

".....Sesungguhnya, sesudah kesulitan itu ada kemudahan, sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai mengerjakan sesuatu urusan, kerjakanlah urusan yang lain dengan sungguh-sungguh, dan hanya kepada Tuhan hendaknya kamu berharap....."

(QS. Alam Nasyrah : 5 - 8)

kupersembahkan untuk orang-orang tercinta :
ibu, kakak-kakakku serta mas Dian
yang selalu memberikan doa
dan dorongan semangat

S.I
633.812
Mas
p

6/1989/B10/027

**PERBANYAKAN TANAMAN Pelargonium graveolens L 'Her.
DENGAN KULTUR DAUN SECARA IN VITRO**

Graha cipta milik IPB University

Halaman ini adalah milik IPB University dan tidak boleh diperjualbelikan atau dipinjamkan kepada pihak lain. Untuk informasi lebih lanjut, silakan hubungi bagian pustaka IPB University.

Oleh
RETNO MASTUTI



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
B O G O R
1 9 8 9**

RINGKASAN

RETNO MASTUTI. Perbanyak Tanaman *Pelargonium graveolens* L'Her. dengan Kultur Daun secara *In Vitro* (Di bawah bimbingan PUSPA DEWI TJONDRONEGORO, sebagai pembimbing pertama dan IKA MARISKA SUDHARMA sebagai pembimbing kedua).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari komposisi medium yang optimal untuk pertumbuhan kultur daun *Pelargonium graveolens* L'Her. secara *in vitro*.

Eksplan yang berupa potongan daun seluas $\pm 0.5 \text{ cm}^2$ dikulturkan pada medium Murashige dan Skoog (MS) padat yang diperkaya dengan zat pengatur tumbuh sitokinin dan auksin serta kombinasi keduanya. Percobaan disusun secara faktorial dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Untuk perlakuan pertunasan konsentrasi sitokinin yang diujikan ialah 0, 1, 3, 5 dan 7 mg/l, sedangkan konsentrasi auksin ialah 0, 0.5 dan 1 mg/l. Untuk perlakuan perakaran medium yang diujikan ialah medium MS dan MS1/2 ditambah NAA dengan konsentrasi 0, 0.5 dan 1 mg/l. Pada tahap aklimatisasi medium yang digunakan ialah medium pasir steril, campuran pasir dan tanah steril dengan perbandingan 1:1, serta campuran tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1.





Perubahan yang diamati ialah waktu terbentuknya kalus, waktu munculnya tunas dan akar serta jumlah tunas dan akar. Pada tahap aklimatisasi yang diamati adalah persentase keberhasilan plantlet yang tumbuh.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembentukan tunas adventif melalui dua cara, yaitu secara langsung tanpa pembentukan kalus dan secara tak langsung yang didahului dengan pembentukan kalus. Jumlah tunas adventif yang paling banyak cenderung dicapai pada medium yang diperkaya dengan BAP 1 mg/l + NAA 1 mg/l, yaitu 24.33. Penggunaan BAP pada konsentrasi 1 mg/l cenderung menghasilkan tunas adventif dalam jumlah banyak. Pada konsentrasi tinggi, yaitu 7 mg/l baik kinetin maupun BAP memberikan pengaruh yang menghambat pembentukan tunas adventif.

Pada medium perakaran, rata-rata jumlah akar terbanyak dicapai pada medium MS dengan penggunaan NAA 0.5 mg/l, tetapi keadaan akarnya kecil-kecil dan halus serta pemanjangan akarnya terhambat. Induksi akar juga dapat terjadi pada medium MS dan MS 1/2 tanpa penambahan auksin NAA. Pertumbuhan akar dan tunas pada medium MS lebih baik bila dibandingkan dengan medium MS1/2. Keadaan tersebut sangat menunjang keberhasilan pertumbuhan plantlet pada tahap aklimatisasi.

PERBANYAKAN TANAMAN *Pelargonium graveolens* L'Her.
DENGAN KULTUR DAUN SECARA *IN VITRO*

Oleh

RETNO MASTUTI

Laporan Penelaahan Masalah Khusus

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Biologi

pada

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Institut Pertanian Bogor

JURUSAN BIOLOGI

B O G O R

1 9 8 9

1. Untuk lebih jelasnya mengenai etika selayaknya juga bisa ditinjau secara umum dan diperkembangkan sendiri.
2. Untuk lebih jelasnya mengenai etika selayaknya juga bisa ditinjau secara umum dan diperkembangkan sendiri.
3. Untuk lebih jelasnya mengenai etika selayaknya juga bisa ditinjau secara umum dan diperkembangkan sendiri.

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 9 Mei 1965 di Ambon, sebagai puteri bungsu dari tujuh bersaudara. Orangtua bernama M. Suparyo (alm) dan Masamah.

Tahun 1978 penulis lulus dari Sekolah Dasar Negeri Barengkulon II Malang, tahun 1981 lulus dari Sekolah Menengah Pertama Negeri 1 Malang dan pada tahun 1984 penulis lulus dari Sekolah Menengah Atas Negeri 3 Malang.

Tahun 1984 penulis memasuki perguruan tinggi di Institut Pertanian Bogor melalui jalur Proyek Perintis II dan setahun kemudian menjadi mahasiswa Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

1. Mengingat pentingnya peranan dan peranan yang harus dijalankan oleh dosen pembimbing dan pembimbing junior.
2. Mengingat pentingnya peranan dan peranan yang harus dijalankan oleh dosen pembimbing dan pembimbing junior.
3. Mengingat pentingnya peranan dan peranan yang harus dijalankan oleh dosen pembimbing dan pembimbing junior.
4. Mengingat pentingnya peranan dan peranan yang harus dijalankan oleh dosen pembimbing dan pembimbing junior.
5. Mengingat pentingnya peranan dan peranan yang harus dijalankan oleh dosen pembimbing dan pembimbing junior.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena berkat rahmat dan karunia-Nya penulis telah dapat menyelesaikan laporan karya ilmiah ini.

Pada kesempatan ini perkenankanlah penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Ibu Ir. P. D. Tjondronegoro, MS., dan Ibu Dr. Ir. Ika Mariska Sudharma selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan bimbingan, kritik dan saran selama penelitian hingga tersusunnya tulisan ini, juga kepada ibu Ir. Tedja Imas selaku penguji.
2. Direktur Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bapak Dr. Ir. Pasril Wahid, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis dalam melaksanakan penelitian.
3. Seluruh staf dan pegawai Balittro, terutama bagian fisiologi (kultur jaringan) khususnya Mbak Endang, Deden dan Mbak Sri selama pelaksanaan penelitian.
4. Yang tercinta Ibu dan kakak-kakak serta mas Dian atas doa dan dorongan semangatnya selama pelaksanaan penelitian hingga tersusunnya tulisan ini.
5. Dina, Mona, Wati, Jaja dan Yogi serta semua pihak yang tidak bisa kami sebutkan satu-persatu, atas bantuannya selama pelaksanaan penelitian hingga tersusunnya tulisan ini.

Semoga segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan yang setimpal dari Allah SWT.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna dan akhirnya penulis berharap semoga tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkannya.

Bogor, April 1989

Penulis

Visi: Kita Jauh Lebih Unggul dan Berkualitas
Misi: Meningkatkan kualitas sumber daya manusia Indonesia yang unggul dan berkeadilan
1. Meningkatkan kualitas sumber daya manusia Indonesia yang unggul dan berkeadilan
2. Meningkatkan kualitas sumber daya manusia Indonesia yang unggul dan berkeadilan
3. Meningkatkan kualitas sumber daya manusia Indonesia yang unggul dan berkeadilan

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
T u j u a n	3
Hipotesis	3
TINJAUAN PUSTAKA	4
<i>Pelargonium</i> spp. (<i>Pelargonium graveolens</i> L'Her.)	4
Kultur Jaringan	7
Faktor-faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Kultur Jaringan	9
Eksplan (Bahan Tanaman)	10
Medium Kultur Jaringan	11
Garam-garam anorganik	11
Sumber karbon	12
Vitamin	13
Senyawa-senyawa organik	14
Zat pengatur tumbuh	15
Kondisi fisik medium	19
Kondisi Lingkungan Kultur	21
Cahaya	22

Nama Karya Penelitian: Unsur-unsur ...
 1. Olinging mengungkap ...
 2. ...
 3. ...

	Halaman
Temperatur	22
Kelembaban	23
Kultur Jaringan <i>Pelargonium</i> spp. ...	23
BAHAN DAN METODE	28
Waktu dan Tempat Penelitian	28
Bahan dan Alat	28
M e t o d e	29
Rancangan Percobaan	34
HASIL DAN PEMBAHASAN	37
Keadaan Eksplan	37
Pembentukan Kalus dan Tunas Adventif ...	39
Jumlah Tunas	44
Pembentukan Akar	49
Jumlah Akar	53
Aklimatisasi	59
KESIMPULAN DAN SARAN	64
Kesimpulan	64
Saran	64
DAFTAR PUSTAKA	66
LAMPIRAN	71

Nomor		Halaman
6.	Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Kedua	76
7.	Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Ketiga	76
8.	Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Keempat	77
9.	Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Kelima	77
10.	Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Keenam	78
11.	Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Ketujuh	78
12.	Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Kedelapan	79
13.	Sidik Ragam Kecepatan Induksi Akar	79
14.	Sidik Ragam Jumlah Akar pada Minggu Pertama	80
15.	Sidik Ragam Jumlah Akar pada Minggu Kedua	80
16.	Sidik Ragam Jumlah Akar pada Minggu Ketiga	81

Galeri foto milik IPB University

1. Mengingat pentingnya peranan akar dalam kehidupan tumbuhan, maka perlu dilakukan penelitian mengenai pertumbuhan dan perkembangan akar.
 2. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan akar pada minggu pertama, kedua, ketiga, keempat, kelima, keenam, ketujuh, kedelapan, dan kesembilan.
 3. Penelitian ini dilakukan di laboratorium fisiologi tumbuhan, IPB University.
 4. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode pengamatan langsung dan pengukuran.
 5. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan alat ukur yang sesuai.
 6. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan bahan-bahan yang sesuai.
 7. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan prosedur yang sesuai.
 8. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan hasil-hasil yang sesuai.
 9. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan kesimpulan yang sesuai.
 10. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan saran-saran yang sesuai.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Pelargonium adalah tanaman herba aromatik dari famili Geraniaceae, yaitu golongan tanaman yang bijinya mirip paruh burung bangau (kata Yunani *geranos* berarti burung bangau). Nama *Pelargonium* juga berasal dari kata Yunani yang juga berarti burung bangau. Pemberian nama tersebut karena bijinya berbentuk kapsul yang menyerupai paruh burung bangau (Anonymous, 1988).

