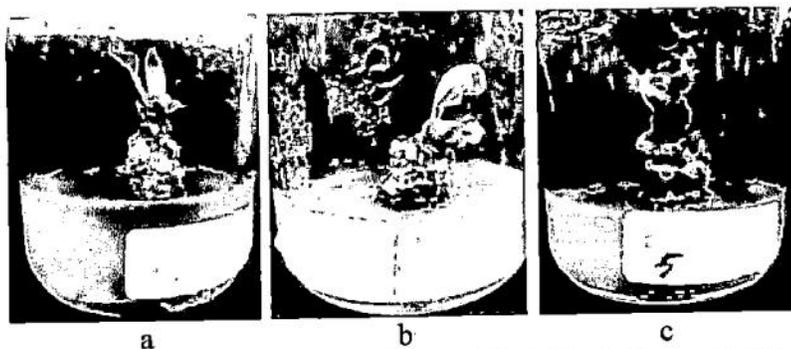
Gambar 7. Eksplan yang *Browning* dan Eksplan yang Normal. a) 4 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA, b) 2 mg/L BAP + 0,5mg/L NAA

3. Persentase Pertumbuhan Kalus

Pertumbuhan kalus ini bukan parameter utama dalam pengamatan, karena penelitian ini bertujuan untuk menumbuhkan jaringan meristem tunas langsung menjadi plantlet, akan tetapi kalus tetap diamati karena merupakan fase dalam pembentukan tunas melalui proses organogenesis tak langsung yaitu terbentuknya organ didahului dengan terbentuknya kalus dan organ akan tumbuh dari kalus tersebut. Pertumbuhan kalus diamati setiap minggu, mulai dari 1 minggu setelah penanaman sampai 8 minggu setelah penanaman. Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah eksplan yang membentuk kalus pada masing-masing perlakuan kemudian dibagi dengan jumlah eksplan tiap perlakuan dan dikalikan 100 dinyatakan dalam persen (%). Berdasarkan waktu munculnya kalus perlakuan 4 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA memiliki waktu tumbuh kalus paling cepat yaitu pada hari ke-18.

Data pada tabel 3 menunjukkan hasil bahwa pertumbuhan kalus sebesar 33,3 % diperoleh pada perlakuan 4 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA (Gambar 8a), 6 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA (Gambar 8b), dan 4 mg/L BAP+1 mg/L NAA

(Gambar 8c). Sementara pada perlakuan 2 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA, 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA dan 6 mg/L BAP + 1 mg/L NAA, eksplan yang tumbuh kalus hanya 16,67 %. Persentase pertumbuhan kalus paling kecil terjadi pada perlakuan kontrol dengan hasil tidak ada satupun eksplan yang tumbuh kalus. Perlakuan kontrol tidak menginduksi kalus karena pertumbuhan kalus memerlukan auksin dan sitokinin yang berfungsi untuk pembelahan dan pemanjangan sel. Hal ini ditunjukkan oleh eksplan yang diinokulasi pada medium dengan penambahan BAP dan NAA mampu menginduksi tumbuhnya kalus, namun belum dapat disimpulkan perlakuan terbaik untuk menginduksi kalus. Hasil ini didukung oleh penelitian Sudarmadji (2013), yang meneliti pengaruh BAP terhadap pertumbuhan kalus pada kapas yang menunjukkan konsentrasi BAP 3 mg/L mampu menghasilkan bobot basah kalus yang terbaik 1,65 gram, sementara konsentrasi BAP 0 mg/l hanya menghasilkan bobot kalus 1,03 gram.



Gambar 8. Eksplan yang Berkalus. a) 4 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA, b) 6 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA hari ke-19, c) 4 mg/L BAP + 1 mg/L NAA pada minggu ke-8

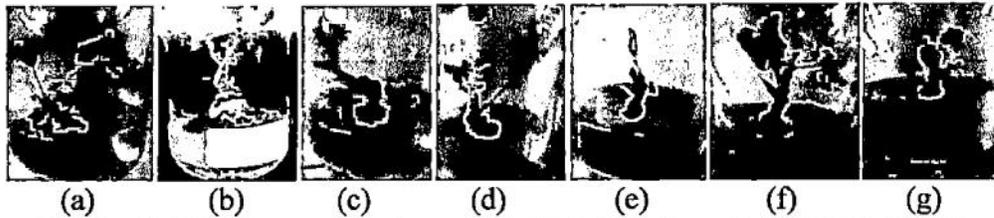
Terbentuknya kalus dalam kultur *in vitro* dipengaruhi oleh faktor genotip, medium, dan lingkungan tumbuh (suhu dan cahaya), fisiologi

jaringan tanaman, dan bagian tanaman yang dipakai (Livy, 1988). Kalus yang dihasilkan dari induksi tunas eksplan tin dapat berdiferensiasi membentuk planlet. Namun dalam penelitian ini, kalus yang terbentuk belum mampu berdiferensiasi menjadi planlet, karena waktu pengamatan yang relatif singkat yaitu hanya sekitar 2 bulan. Teori keseimbangan auksin dan sitokinin menyatakan bahwa jika konsentrasi antara auksin dan sitokinin di dalam jaringan yang dikulturkan dalam keadaan seimbang maka akan terbentuk kalus (George dan Sherrington, 1984). Untuk menginduksi lebih cepat diperlukan penambahan auksin dan sitokinin pada perimbangan yang tepat. Namun untuk spesies atau bahkan kultivar yang berbeda membutuhkan auksin dan sitokinin dengan jenis dan konsentrasi yang berbeda. Tingginya konsentrasi auksin dan sitokinin dapat mendorong sel-sel untuk terus melakukan pembelahan dan pembesaran namun sel-sel yang tumbuh tidak terdiferensiasi secara sempurna, oleh karena itu eksplan yang dikulturkan tumbuh membentuk kalus (Hartmann *at al*, 1997).

4. Persentase Pembentukan Tunas

Terbentuknya tunas menunjukkan keberhasilan regenerasi eksplan yang diinokulasi pada medium kultur *in vitro*. Pada umumnya medium perbanyakan *in vitro*, menggunakan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin karena merupakan salah satu zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan untuk memacu pembentukan tunas dengan daya aktivitas yang kuat mendorong proses pembelahan sel (George dan Sherrington, 1984). Data pada tabel 3 menunjukkan bahwa semua perlakuan direspon oleh eksplan

dengan membentuk tunas kecuali pada perlakuan kontrol dan 6 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA. Tunas pertama kali tumbuh mulai pada hari ke-25, tunas tumbuh pada bagian nodus eksplan.



Gambar 9. Eksplan yang Bertunas pada Perlakuan 2 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA hari ke-49

Persentase pertumbuhan tunas yang terbaik terdapat pada perlakuan 2 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA sebesar 33,3 % (Gambar 9b). Selanjutnya perlakuan 4 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA (Gambar 9c), 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA (Gambar 9e), 4 mg/L BAP + 1 mg/L NAA (Gambar 9f), dan 6 mg/L BAP + 1 mg/L NAA (Gambar 9g) masing-masing 16,67%, sedangkan perlakuan kontrol tanpa BAP + NAA (Gambar 9a) dan 6 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA (Gambar 9d) tidak tumbuh tunas. Perlakuan kontrol tanpa BAP dan NAA tidak menginduksi tumbuhnya tunas. Hal ini dikarenakan tidak tersedianya BAP yang dapat memacu pertumbuhan dan perkembangan tanaman khususnya tunas adventif . Penambahan sitokinin dan auksin eksogen dapat menginduksi tumbuhnya tunas karena akan mengubah level zat pengatur tumbuh endogen sel yang ada di dalam tanaman. Hasil penelitian Julianti (2013) terhadap multiplikasi tunas gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk), menunjukkan perlakuan (0,1 mg/l NAA dan 2,5 mg/l BAP) memberikan kecepatan pertumbuhan tunas terbaik dengan jumlah tunas yang

dihasilkan sampai akhir penelitian sebanyak 12 tunas. Namun pada penelitian ini perlakuan 6 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA belum menunjukkan pertumbuhan tunas, diduga karena eksplan belum merespon BAP dan NAA yang diberikan.