Pelargonium merupakan salah satu tanaman penghasil minyak atsiri, yaitu minyak karnium (*geranium oil*) yang banyak digunakan dalam industri parfum, kosmetika dan makanan (Osman, 1973). Penanaman dalam skala besar untuk tujuan komersial telah lama dilakukan di Perancis bagian selatan yang memang terkenal dengan industri parfumnya.

Di Indonesia minyak atsiri telah menjadi salah satu komoditi ekspor nonmigas yang diharapkan dapat berperan sebagai sumber devisa negara. Pada tahun 1982 ekspor minyak atsiri mencapai 2 337 452 kg, bahkan pada tahun 1980 mencapai 2 717 120 kg (Tjiptadi, 1985). Pada saat ini pengembangan usaha minyak atsiri masih diarahkan pada penggalan sumber minyak atsiri alami dari berbagai jenis tanaman dan peningkatan produksi. Penggalan sumber minyak atsiri alami meliputi baik dari jenis tanaman yang sudah ada di Indonesia tetapi belum dikembangkan, maupun

Calla cipta milik IPB University

IPB University

Halaman 1 dari 10 | IPB University | Institut Pertanian Bogor

jenis tanaman dari luar Indonesia tetapi mempunyai potensi untuk dikembangkan di Indonesia (Tjiptadi, 1985).

Pelargonium bukan tanaman asli Indonesia, melainkan berasal dari Afrika Selatan yang beriklim subtropik (Bailey, 1949). Walaupun demikian tanaman *Pelargonium* mempunyai potensi untuk dikembangkan di Indonesia karena mempunyai kemampuan tumbuh di daerah tropis (Gulati, et al, dalam Atal dan Kapur, 1983). Mengingat fungsinya secara komersial cukup besar maka dalam usaha pengembangannya perlu dilakukan penelitian mengenai budidayanya, khususnya mengenai perbanyakan bahan tanaman secara massal. Salah satu alternatif teknologi pemecahannya adalah perbanyakan melalui kultur jaringan.

Sebenarnya tanaman *Pelargonium* mudah diperbanyak dengan teknik perbanyakan secara konvensional. Tetapi menurut Murashige (1974), teknik kultur jaringan mempunyai suatu kelebihan, yaitu kemampuan laju perbanyakannya yang ribuan kali lebih cepat.

Pada perbanyakan vegetatif melalui kultur jaringan salah satu faktor penting yang menentukan pembentukan tunas dan akar adalah keseimbangan zat pengatur tumbuh dalam medium. Pembentukan tunas dirangsang oleh zat pengatur tumbuh sitokinin, sedangkan pembentukan akar dirangsang oleh auksin (George dan Sherrington, 1984).

1. Otoling meengqs sebagai etalchkrh jngpkn br tngq meacurmer dan mpedekn sener
2. meengqs meengqs sebagai etalchkrh jngpkn br tngq meacurmer dan mpedekn sener
3. meengqs meengqs sebagai etalchkrh jngpkn br tngq meacurmer dan mpedekn sener

TINJAUAN PUSTAKA

Pelargonium spp. (*Pelargonium graveolens* L'Her.)

Menurut Benson (1957), klasifikasi *Pelargonium* spp. adalah sebagai berikut :

- Filum : Spermatophyta
- Klas : Angiospermae
- Ordo : Dicotyledonae
- Famili : Geraniaceae
- Genus : *Pelargonium*

Bailey (1949) serta Backer dan Van den Brink (1963) mengatakan bahwa famili Geraniaceae terdiri dari tiga genus, yaitu *Erodium*, *Pelargonium* dan *Geranium*. Sedang menurut Van Stennis (1958), famili Geraniaceae terdiri dari empat genus, yaitu *Geranium*, *Pelargonium*, *Erodium* dan *Sarcocaulan*. Perbedaan utama genus *Pelargonium* dengan tiga genus lainnya adalah adanya taji penyimpan madu (*nectary spur*) yang seluruhnya melekat/bersatu pada tangkai bunga. Tetapi menurut Macmillan (1954), *Pelargonium* merupakan nama botani dari *Geranium*.

Tanaman *Pelargonium* mempunyai lebih dari 230 jenis anggota (Bailey, 1949). Menurut Gulati, *et al*, dalam Atal dan Kapur (1982), sebagian besar dari jenis-jenis tersebut berasal dari Afrika Selatan (tumbuh alami di Afrika Selatan) yang beriklim subtropik. Selain di daerah beriklim subtropik yang menunjukkan pertumbuhan

terbaik, dikatakan pula bahwa *Pelargonium* dapat tumbuh di daerah-daerah dengan iklim sedang maupun tropik pada berbagai ketinggian.

Sebagian anggota *Pelargonium* dibudidayakan sebagai tanaman hias (Crocket, 1977), dan sebagian lagi merupakan penghasil minyak aromatik (minyak atsiri) yang dinamakan minyak geranium (Van Stennis, 1958). Minyak geranium terdapat pada bagian bunga (Bailey, 1949) atau pada rambut kelenjar di bagian daun (Macmillan, 1954). Minyak geranium diperoleh dari beberapa species dan varietas *Pelargonium*, yaitu *Pelargonium graveolens* L'Her., *P. capitatum* Linn. Ait., *P. odoratissimum* Linn. dan *P. radulata* var. *roseum* L'Her. (Doraswamy dan Sundaram dalam Atal dan Kapur, 1982). Di India yang utama dibudidayakan sebagai penghasil minyak geranium hanya varietas dan galur dari *P. graveolens* L'Her. (Gulati, et al, dalam Atal dan Kapur, 1982). *Pelargonium graveolens* L'Her. juga dibudidayakan di Mesir dengan skala luas sebagai sumber minyak geranium (Macmillan, 1954).

Menurut Backer dan Van den Brink (1963), *Pelargonium* kebanyakan merupakan herba tahunan (*perennial*) atau semak (*shrub*), ada yang merambat dan ada yang menjalar. Berdaun tunggal, dengan kedudukan atau tata letak daun berhadapan atau melingkar (*spirally*). Bunga terdapat di ketiak daun, berjumlah satu sampai tak terhingga,

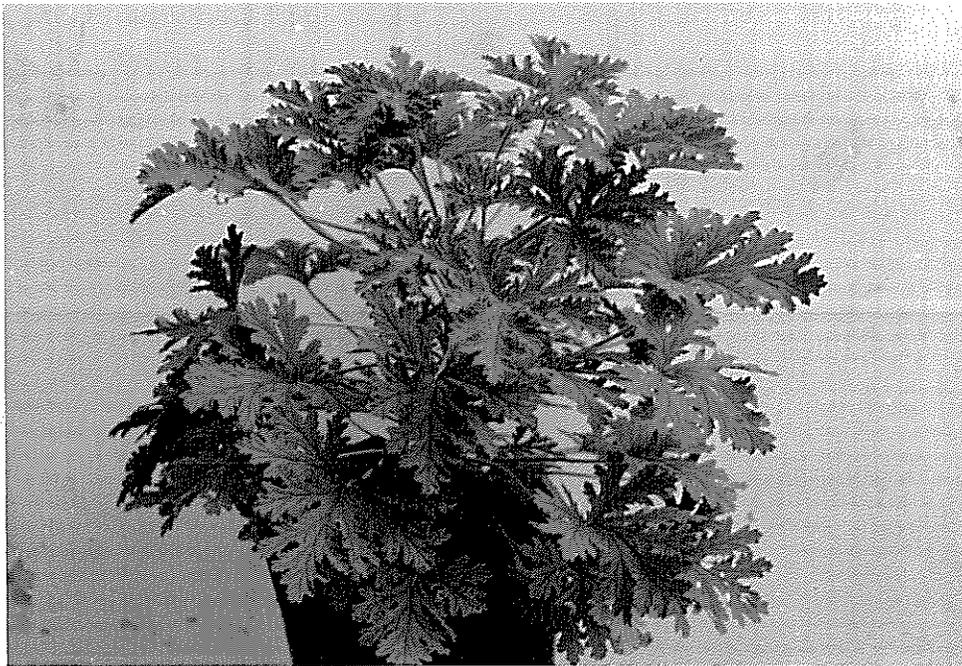
merupakan bunga majemuk terbatas atau majemuk tak terbatas, yaitu bentuk payung (*umbelliform*), serta bersimetri banyak atau setangkup tunggal. Kelopak bunga (sepal) berjumlah lima dan di bagian posterior terdapat satu yang terbesar. Taji (*spur*) seluruhnya melekat/bersatu dengan tangkai bunga. Mahkota bunga (petal) berjumlah lima, dua di bagian posterior berbeda dengan yang lain. Benangsari (stamen) berjumlah sepuluh, dimana bagian dasarnya bersatu. Dua sampai tujuh dari jumlah tersebut bersifat fertil, sedangkan satu mereduksi menjadi staminodia, serta tidak mempunyai kelenjar madu.

Menurut Bailey (1949), pertelaan *Pelargonium graveolens* L'Her. adalah sebagai berikut :

Pelargonium graveolens L'Her. (Gambar 1) merupakan tanaman tegak yang pangkal batangnya ada yang berkayu dan ada yang tidak. Batangnya tidak bersifat sukulen yang artinya tidak bersifat sebagai cadangan air.

Kedudukan atau tata letak daun hampir seluruhnya berhadapan, sistem pertulangannya menyirip (*pinnatus*) dengan tepian berlekuk menjari dan bergigi halus, tanpa bercak-bercak warna pada permukaan daunnya.

Bunganya merupakan bunga lengkap yang terdiri dari kelopak (kalik), mahkota (korola), organ kelamin betina (*gynoecium*) dan organ kelamin jantan (*androecium*). Kelopak disusun oleh lima helai daun kelopak (sepal), dan



Gambar 1. Tanaman *Pelargonium graveolens* L'Her.

mahkotanya disusun oleh lima helai daun mahkota (petal) yang panjangnya sama, yaitu antara 1.27 - 3.87 cm. Petal bertepi rata (*entire*), berwarna merah muda sampai ungu.

Kultur Jaringan

Perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan merupakan metode perbanyakan dengan cara menumbuhkan organ tanaman yang berukuran kecil atau bagian jaringan dalam suatu lingkungan buatan dimana penanamannya harus dalam kondisi aseptik (Drew, 1980b; George dan Sherrington, 1984). Kondisi aseptik disini berarti bahwa eksplan,

medium, lingkungan serta pelaksanaan penanaman harus dalam keadaan steril.

Menurut Murashige (1974), awal perkembangan kultur jaringan dimulai sejak dikemukakannya konsep totipotensi sel tanaman oleh Schwan dan Schleiden pada tahun 1938. Konsep totipotensi sel yang dimaksud adalah kemampuan sel untuk tumbuh dan berkembang menjadi individu yang sempurna jika ditempatkan dalam lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhannya.

Haberlandt merupakan orang pertama yang melakukan percobaan untuk menumbuhkan sel yang dipisahkan dari bagiannya yang diharapkan akan menjadi plantlet pada larutan mineral dengan menggunakan daun sebagai eksplan (Bhojwani dan Razdan, 1983). Eksplan adalah bahan tanaman yang digunakan dalam kultur jaringan berupa organ kecil atau bagian jaringan (George dan Sherrington, 1984). Sedangkan plantlet adalah tanaman hasil kultur jaringan yang telah mempunyai tunas akar dan tunas batang serta siap dipindahkan ke dalam pot.

Jaringan yang ditanam pada suatu medium akan mengalami diferensiasi, dapat langsung membentuk tunas atau terlebih dahulu membentuk kalus (kumpulan sel yang bersifat embrionik dan belum berdiferensiasi). Selanjutnya kalus ini dapat berdiferensiasi membentuk tunas adventif. Kalus pada umumnya terbentuk dari bagian jaringan tanaman

yang terpotong sebagai reaksi terhadap pelukaan (Hussey, 1978).

Pada prinsipnya dalam teknik kultur jaringan ada tiga tahap pekerjaan utama, yaitu: (1) membuat kultur aseptik (2) multiplikasi dan (3) pemeliharaan/perawatan untuk menumbuhkan tanaman di tanah kembali (Murashige, 1974; Drew, 1980a; Wetherell, 1982).

Perbanyak vegetatif dengan teknik kultur jaringan mempunyai beberapa keuntungan, yaitu: (1) mendapatkan tanaman yang sukar diperoleh secara konvensional, (2) mendapatkan bibit yang bebas patogen, (3) menghemat luasan area yang digunakan untuk pembibitan dan (4) tidak tergantung musim (Margara, 1984).

Pada tahun 1952 Morel dan Martin berhasil mendapatkan tunas kentang dan dahlia yang bebas virus. Kultur jaringan digunakan secara komersial pertama kali pada tahun 1960 oleh Morel untuk menghilangkan virus dan multiplikasi secara cepat pada anggrek *Cymbidium* (Drew, 1980a).

Faktor-faktor yang Mempengaruhi

Keberhasilan Kultur Jaringan

Keberhasilan kultur jaringan ditentukan oleh beberapa faktor, antara lain eksplan dan kondisi lingkungan.

Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur

jaringan diuraikan lebih jelas pada subbagian di bawah ini.

Eksplan (Bahan Tanaman)

Pada setiap jenis tanaman, tingkat keberhasilan kultur jaringan berbeda-beda, bahkan pada bagian-bagian yang berbeda dari satu jenis tanaman dapat memberikan hasil berbeda pula. Dalam memilih eksplan menurut Murashige (1974) terdapat beberapa faktor yang perlu diperhatikan, yaitu: (1) organ yang digunakan, (2) umur fisiologi atau ontogeni dari eksplan, (3) saat (musim) pengambilan eksplan, (4) ukuran dan (5) kualitas tanaman secara keseluruhan.

Jaringan yang belum mengalami diferensiasi umumnya lebih mudah tumbuh daripada jaringan yang telah mengalami diferensiasi. Selain itu pemakaian jaringan juvenil sebagai eksplan mempunyai tingkat keberhasilan yang tinggi (Pierik, 1988). Pada dasarnya semua bagian tanaman yang mengandung sel meristematik dapat dipakai sebagai eksplan. Organ tanaman yang telah berhasil dikulturkan adalah akar, batang, daun, ujung tunas, hipokotil, kotiledon, embrio, tunas lateral, nuselus, petiol dan beberapa komponen bunga (Murashige, 1974).

Ukuran eksplan merupakan salah satu faktor kritis. Ukuran eksplan yang besar mengandung jumlah sel yang lebih banyak, sehingga kemungkinan untuk hidup lebih

besar. Tetapi dengan ukuran yang besar eksplan sukar di-bebasikan dari kontaminasi mikroorganisme. Dilain pihak pemakaian eksplan yang terlalu kecil, ketahanan hidupnya kurang baik (George dan Sherrington, 1984).

Medium Kultur Jaringan

Kultur jaringan yang disebut juga kultur *in vitro* merupakan suatu sistem tertutup. Keadaan tersebut menyebabkan pengaturan komposisi medium yang merupakan zat makanan yang diperlukan harus diusahakan sebaik mungkin. Medium kultur jaringan umumnya terdiri dari garam-garam mineral, sumber karbon dan energi, vitamin dan zat pengatur tumbuh (Hughes dalam Conger, 1981).

Garam-garam anorganik. Garam-garam anorganik yang terkandung dalam komposisi medium terdiri dari unsur makro dan mikro. Unsur makro yang dibutuhkan dalam jumlah banyak terdiri dari N, P, K, Ca, Mg dan S. Sedangkan unsur mikro yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit ialah Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo, Bo, Al dan Ni (Gautheret, 1955).

Bila garam mineral dilarutkan dalam air akan mengalami dissosiasi dan ionisasi. Ion merupakan faktor aktif yang lebih penting dibanding bentuk senyawa. Satu tipe ion bisa diperoleh dari lebih dari satu jenis garam. Contohnya, dalam medium Murashige dan Skoog (1962) ion NO_3^- dapat diperoleh dari NH_4NO_3 maupun KNO_3 dan ion K^+

dapat diperoleh dari KNO_3 dan KH_2PO_4 (Bhojwani dan Razdan, 1983).

Sumber Karbon. Pada tahun 1902 Haberlandt mencoba mengkulturkan sel mesofil daun yang berwarna hijau dengan dugaan bahwa sel yang berwarna hijau kebutuhan nutrisinya lebih sederhana. Tetapi ternyata dugaan tersebut tidak dapat dibuktikan kebenarannya. Selanjutnya diketahui bahwa jaringan yang pada mulanya hijau di dalam kultur secara perlahan-lahan akan kehilangan pigmen hijaunya (Bhojwani dan Razdan, 1983).

Umumnya pada keadaan awal eksplan bersifat heterotrof. Sel tanaman yang diisolasi dalam kultur *in vitro* hanya sebagian kecil yang bersifat autotrof dan diduga kebutuhan akan karbohidratnya dipenuhi oleh CO_2 selama fotosintesis (George dan Sherrington, 1984). Umumnya untuk mengkulturkan sel, jaringan atau organ perlu ditambahkan karbon sebagai sumber energi ke dalam medium. Sumber karbon yang dapat digunakan ialah sukrosa, glukosa dan fruktosa. Pemberian sukrosa dapat menghasilkan pertumbuhan yang lebih baik (George dan Sherrington, 1984). Sebagai sumber karbon sukrosa biasa digunakan dengan konsentrasi 2 - 3 % (Seabrook dalam Staba, 1980). Ball (1955) dalam Bhojwani dan Razdan (1983) menunjukkan bahwa sukrosa yang diautoklaf mempunyai pengaruh yang lebih baik daripada sukrosa yang disterilisasi dengan

filter. Selama diautoklaf ternyata sukrosa mengalami hidrolisis menjadi bentuk gula yang kegunaannya lebih efisien. Proses ini terjadi karena kerja enzim invertase yang terdapat dalam dinding sel (Burstorm, 1957) atau enzim ekstraselular yang dilepaskan (King dan Street *dalam* Street, 1977).