Hasil pengamatan terhadap jumlah tunas, tinggi eksplan, jumlah daun, persentase eksplan berakar dan persentase warna eksplan tin pada semua perlakuan disajikan pada tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh BAP dan NAA terhadap Jumlah Tunas, Tinggi Eksplan, Jumlah Daun, Persentase Eksplan Berakar dan Persentase Warna Eksplan pada Minggu ke-8

Perlakuan	Jumlah Tunas	Tinggi Eksplan (cm)	Jumlah Daun (Helai)	Eksplan Berakar (%)	Warna Eksplan (%)
Tanpa BAP + NAA	0,00	0,27	1,67	0,00	50,00
2mg/L BAP+0.5 mg/L NAA	0,67	1,27	1,33	0,00	91,67
4mg/L BAP+0.5 mg/L NAA	0,25	1,08	2,50	0,00	81,25
6mg/L BAP+0.5 mg/L NAA	0,00	0,55	1,75	0,00	43,75
2mg/L BAP+1 mg/L NAA	0,25	1,43	1,50	0,00	75,00
4mg/L BAP+1mg/L NAA	0,33	1,33	2,67	0,00	58,33
6mg/L BAP+1 mg/L NAA	0,25	0,63	0,63	0,00	62,50

5. Jumlah Tunas

Sitokinin adalah senyawa yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Sitokinin berperan merangsang pertumbuhan sel dalam jaringan yang disebut eksplan dan merangsang pertumbuhan tunas daun (Santoso dan Nursandi, 2004).

Hasil sidik ragam jumlah tunas (Lampiran V) dan tabel 4 menunjukkan bahwa setiap perlakuan yang dicobakan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah tunas yang dihasilkan eksplan. Diantara perlakuan yang

diujikan perlakuan 2 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA memberikan rata-rata jumlah tunas sebesar 0,67 tunas. Sementara perlakuan 4 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA, 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA, 4 mg/L BAP + 1 mg/L NAA, dan 6 mg/L BAP + 1 mg/L NAA masing-masing mempunyai pertumbuhan tunas rata-rata 0,25, 0,25, 0,33 dan 0,25 (Tabel 4). Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Kumar, *et al.* (1998) yang menggunakan medium MS + BAP 2 ppm untuk induksi tunas tin, dapat menghasilkan 4,8 tunas / eksplan dengan panjang rata-rata tunas 5,7 cm. Selanjutnya perlakuan kontrol dan perlakuan 6 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA menunjukkan tidak ada tunas yang tumbuh.

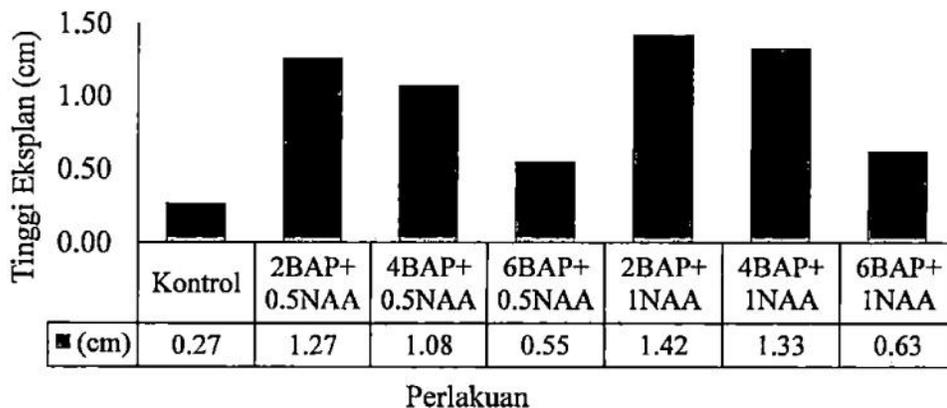
Pertumbuhan tunas pada masing-masing perlakuan diduga disebabkan oleh interaksi antara BAP dan NAA yang bekerja secara bersama-sama dalam mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Hal ini sesuai dengan pendapat Wareing dan Phillips (1970), bahwa sitokinin merangsang pembelahan sel tanaman dan berinteraksi dengan auksin dalam menentukan arah diferensiasi sel. Apabila perbandingan konsentrasi sitokinin lebih besar dari auksin, maka pertumbuhan tunas dan daun akan terstimulasi. Namun pada penelitian ini belum mendapatkan hasil terbaik dari masing-masing perlakuan, diduga disebabkan karena waktu pengamatan yang singkat sehingga belum mendapatkan jumlah tunas tin yang signifikan dari masing-masing perlakuan.

6. Tinggi Eksplan

Tinggi tanaman dianggap sebagai indikator pertumbuhan bagi tanaman maupun sebagai parameter untuk mengukur pengaruh lingkungan atau

perlakuan yang diberikan. Ini didasarkan atas kenyataan bahwa tinggi tanaman merupakan ukuran pertumbuhan yang paling mudah dilihat (Sitompul dan Guritno, 1995).