Vitamin. Tanaman mempunyai kemampuan mensintesis vitamin yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan (Gamborg dan Shyluk, *dalam* Thorpe, 1981; Wattimena, 1987), tetapi sel yang dikulturkan kemampuan mensintesisnya menjadi berkurang (Czosmowski, 1952 *dalam* Bhojwani dan Razdan, 1983).

Untuk mendapatkan pertumbuhan jaringan yang baik, ke dalam medium sering ditambahkan satu atau lebih vitamin. Menurut George dan Sherrington (1984), vitamin dibutuhkan oleh sel tanaman untuk proses katalisis dalam metabolisme. Dalam hal ini thiamin (vitamin B1) telah terbukti merupakan bahan essensial yang umum digunakan. Jenis vitamin lain terutama piridoksin (vitamin B6), asam nikotinat (vitamin B3), kalsium pantothenat (vitamin B5) dan inositol diketahui dapat memperbaiki pertumbuhan bahan tanaman yang dikulturkan (Seabrook *dalam* Staba, 1980).

Thiamin adalah jenis vitamin yang kritis (Seabrook *dalam* Staba, 1980) dan biasanya tersedia dalam kisaran 0.1 - 0.4 mg/l. Murashige dan Skoog (1962) menyatakan

bahwa kombinasi campuran myo-inositol, thiamin, asam nikotinat dan piridoksin telah diketahui berhasil untuk kultur jaringan beberapa species tanaman.

Inositol tidak bersifat essensial. Namun demikian rata-rata digunakan pada konsentrasi tinggi sebanyak 100 mg/l (Bhojwani dan Razdan, 1983). Menurut Hughes *dalam* Conger (1981), myo-inositol dengan konsentrasi 50 - 100 mg/l dapat mendorong pertumbuhan beberapa varietas *Pelargonium hortorum*. Biotin (vitamin B), cholin, asam folat, asam pantothenat dan riboflavin biasanya digunakan untuk mencegah terhambatnya pertumbuhan eksplan. Asam askorbat dan asam sitrat juga sering digunakan untuk menghambat pencoklatan (*browning*) pada jaringan yang disebabkan karena adanya oksidasi fenol (Bhojwani dan Razdan, 1983).

Senyawa-senyawa organik. Asam amino merupakan sumber N organik yang pengambilannya lebih cepat daripada N anorganik dalam medium yang sama (Thome, *et al*, 1981 *dalam* George dan Sherrington, 1984). Menurut Gautheret (1955), asam amino yang biasa digunakan adalah glisin, histidin, leusin, lisin, valin, alanin dan asam aspartat. Pada konsentrasi rendah asam amino tidak begitu berpengaruh tetapi bila konsentrasinya semakin meningkat dapat berubah sebagai racun.

Disamping golongan persenyawaan organik yang konstitusinya jelas, dalam medium kultur kadang-kadang juga ditambahkan persenyawaan yang kompleks, yang komposisinya dapat berbeda dari sumber yang satu dengan yang lainnya (Winata, 1987). Beberapa senyawa organik lain dengan konsentrasi yang tidak terbatas biasanya digunakan pada medium awal kultur jaringan (George dan Sherrington, 1984). Senyawa organik tersebut merupakan senyawa alami antara lain kasein hidrolisat, air kelapa, ekstrak pati dan sari buah. Tetapi penggunaan senyawa alami ini hendaknya sejauh mungkin dihindarkan (Bhojwani dan Razdan, 1983). Senyawa alami hendaknya hanya digunakan jika usaha dengan menggunakan komposisi medium tertentu mengalami kegagalan atau bila diinginkan adanya keuntungan lain dari penambahan senyawa alami tersebut (Murashige, 1974).

Zat pengatur tumbuh. Selain penambahan nutrisi, di dalam kultur juga sering ditambahkan satu atau lebih zat pengatur tumbuh yang merangsang pertumbuhan jaringan dan organ (Bhojwani dan Razdan, 1983).

Zat pengatur tumbuh adalah senyawa organik yang berfungsi merangsang pertumbuhan tanaman. Secara umum fungsinya adalah mengarahkan pertumbuhan eksplan.

Menurut George dan Sherrington (1984), zat tumbuh tanaman (*plant growth substances*) atau hormon tumbuh adalah senyawa alami yang terdapat dalam jaringan tanaman

(endogen). Sedangkan zat pengatur tumbuh sintetis adalah senyawa kimia yang mempunyai aktifitas atau pengaruh fisiologis yang sama dengan yang alami. Disamping berpengaruh langsung terhadap mekanisme selular, beberapa zat pengatur tumbuh sintetis juga dapat memodifikasi zat pengatur tumbuh endogen.

Pertumbuhan dan morfogenesis *in vitro* diatur oleh interaksi dan keseimbangan antara zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam medium dengan zat tumbuh yang dihasilkan secara endogen oleh sel yang dikulturkan (George dan Sherrington, 1984).

Menurut Margara (1984) beberapa sifat zat pengatur tumbuh yang perlu diperhatikan ialah : (1) pada konsentrasi rendah merangsang pertumbuhan jaringan tanaman, sedang pada konsentrasi tinggi menghambat atau bahkan mematikan, (2) pengaruh yang diberikan lebih disebabkan oleh keseimbangan atau interaksi zat pengatur tumbuh, (3) dapat berpengaruh banyak terhadap respon fisiologi tanaman, dan (4) senyawa alami lebih mudah dikontrol oleh enzim tanaman dibanding senyawa sintetis.

Zat pengatur tumbuh yang biasa digunakan dalam kultur jaringan ada lima jenis, yaitu sitokinin, auksin, gibberelin, asam absisik dan etilen (Weier, Stocking dan Barbour, 1974). Tetapi pada umumnya yang paling banyak dipakai pada kultur jaringan untuk mengatur pertumbuhan



serta morfogenesis jaringan tanaman dan organ yang dikul-
turkan adalah sitokinin dan auksin.

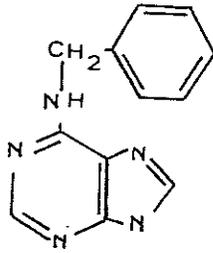
Sitokinin adalah zat pengatur tumbuh yang menginduk-
si pembelahan sel (Yeoman, 1982), mendorong proliferasi
tunas dan diferensiasi tunas adventif dari kalus dan
organ (Szezykowska, 1974; Wetherell, 1982). Menurut
Skog dan Armstrong (1970), sitokinin berperan dalam semua
fase perkembangan tanaman, dari pembelahan dan pembesaran
sel sampai pembentukan bunga dan buah.

Konsentrasi sitokinin yang memungkinkan untuk proli-
ferasi tunas dapat menghambat inisiasi dan pertumbuhan
akar (Wetherell, 1982). Hal ini juga dikatakan oleh
Prawiranata, Harran dan Tjondronegoro (1981), bahwa pem-
belahan sel pada meristem akar menjadi terhambat oleh si-
tokinin dari luar. Beberapa aspek diferensiasi selular
dan organogenesis jaringan dari organ yang dikulturkan,
ternyata dikontrol oleh interaksi antara konsentrasi
sitokinin dan auksin. Umumnya rasio auksin/sitokinin
yang tinggi akan mendorong perakaran (George dan
Sherrington, 1984).

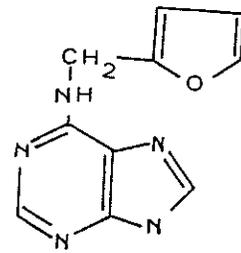
Sitokinin adalah derivat dari adenin (Moore, 1979).
Beberapa sitokinin yang biasa dipakai dalam kultur ja-
rangan adalah 2-Isopentenil adenin (2-iP), zeatin,
benzylamino purin (BAP) dan 6-furfurylamino purin (kine-
tin). Zeatin dan 2-iP adalah sitokinin alami sedangkan



BAP dan kinetin adalah sitokinin sintetik (Weier, Stocking dan Barbour, 1974). Kinetin dan BAP mempunyai daya efektivitas yang hampir sama, tetapi BAP aktivitasnya lebih tinggi (Murashige, 1974). Menurut Jona dan Gribaudo (1987) yang melakukan penelitian terhadap pembentukan kuncup adventif dari eksplan daun *Ficus lyrata*, BAP merupakan kebutuhan yang sangat penting untuk diferensiasi kuncup adventif. Rumus bangun BAP dan kinetin disajikan pada Gambar 2.



Benzylamino purin (BAP)

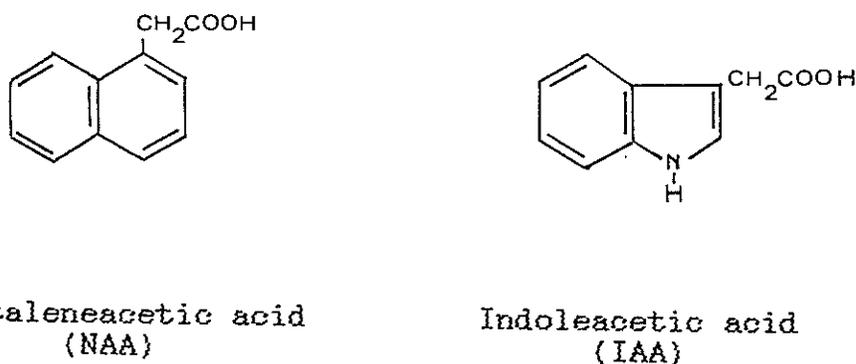


6-furfurylamino purin
(kinetin)

Gambar 2. Rumus Bangun BAP dan Kinetin

Auksin adalah zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk pembelahan sel dan diferensiasi akar (Bhojwani dan Razdan, 1983). Auksin juga mempunyai kemampuan menginduksi pemanjangan sel tunas (Moore, 1979). Beberapa macam auksin yang biasa digunakan dalam kultur jaringan adalah indoleacetic acid (IAA), indolebutyric acid (IBA),

naphtaleneacetic acid (NAA), dan 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Dari keempat macam auksin tersebut, IAA merupakan satu-satunya auksin alami yang terbentuk dari tryptophan, yang merupakan suatu senyawa dengan inti *Indole* dan selalu terdapat dalam jaringan tanaman (Abidin, 1983). Jenis auksin IBA dan NAA biasanya digunakan untuk perakaran dan berinteraksi dengan sitokinin untuk proliferasi tunas. Sedang 2,4-D sangat efektif untuk induksi pertumbuhan kalus (Bhojwani dan Razdan, 1983). Rumus bangun NAA dan IAA disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Rumus Bangun NAA dan IAA

Kondisi fisik medium. Kondisi fisik medium yang telah menunjukkan pengaruh besar terhadap pertumbuhan tanaman pada kultur aseptik adalah kepadatan medium. Agar yang merupakan polisakarida dari ganggang laut (Bhojwani dan Razdan, 1983), telah banyak digunakan untuk

memperoleh medium padat atau semipadat pada kultur jaringan tanaman (George dan Sherrington, 1984).

Menurut George dan Sherrington (1984), penggunaan agar mempunyai beberapa keuntungan, yaitu :

- dalam bentuk gel bersifat stabil pada temperatur inkubasi karena gel akan mencair pada temperatur 100°C dan mulai memadat pada temperatur 45°C.
- dalam bentuk gel tidak diuraikan oleh enzim tanaman.
- agar tidak bereaksi dengan konstituen medium.

Dalam menggunakan medium padat yang penting untuk dipertimbangkan adalah konsentrasi dan kualitas agar. Pertumbuhan terbaik terjadi pada medium yang mengandung agar murni *Difco*. Kepadatan gel yang ditentukan oleh konsentrasi agar dan pH medium harus disesuaikan dengan bagian tanaman yang akan dikulturkan (Murashige, 1974). Konsentrasi agar yang digunakan berkisar antara 0.8-1.0 %. Bila konsentrasi ditingkatkan medium menjadi keras dimana keadaan ini tidak memungkinkan penyerapan nutrisi oleh jaringan (George dan Sherrington, 1984).

Menurut Murashige (1974), pH medium merupakan faktor kritis. Biasanya pH diatur sekitar 5 - 6 sebelum sterilisasi. Bila pH lebih dari 6 maka medium akan keras dan bila pH di bawah 5 medium menjadi lunak.

Banyaknya medium yang diisikan ke dalam botol kultur juga harus diperhatikan. Menurut Seabrook dalam Staba

(1980), bila medium terlalu banyak akan menghambat pertumbuhan. Sedang bila terlalu sedikit laju pertumbuhan jaringan menjadi lambat.

Medium padat banyak digunakan karena kultur yang demikian sangat baik untuk pemeliharaan, dan untuk beberapa tujuan tertentu memberikan hasil yang memuaskan. Tetapi agar bukan merupakan komponen yang esensial dalam medium. Sel tunggal dan agregat sel dapat tumbuh pada kultur suspensi dalam medium cair yang mengandung nutrien organik maupun anorganik dan faktor tumbuh lain (Bhojwani dan Razdan, 1983).

Pada kultur yang menggunakan medium cair bila jaringan ditenggelamkan maka jaringan akan mati karena kekurangan oksigen (Bhojwani dan Razdan, 1983). Untuk mengatasi hal tersebut biasanya dilakukan pengocokan medium sehingga respirasi jaringan meningkat. Disamping itu pengocokan medium cair juga bermaksud : (a) memperluas hubungan antara jaringan dan medium, (b) menghindari polaritas yang ada dalam medium, dan (c) mengencerkan senyawa racun (Scully, 1967).

Kondisi Lingkungan Kultur

Faktor fisik lain yang perlu diperhatikan pada lingkungan kultur jaringan adalah cahaya dan temperatur. Tetapi sering juga dilaporkan mengenai pengaruh kelembaban relatif.

Cahaya. Kebutuhan cahaya pada kultur jaringan tidak sama dengan perkembangan autotrof pada tanaman yang tumbuh secara konvensional. Pada kultur jaringan fotosintesis bukan merupakan aktifitas yang penting. Kultur hanya tergantung pada sukrosa, kecuali mungkin pada tahap III dimana karbohidrat harus tersedia dalam jumlah cukup. Cahaya lebih dibutuhkan untuk mengatur proses morfogenesis (Murashige, 1974; George dan Sherrington, 1984).

Murashige (1974) menyatakan bahwa intensitas penyinaran untuk menumbuhkan *Asparagus*, *Gerbera*, dan *Saxifraga* pada tahap I dan II adalah 1 000 luks, sedang pada tahap III adalah 3 000 - 10 000 luks selama 16 jam sehari. *Pelargonium* dapat mengalami multiplikasi tunas secara terus-menerus dibawah intensitas penyinaran 500 luks (Debergh dan Maene, 1977). Jumlah tunas yang dihasilkan tiap eksplan tergantung panjang periode gelap terang (Murashige, 1974). Tetapi dari percobaan Pillai dan Hilderbrandt (1969), menunjukkan bahwa kalus *Pelargonium* bila diberi intensitas penyinaran sangat tinggi tidak akan berwarna hijau dan membentuk kuncup adventif.

Temperatur. Temperatur kultur umumnya mempunyai arti lebih tinggi daripada temperatur lingkungan pada tanaman yang tumbuh secara *in vivo*. Sebagian besar jaringan yang dikulturkan disimpan di ruang tumbuh dengan temperatur yang sama pada siang dan malam. Pada kultur

in vitro temperatur konstan yang digunakan adalah antara 20 - 25°C. Tetapi temperatur antara 25 - 27°C juga umum digunakan (George dan Sherrington, 1984). Hal tersebut juga dikatakan oleh Hilderbrandt dalam Kruse dan Patterson (1973), bahwa sebagian besar kultur dapat tumbuh baik pada temperatur 26 - 30°C.

Kelembaban. Biasanya kelembaban relatif di lingkungan mikro adalah 100 % (Wetherell, 1982; George dan Sherrington, 1984). Tetapi dalam botol kultur kelembabannya mencapai 95 %. Kelembaban relatif dalam ruang tumbuh adalah 70 %. Bila kelembaban dalam ruang tumbuh lebih rendah, maka penguapan yang terjadi di dalam kultur akan meningkat. Bila kelembaban dalam ruang tumbuh terlalu tinggi beberapa mikroorganisme akan tumbuh. Kondisi ini juga dapat meningkatkan jumlah spora sehingga bisa meningkatkan laju kontaminasi (Wetherell, 1982).

Kultur Jaringan *Pelargonium* spp.

Pada awalnya pembiakan *Geranium* secara konvensional dilakukan dengan cara pemotongan terminal atau kuncup daun. Tetapi tanaman yang dipelihara sering diserang penyakit. Benih yang dibiakkan dari hibrid F1 sering terserang virus sehingga benih tidak dapat tumbuh. Pada pembiakan vegetatif hibrid *Geranium* menunjukkan bahwa berkurangnya kegiatan fisiologis tidak hanya disebabkan



oleh reduksi virus, tetapi juga disebabkan bakteri dan cendawan. Oleh karena itu, untuk pembiakan klonal *Geranium* secara massal yang bebas patogen perlu digunakan metode kultur jaringan (Harney dalam Tomes, 1982).

Penelitian di laboratorium dimulai dengan induksi kalus dari mata tunas dari beberapa species. Medium yang digunakan adalah medium dasar MS ditambah NAA 0.5 mg/l dan kinetin 0.5 mg/l. Dua bulan setelah penanaman terjadi diferensiasi tunas, dan plantlet yang dihasilkan siap dipindahkan ke tanah (Harney dalam Tomes, 1982).

Pada tahun 1967 Chen dan Galston berhasil menginduksi pembentukan kalus dari eksplan empulur, dengan zat pengatur tumbuh sitokinin dan auksin. Pada medium White yang telah diperkaya dengan IAA 1 mg/l dan BAP 1.5 mg/l, sel empulur *Pelargonium* dapat diinduksi untuk membelah dan membentuk kalus. Selanjutnya jaringan kalus tersebut disubkultur pada medium dengan komposisi kimia yang sama atau pada medium Murashige dan Skoog (MS). Jaringan kalus dalam kultur berlanjut tersebut tampak kekuningan, sangat *friable* dan tidak terorganisasi. Tetapi jika kalus yang terinduksi tetap dikulturkan pada medium yang sama selama dua bulan atau lebih akan terjadi diferensiasi dan pada permukaan jaringan akan terbentuk nodul, tetapi tidak terjadi perkembangan tunas dan akar.

Perkembangan tunas dan akar baru terjadi jika jaringan kalus yang mengandung nodul dipindahkan ke medium cair White atau MS dengan atau tanpa IAA 1 mg/l dan BAP 1.5 mg/l. Jika jaringan kalus yang mengandung nodul dipindahkan langsung ke medium semipadat dengan penambahan IAA 1 mg/l dan BAP 1 mg/l sel kalus akan terus membelah menghasilkan jaringan kalus baru, sementara itu nodul berhenti berkembang. Sebaliknya jika auksin dan sitokinin tidak ditambahkan ke dalam medium tersebut, nodul akan membentuk tunas dan akar. Tunas akan terus berkembang dan membentuk daun. Selanjutnya beberapa akar dibentuk dari bagian dasar tunas.