Berdasarkan hasil sidik ragam (Lampiran V) dan tabel 4 diketahui bahwa tidak terdapat perlakuan yang memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap tinggi eksplan, namun jika dilihat dari histogram rata-rata tinggi eksplan (Gambar 10) ada kecenderungan semakin meningkatnya konsentrasi sitokinin mengakibatkan menurunnya tinggi eksplan.



Gambar 10. Histogram Rata-rata Tinggi Eksplan dengan Pemberian BAP dan NAA pada Minggu ke-8

Gambar 10 menunjukkan tinggi eksplan pada perlakuan 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA mencapai 1,43 cm, sedangkan tinggi eksplan pada perlakuan kontrol 0,27 cm. Hasil ini hampir sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Miryam dkk (2008) pada multiplikasi jeruk kacang (*Citrus nobilis* L), penambahan 2,5 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA mampu menambah tinggi tunas sebesar 2,28 cm. Jika dilihat secara keseluruhan tinggi tanaman cenderung semakin menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi BAP pada tiap kombinasi perlakuan. Semakin menurunnya rata-rata tinggi eksplan diduga

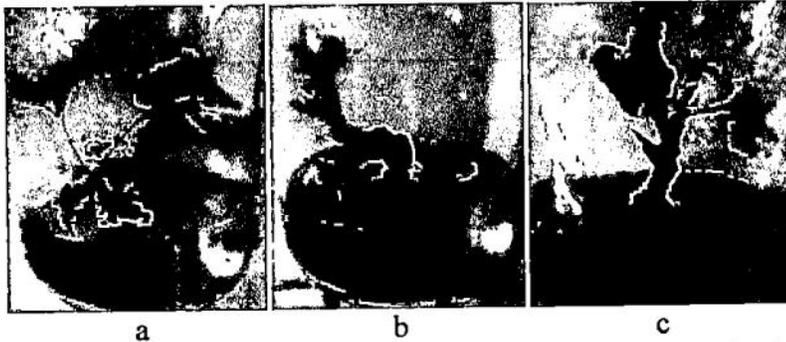
disebabkan oleh semakin meningkatnya konsentrasi sitokinin (BAP) sehingga jika tidak seimbang dapat menghambat kinerja auksin (NAA). Hal ini sesuai dengan pendapat Dustan dan Short (1977) bahwa konsentrasi sitokinin yang tinggi disamping merangsang pembelahan sel, juga dapat menghambat pertumbuhan memanjang batang. Hal serupa juga dikemukakan oleh Wattimena, *et al.* (1992) yang menyatakan bahwa sitokinin menghambat dominansi apikal dan merangsang proliferasi tunas ketiak dan munculnya tunas baru, dengan penghambatan dominansi apikal maka pertumbuhan tanaman mengarah pada pertumbuhan lateral sehingga akan mengurangi tinggi tanaman.

7. Jumlah Daun

Pengamatan daun sangat diperlukan selain sebagai indikator pertumbuhan juga sebagai data penunjang untuk menjelaskan proses pertumbuhan yang terjadi seperti pada pembentukan biomassa tanaman. Pengamatan daun dapat didasarkan pada fungsinya sebagai penerima cahaya dan alat fotosintesis. Pada awal pertumbuhan tanaman daun belum aktif berfotosintesis. Daun baru aktif berfotosintesis pada fase perkembangan selanjutnya dan memiliki peranan penting dalam proses pertumbuhan selama akar belum muncul. Daun menggantikan peran akar dalam menyerap mineral yang dibutuhkan untuk proses pertumbuhan (Sitompul dan Guritno, 1995).

Pengamatan terhadap jumlah daun dilakukan satu minggu sekali selama delapan minggu pengamatan. Eksplan yang berasal dari tunas mulai pecah dan menunjukkan pertumbuhan daun mulai dari hari ke-7 (minggu pertama)

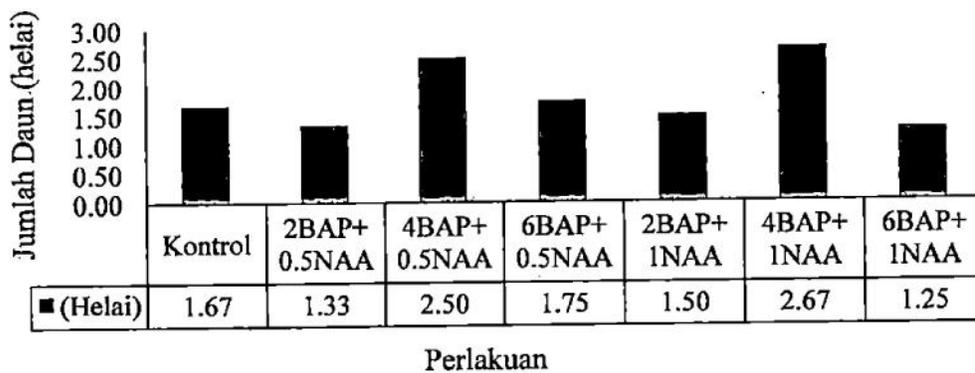
sampai dengan minggu ke-8. Hasil sidik ragam pada Lampiran V dan tabel 4 menunjukkan perlakuan yang diberikan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap jumlah daun. Jumlah pertumbuhan cenderung meningkat pada perlakuan 4 mg/L BAP + 1 mg/L NAA yaitu sebanyak 2,67 helai (Gambar 11), dan pada perlakuan 4 mg/L BAP + 1 mg/L NAA sebanyak 2,67 helai. Pertumbuhan daun ini dipengaruhi oleh keseimbangan konsentrasi antara sitokinin (BAP) dan auksin (NAA). Hal ini sesuai dengan pendapat Fereol *et al.* (2002) auksin umumnya menghambat pertumbuhan tunas, akan tetapi kombinasi sitokinin tinggi dan auksin rendah, penting dalam pembentukan tunas dan daun.



Gambar 11. Keadaan Visual Daun pada Perlakuan dengan Pemberian BAP dan NAA dan Kontrol. a) Eksplan Tanpa Perlakuan (Kontrol), b) Perlakuan 4 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA, c) Perlakuan 4 mg/L BAP + 1 mg/L NAA

Gambar 11 terlihat bahwa perlakuan tanpa kombinasi BAP dan NAA (kontrol) memiliki daun yang panjang tetapi lebih kurus jika dibandingkan dengan perlakuan yang diberikan BAP dan NAA yang memiliki ukuran daun lebih kecil tetapi tebal. Keadaan ini diduga disebabkan peningkatan konsentrasi NAA akan menghambat pertumbuhan daun, tetapi berfungsi

dalam pembesaran sel. Semakin tinggi konsentrasi auksin, konsentrasi etilen yang dihasilkan akan semakin tinggi, hal ini akan menyebabkan terhambatnya aktivitas auksin dalam perpanjangan sel, tetapi akan meningkatkan pelebaran sel. Trend pembentukan daun karena pengaruh perlakuan dapat dicermati pada gambar 12.



Gambar 12. Histogram Rata-rata Jumlah Daun dengan Pemberian BAP dan NAA pada Minggu ke-8

Gambar 12 menunjukkan trend pembentukan daun yang mengindikasikan peningkatan konsentrasi BAP sampai dengan 4 mg/L dapat meningkatkan jumlah daun, namun pada konsentrasi 6 mg/L jumlah daun menurun. Hal ini diduga karena konsentrasi BAP dan NAA pada perlakuan tersebut berada pada level yang seimbang, sesuai dengan pendapat Fereol *et al.* (2002) bahwa BAP dan NAA terbukti berperan dalam menunjang pertumbuhan jaringan dan pembentukan daun apabila digunakan pada konsentrasi yang tepat.