Pillai dan Hilderbrandt (1968) dapat menginduksi proses diferensiasi kalus menjadi tunas dan akar pada medium MS padat yang diperkaya NAA 0.1 mg/l dan kinetin 10.0 mg/l. Diketahui juga bahwa rambut akar dapat ditumbuhkan dengan mengkulturkan plantlet pada jembatan kertas filter. Selain itu juga dihasilkan tanaman secara langsung yang berasal dari eksplan batang satu buku pada medium MS dengan penambahan kinetin 0.04 mg/l dan IAA 10.0 mg/l atau kinetin 10.0 mg/l dan IAA 0.1 mg/l.

Selanjutnya Pillai dan Hilderbrandt (1969) dapat menginduksi pembentukan kalus dari bermacam-macam eksplan pada medium yang diperkaya dengan 2,4-D. Kalus dapat menghasilkan tunas jika dikulturkan segera ke medium MS

yang mengandung NAA 0.03 - 4 mg/l dan kinetin 8 - 10 mg/l (tergantung varietas), tetapi pelaksanaan subkultur dapat menyebabkan kemampuan tunas beregenerasi akan hilang dengan cepat.

Debergh dan Maene (1977) menghasilkan beberapa tunas tiap kultur dalam medium MS yang dimodifikasi dengan penambahan IAA 0.5 mg/l dan kinetin 10 mg/l. Perakaran dilakukan pada medium yang mengandung IAA 0.1 mg/l.

Penelitian pada tangkai daun *PeIargonium* (± 2 cm) juga telah dilaksanakan dengan cara penanaman pada medium MS dengan sukrosa 3 % dan zeatin 1 mg/l. Perlakuan ini dapat menyebabkan tumbuhnya tunas adventif secara langsung, setelah pembentukan sejumlah kecil kalus, atau dari nodul hijau yang dibentuk dari kalus (Cassels, 1979 dalam George dan Sherrington, 1984).

Dari eksplan mata tunas lateral dapat pula dibentuk tunas majemuk yang banyak bila pada medium ditambahkan BAP 2 mg/l dan NAA 0.5 mg/l (Mariska, Gati dan Sukmadjaja, 1988). Penelitian lain yang juga dilakukan Mariska, Gati dan Sukmadjaja (1988), menunjukkan bahwa tunas adventif dengan jumlah yang banyak dapat dihasilkan oleh eksplan tangkai daun pada medium MS dengan penambahan BAP 1 mg/l, NAA 0.5 mg/l dan air kelapa 15 %. Diketahui juga bahwa akar dapat terbentuk pada medium MS tanpa adanya IAA.

Menurut Harney *dalam* Tomes (1982), masalah utama dalam mengkulturkan *Pelargonium* adalah dihasilkannya senyawa fenol oleh eksplan. Senyawa ini bila dalam keadaan teroksidasi dapat bersifat racun yang menyebabkan pencoklatan pada medium di sekitar eksplan. Hors *et al.* (1976) *dalam* Tomes (1982) menyatakan bahwa untuk mencegah proses pencoklatan dapat dipakai senyawa myo-inositol 100 mg/l dan L-sistein 25 mg/l yang ditambahkan ke dalam medium. Walaupun telah dicoba sejumlah antioksidan tetapi teknik terbaik adalah memindahkan eksplan ke medium segar satu minggu setelah kultur awal.

Untuk menginduksi akar medium yang digunakan ialah medium MS dan MS1/2 (medium MS dicairkan setengahnya) yang masing-masing diperkaya dengan zat pengatur tumbuh NAA 0, 0.5 dan 1.0 mg/l.

Pada tahap aklimatisasi digunakan dua macam medium, yaitu pasir steril dan campuran pasir dan tanah steril dengan perbandingan 1:1. Setelah plantlet dipindahkan ke rumah kaca, medium yang digunakan adalah campuran tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1. Penyiraman dilakukan dengan air biasa.

Alat-alat yang digunakan ialah oven, autoklaf, timbangan neraca, erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, labu ukur, corong, pH meter, *hot plate* dan *stirer*-nya, cawan Petri, pisau diseksi, pinset, gunting, pembakar bunsen, kotak tanam (*laminar air flow*), rak kultur, alat-alat laboratorium lainnya serta *polybag* dan kantung plastik bening untuk tahap aklimatisasi.

M e t o d e

Pada dasarnya penelitian ini terdiri dari tiga tahap, yaitu tahap pendahuluan yang bertujuan untuk mempersiapkan eksplan sebagai pohon induk sampai memperoleh jumlah yang cukup. Tahap kedua merupakan tahap pembentukan tunas dan akar dari eksplan yang berasal dari pohon induk. Tahap ketiga adalah tahap aklimatisasi.

Pada penelitian ini pertama kali yang harus dilakukan adalah pembuatan medium. Garam-garam mineral makro maupun mikro telah disediakan dalam stok larutan baku, yang bertujuan untuk memudahkan pengambilan. Masing-masing larutan baku dipipet dalam jumlah tertentu sesuai dengan komposisi medium Murashige dan Skoog (1962) seperti yang terdapat pada Tabel Lampiran 1 dan dicampurkan ke dalam erlenmeyer yang sebelumnya telah dibilas dengan akuades steril terlebih dahulu. Pengambilan zat pengatur tumbuh dilakukan dengan cara yang sama. Sukrosa sebanyak 30 g dimasukkan ke dalam larutan tersebut, kemudian diencerkan sampai 1 000 ml. Derajat keasaman (pH) medium diukur dengan pH meter dan diatur sekitar 5.5 dengan menambahkan HCl 0.1 N atau KOH/NaOH 0.1 N.

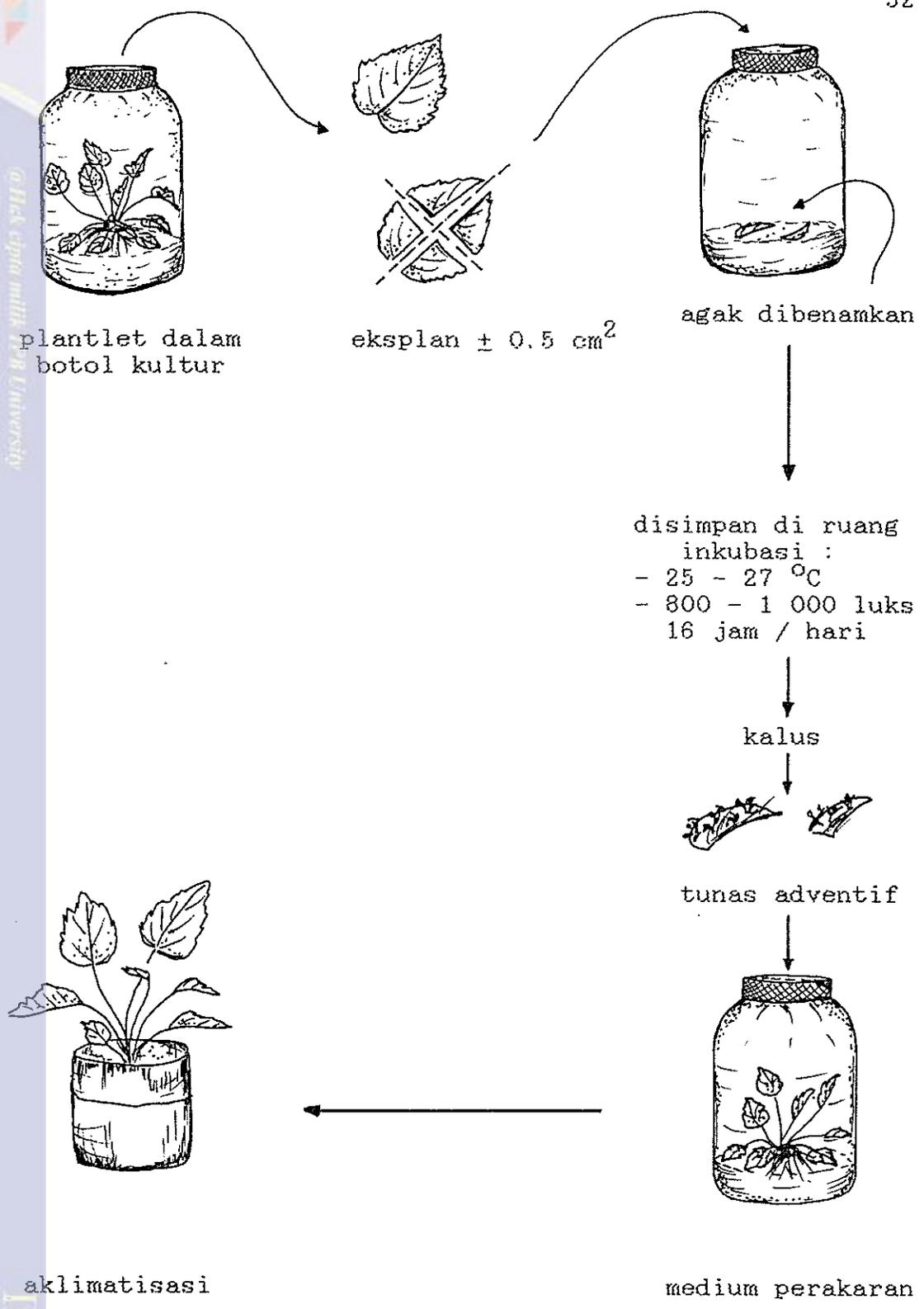
Setelah ditambahkan agar Bakto sebanyak 7.5 g/l ke dalam larutan tersebut, kemudian dididihkan dan diaduk dengan *stirer* sampai agar larut semuanya. Setelah mendidih larutan medium dituang ke dalam botol-botol kultur yang bervolume 100 ml yang sebelumnya telah disterilisasi terlebih dahulu di dalam oven pada temperatur 125°C selama 1 - 2 jam. Pengisian ke dalam botol kultur sebanyak kira-kira 1/5 botol, kemudian ditutup dengan kertas aluminium dan disterilisasi di dalam autoklaf pada temperatur 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit.

Salah satu aspek penting dalam kultur jaringan adalah pelaksanaan penanaman eksplan pada medium harus dalam keadaan steril agar tidak terkontaminasi oleh cendawan maupun bakteri. Penanaman eksplan dilakukan di dalam kotak tanam yang telah disterilisasi dengan alkohol dan penyinaran sinar ultra violet selama lebih kurang 1 jam. Alat-alat untuk penanaman seperti pisau, pinset dan gunting sebelumnya disterilisasi terlebih dahulu dalam oven pada temperatur 125°C selama 30 menit. Bila alat-alat telah siap semua maka pelaksanaan kerja dapat segera dimulai. Skema urutan pelaksanaan metode penanaman dapat dilihat pada Gambar 4.

Eksplan dalam botol kultur diambil dengan pinset steril, kemudian diletakkan di cawan Petri dan dilakukan pemotongan daun dengan ukuran yang sudah ditentukan. Sebelum digunakan pinset, gunting dan pisau harus selalu dibakar setelah dicelup ke dalam alkohol untuk menjaga agar tetap steril. Potongan-potongan daun dimasukkan ke dalam botol kultur yang berisi medium. Tiap-tiap botol kultur diisi dua potong daun. Cara meletakkan daun agak dibenamkan ke dalam medium dan permukaan sebelah bawah daun bersentuhan langsung dengan medium.

Eksplan yang telah dikulturkan kemudian disimpan di atas rak kultur dalam ruang inkubasi dengan suhu ruang antara $25 - 27^{\circ}\text{C}$. Sumber cahaya berasal dari lampu neon

1. Otolong meyakini sebagai ahli dalam bidang perikanan air tawar, terutama mengenai budidaya ikan air tawar. 2. Berikan penjelasan mengenai aspek-aspek yang berkaitan dengan budidaya ikan air tawar, terutama mengenai aspek-aspek yang berkaitan dengan budidaya ikan air tawar. 3. Berikan penjelasan mengenai aspek-aspek yang berkaitan dengan budidaya ikan air tawar, terutama mengenai aspek-aspek yang berkaitan dengan budidaya ikan air tawar.



Gambar 4. Urutan Pelaksanaan Metode Penanaman

fluorescen (TL) 40 watt dengan intensitas penyinaran 800 - 1 000 luks selama 16 jam sehari.

Bila tunas adventif telah terbentuk dan siap dipindahkan, kemudian dilakukan penanaman pada medium perakaran. Setelah lebih kurang tiga minggu dalam medium perakaran, plantlet telah siap dikeluarkan dari botol kultur untuk dilakukan aklimatisasi.

Tahap aklimatisasi merupakan tahap adaptasi plantlet sebelum ditanam di lapang. Hal ini dimaksudkan agar dalam pemindahan ke lingkungan luar yang tidak steril dan kurang terkontrol plantlet tidak mengalami *stress* atau kematian. Setiap pengambilan dari botol kultur plantlet dicuci pada air mengalir sehingga tidak ada medium yang masih menempel. Medium yang masih menempel pada plantlet dapat mengakibatkan tumbuhnya cendawan atau bakteri yang selanjutnya dapat menyerang plantlet. Sterilisasi medium aklimatisasi sama dengan sterilisasi alat-alat.

Pada percobaan pendahuluan digunakan dua macam medium, yaitu pasir steril saja dan campuran pasir dan tanah steril dengan perbandingan 1 : 1. Hal ini bertujuan untuk mencari medium yang memberikan pengaruh lebih baik terhadap keberhasilan pertumbuhan plantlet pada tahap aklimatisasi. Selama tiga minggu pertama tanaman diberi penyungkup dengan kantong plastik bening, untuk menjaga kelembaban dan disimpan di laboratorium. Setelah

penyungkup dibuka kemudian dipindahkan ke rumah kaca. Beberapa hari kemudian dipindahkan ke medium tanah campuran pupuk kandang dengan perbandingan 1 : 1.

Pengamatan untuk induksi tunas pada bulan pertama dilakukan setiap hari yang bertujuan untuk lebih dapat mengamati saat pembentukan kalus dan tunas. Pengamatan selanjutnya dilakukan setiap minggu. Sedangkan pada induksi akar pengamatan dilakukan setiap hari sampai minggu ketiga.

Peubah yang diamati selama eksplan dalam botol kultur adalah saat terbentuknya kalus, saat keluarnya tunas dan akar, jumlah tunas dan jumlah akar tiap botol kultur. Pada tahap aklimatisasi yang diamati adalah persentase plantlet yang tumbuh.

Rancangan Percobaan

Percobaan disusun secara faktorial dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Pada perlakuan pertunasan terdiri dari tiga faktor, yaitu jenis dan konsentrasi auksin (NAA/IAA), jenis sitokinin dan konsentrasi sitokinin. Masing-masing perlakuan diulang 10 kali (Tabel Lampiran 2). Model liniernya adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + E_{ijkl}$$

Y_{ijkl}	= pengamatan terhadap respon tanaman yang memperoleh pengaruh faktor A pada taraf ke-i, faktor B pada taraf ke-j, faktor C pada taraf ke-k, dan pada ulangan ke-l
\bar{u}	= rata-rata umum
A_i	= pengaruh jenis dan konsentrasi auksin pada taraf ke-i, $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$
B_j	= pengaruh jenis sitokinin pada taraf ke-j, $j = 1, 2$
C_k	= pengaruh konsentrasi sitokinin pada taraf ke-k, $k = 1, 2, 3, 4$
$(AB)_{ij}$	= pengaruh interaksi faktor A pada taraf ke-i dan faktor B pada taraf ke-j
$(AC)_{ik}$	= pengaruh interaksi faktor A pada taraf ke-i dan faktor C pada taraf ke-k
$(BC)_{jk}$	= pengaruh interaksi faktor B pada taraf ke-j dan faktor C pada taraf ke-k
$(ABC)_{ijk}$	= pengaruh interaksi faktor A pada taraf ke-i, faktor B pada taraf ke-j dan faktor C pada taraf ke-k
E_{ijkl}	= pengaruh galat dalam percobaan perlakuan jenis dan konsentrasi auksin taraf ke-i, jenis sitokinin taraf ke-j, konsentrasi sitokinin taraf ke-k dan ulangan ke-l

Sedangkan pada percobaan induksi akar terdiri dari dua faktor, yaitu medium (MS, MS1/2) dan auksin (NAA). Zat pengatur tumbuh NAA terdiri dari tiga taraf, yaitu 0, 0.5 dan 1 mg/l serta masing-masing diulang 14 kali (Tabel Lampiran 3). Model liniernya adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = u + A_i + B_j + (AB)_{ij} + E_{ijk}$$

Y_{ijk} = pengamatan terhadap respon tanaman yang memperoleh pengaruh faktor medium pada taraf ke-i, faktor auksin pada taraf ke-j dan pada ulangan ke-k

u = rata-rata umum

A_i = pengaruh faktor medium pada taraf ke-i, $i = 1, 2$

B_j = pengaruh faktor auksin pada taraf ke-j, $j = 1, 2, 3$

$(AB)_{ij}$ = pengaruh interaksi faktor A pada taraf ke-i dan faktor B pada taraf ke-j

E_{ijk} = pengaruh galat dalam percobaan perlakuan medium taraf ke-i, auksin taraf ke-j dan ulangan ke-k

1. Diketahui mengenai eksplan dan kultur jaringan, terutama mengenai kultur dan media kultur jaringan.
2. Mengetahui bagaimana cara membuat media kultur jaringan, terutama media kultur jaringan.
3. Mengetahui bagaimana cara membuat media kultur jaringan, terutama media kultur jaringan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keadaan Eksplan

Penggunaan daun sebagai eksplan merupakan salah satu alternatif untuk perbanyak tanaman secara *in vitro*. Karena daun yang ditanam pada medium yang diperkaya dengan zat pengatur tumbuh umumnya dapat membentuk tunas adventif. Steeves dalam Kruse dan Patterson (1973) mengatakan bahwa kultur daun dapat mengalami pertumbuhan dan diferensiasi pada medium kultur yang diperkaya dengan zat-zat mineral sebaik yang dihasilkan oleh daun autotrof.

Menurut Smith dan Nihgtingale (1979) yang melakukan percobaan pada tanaman Kalanchoe dengan eksplan batang dan daun serta menggunakan medium cair dan padat, yang berhasil membentuk plantlet terbaik adalah kultur daun pada medium padat.

Dari hasil pengamatan secara visual terlihat bahwa warna eksplan yang semula hijau berangsur-angsur mengalami perubahan menjadi hijau muda, kuning dan coklat. Keadaan ini terjadi pada sebagian besar eksplan pada semua perlakuan. Perubahan warna ini disebabkan karena hilangnya pigmen hijau pada daun. Hal ini sesuai dengan pendapat George dan Sherrington (1984) yang menyatakan bahwa ketika sel yang mengandung kloroplas dalam tanaman utuh dipindahkan ke medium nutrisi, maka kloroplas akan

mulai berdediferensiasi sehingga jumlah pigmen hijau akan berkurang.