8. Persentase Eksplan Berakar

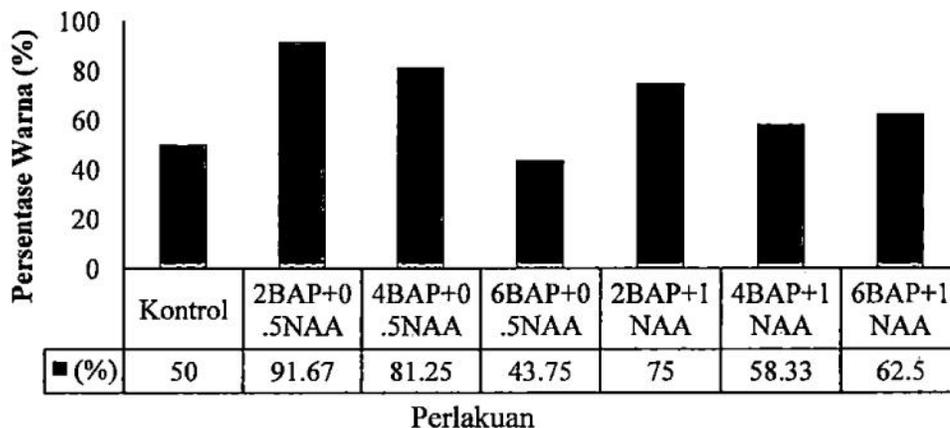
Mekanisme yang terjadi pada pembentukan akar diawali dengan auksin yang memperlambat timbulnya senyawa-senyawa dalam dinding sel yang berhubungan dengan pembentukan kalsium pektat, sehingga menyebabkan dinding sel menjadi lebih elastis, akibatnya sitoplasma lebih leluasa untuk mendesak dinding sel ke arah luar dan memperluas volume sel. Selain itu, auksin menyebabkan terjadinya pertukaran antara ion H^+ dengan ion K^+ , Ion K^+ akan masuk ke dalam sitoplasma dan memacu penyerapan air ke dalam sitoplasma tersebut untuk mempertahankan tekanan turgor dalam sel, sehingga sel mengalami pembentangan. Setelah mengalami pembentangan maka dinding sel akan menjadi kaku kembali karena terjadi kegiatan metabolik berupa penyerapan ion Ca^{+} dari luar sel, yang akan menyempurnakan susunan kalsium pektat dalam dinding sel (Hastuti, 2002).

Hasil pengamatan pada tabel 4. menunjukkan bahwa selama delapan minggu masa pengamatan secara visual dari semua perlakuan, tidak ditemukan adanya eksplan yang berakar. Berbeda dengan hasil penelitian Kumar, *et al.* (1998) yang menggunakan Medium MS + 2 mg/L NAA menghasilkan persentase pertumbuhan akar sebesar $45,2 \pm 1,1$ % pada minggu ke-5. Akar yang tidak tumbuh diduga diakibatkan konsentrasi auksin (NAA) yang diberikan pada masing masing perlakuan masih terlalu rendah sehingga kebutuhan eksplan untuk inisiasi akar masih belum tercukupi. Hal ini sesuai dengan pendapat Armini *et al.* (1992). Pada umumnya kultur jaringan tanaman membutuhkan auksin dalam pembentukan akar. Kebutuhan ini tidak

konstan karena setelah inisiasi akar, pembesaran primordial akar membutuhkan konsentrasi auksin rendah, dengan alasan ini maka inisiasi akar akan dilakukan secara *in vitro* dengan konsentrasi auksin tinggi. Selain itu diduga waktu pengamatan yang singkat belum menunjukkan adanya pertumbuhan akar pada masing-masing perlakuan, sehingga perlu waktu yang lebih lama untuk proses pembentukan akar.

9. Persentase warna Eksplan

Pengamatan terhadap warna eksplan dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan warna pada masing-masing perlakuan dan perbandingan warna dengan tanaman yang ada di alam. Pengamatan menggunakan *munsell plant colour chart*. Hasil pengamatan warna eksplan dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Histogram Persentase Warna Eksplan pada Perlakuan dengan Pemberian NAA dan BAP

Berdasarkan histogram persentase warna eksplan (Gambar 13) menunjukkan bahwa perlakuan medium MS dengan penambahan BAP 2 mg/L dan NAA 0,5 mg/L memiliki persentase kemiripan warna dengan warna daun asli tunas tin lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan lain yaitu

sebesar 91,67 %. Hal ini disebabkan konsentrasi sitokinin berupa BAP 2 mg/L dan auksin berupa NAA 0,5 mg/L mampu menjaga dan memacu perkembangan klorofil di dalam jaringan tanaman. Hal ini sesuai dengan pendapat Salisbury (1995) sitokinin mampu mengganti faktor yang dibutuhkan oleh akar dalam proses penuaan sehingga kandungan BAP yang diangkut ke daun yang menunda proses penuaan. Selain itu menurut Benyamin, L (1995) sitokinin dapat memacu perkembangan etioplas menjadi kloroplas terutama dengan merangsang pertumbuhan grana dan pembentukan klorofil, serta dapat meningkatkan pembentukan satu atau lebih protein yang akan mengikat klorofil sehingga klorofil stabil.