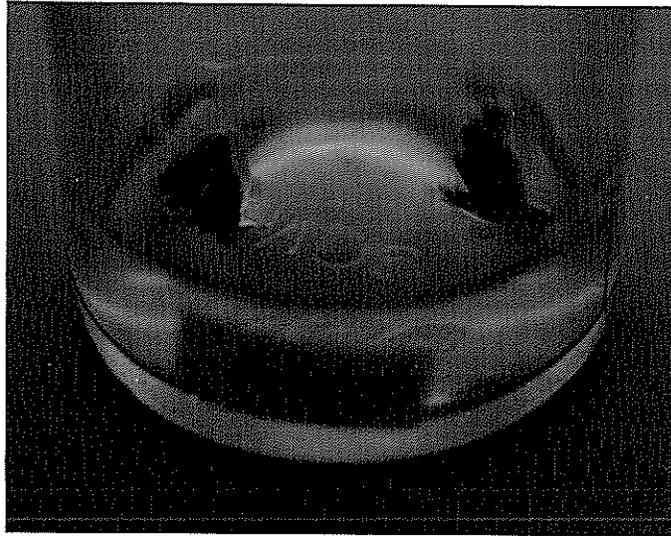
Pada umumnya tunas adventif terbentuk pada saat eksplan masih berwarna hijau. Walaupun demikian pada eksplan yang sudah berwarna coklat ada juga yang masih mampu membentuk tunas adventif. Eksplan yang ditanam pada medium kontrol tanpa zat pengatur tumbuh dan pada medium yang hanya diperkaya dengan auksin saja, umumnya pada minggu ketiga sudah berwarna coklat.

Tunas yang terbentuk pada percobaan ini termasuk tunas adventif. Tunas adventif yang terbentuk pada kultur daun berasal dari sel-sel parenkima. Menurut Esau (1953), bagian mesofil daun disusun oleh sel-sel parenkima yang bersifat tetap hidup, mampu membelah diri dan umumnya berdinding sel primer. Ternyata selanjutnya diketahui bahwa struktur adventif dibentuk oleh sel-sel parenkima.

Eksplan ditanam agak tenggelam ke dalam medium seperti yang terlihat pada Gambar 5. Hal ini dimaksudkan agar terjadi kontak langsung antara eksplan dengan medium sehingga penyerapan zat-zat mineral dapat terjadi dengan baik.

Stomata pada daun dapat dijumpai pada kedua sisi permukaannya. Tetapi umumnya di sisi sebelah bawah jumlah stomata lebih banyak. Oleh karena itu dalam

meletakkan eksplan, sebaiknya sisi sebelah bawah daun dalam posisi bersentuhan langsung dengan medium. Hal ini dimaksudkan untuk mengurangi laju penguapan yang terjadi melalui stomata.

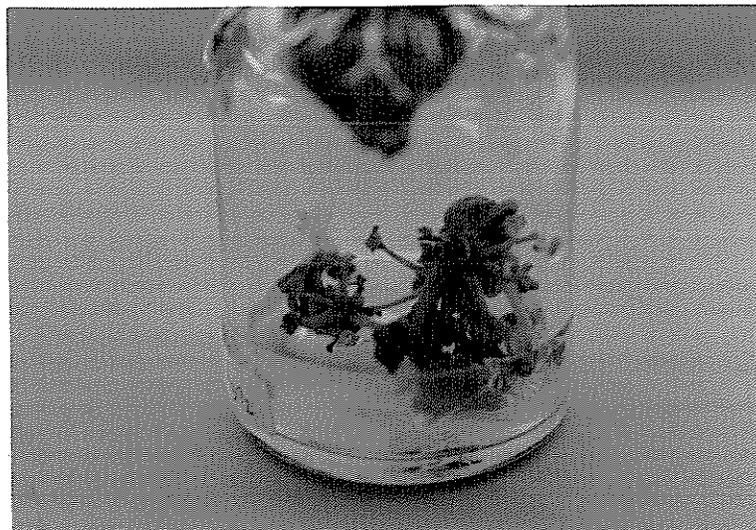


Gambar 5. Cara Meletakkan Eksplan Daun pada Medium

Pembentukan Kalus dan Tunas Adventif

Proses pembentukan tunas adventif terjadi melalui dua cara, yaitu morfogenesis langsung tanpa pembentukan kalus terlebih dahulu, dan morfogenesis tak langsung yang didahului dengan pembentukan kalus. Pada umumnya yang terjadi adalah morfogenesis tak langsung dengan pembentukan kalus. Keadaan ini juga terlihat dari hasil penelitian Johnson (1978) pada tanaman Gloxinia dan hasil penelitian Johnson dan Mitchell (1978) pada tanaman Broccoli. Pembentukan kalus pada awalnya terjadi pada bagian

jaringan daun bekas potongan. Sebelum membentuk kalus eksplan tampak mengalami pengembangan. Pada eksplan yang mengalami pembentukan kalus terlebih dahulu, tunas adventif akan muncul pada permukaan kalus tersebut. Tunas tersebut tidak hanya dari permukaan atas daun, tetapi juga dari permukaan daun sebelah bawah yang bersentuhan langsung dengan medium, seperti yang terlihat pada Gambar 6. Keadaan ini juga terlihat pada hasil penelitian Hennen dan Sheehan (1978) pada tanaman *Platyserium stemaria* (Beauvois) Desv.



Gambar 6. Pembentukan Tunas Adventif pada Eksplan, 60 Hari Setelah Penanaman

Secara visual terlihat bahwa pada medium kontrol tanpa zat pengatur tumbuh dan medium yang hanya diperkaya dengan auksin, tidak ditemukan adanya pembentukan

kalus maupun tunas adventif. Dengan demikian pada semua perlakuan tanpa sitokinin, eksplan tidak dapat membentuk kalus maupun tunas adventif. Dari hasil tersebut terlihat bahwa penambahan sitokinin sangat berpengaruh terhadap pembentukan tunas. Hal ini sesuai dengan pendapat Thorpe (1981), yang menyatakan bahwa tunas dapat terbentuk pada medium kultur yang diperkaya dengan sitokinin.

Pada medium yang diperkaya dengan sitokinin maupun kombinasi sitokinin dan auksin pada umumnya membentuk kalus. Walaupun demikian dari hasil analisis sidik ragam terlihat bahwa jenis dan konsentrasi sitokinin maupun auksin yang ditambahkan ke dalam medium tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap kecepatan induksi kalus (Tabel Lampiran 4). Pengaruh berbagai kombinasi perlakuan sitokinin dan auksin terhadap rata-rata kecepatan induksi kalus disajikan pada Tabel 1. Pada medium yang hanya diperkaya dengan kinetin (7 mg/l) induksi kalus cenderung paling cepat terjadi, yaitu pada saat kultur berumur 13.55 hari.

Pembentukan tunas adventif umumnya mulai terjadi pada minggu ketiga setelah penanaman. Dari hasil analisis sidik ragam pada Tabel Lampiran 5, terlihat bahwa interaksi antara jenis dan konsentrasi sitokinin maupun auksin tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap kecepatan induksi tunas. Tetapi interaksi antara jenis

Tabel 1. Rata-rata Kecepatan Induksi Kalus pada Berbagai Kombinasi Perlakuan Sitokinin dan Auksin

Sitokinin		Auksin		Kecepatan Induksi Kalus
BAP	Kinetin	NAA	IAA	
.....mg/l.....			hari.....
1	-	-	0.0	16.87
3	-	-	0.0	48.44
5	-	-	0.0	26.09
7	-	-	0.0	20.72
-	1	-	0.0	20.01
-	3	-	0.0	16.87
-	5	-	0.0	14.40
-	7	-	0.0	24.40
-	-	1	0.0	22.50
-	-	3	0.0	34.78
-	-	5	0.0	28.35
-	-	7	0.0	27.11
-	-	-	0.0	15.92
-	-	-	0.0	77.42
-	-	-	0.0	89.03
-	-	-	0.0	16.78
-	-	-	0.0	20.82
-	-	-	0.0	50.83
-	-	-	0.0	17.79
-	-	-	0.0	23.75
-	-	-	0.0	18.63
-	-	-	0.0	13.89
-	-	-	0.0	16.54
-	-	0.0	-	27.00
-	-	0.0	-	23.92
-	-	0.0	-	22.30
-	-	0.0	-	26.46
-	-	0.0	-	23.68
-	-	0.0	-	13.55
-	-	0.0	-	17.43
-	-	0.0	-	35.18
-	-	0.0	-	66.80
-	-	0.0	-	22.32
-	-	0.0	-	25.04
-	-	0.0	-	47.03
-	-	0.0	-	21.23
-	-	0.0	-	14.49
-	-	0.0	-	16.79
-	-	0.0	-	31.90
-	-	0.0	-	32.30
-	-	0.0	-	18.79
-	-	0.0	-	24.00
-	-	0.0	-	19.67
-	-	0.0	-	28.72
-	-	0.0	-	16.64

dan konsentrasi auksin dengan jenis sitokinin memberikan hasil yang berbeda nyata terhadap kecepatan induksi tunas. Pengujian secara statistik menurut uji Duncan mengenai pengaruh tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari Tabel 2 terlihat bahwa induksi tunas yang paling cepat terjadi adalah pada medium yang diperkaya dengan BAP tanpa penambahan auksin, yaitu saat kultur berumur 19.902 hari. Hasil dari perlakuan ini berbeda

Tabel 2. Pengaruh Interaksi antara Jenis dan Konsentrasi Auksin dengan Jenis Sitokinin terhadap Kecepatan Induksi Tunas

Sitokinin	Auksin		Kecepatan Induksi Tunas Hari
	NAA	IAA	
	... mg/l ...		
BAP	0.0	-	19.902 ^a
BAP	0.5	-	57.279 ^b
BAP	1.0	-	24.114 ^b
BAP	-	0.0	43.620 ^b
BAP	-	0.5	51.437 ^b
BAP	-	1.0	53.871 ^b
Kinetin	0.0	-	57.279 ^b
Kinetin	0.5	-	53.193 ^b
Kinetin	1.0	-	32.875 ^b
Kinetin	-	0.0	85.889 ^b
Kinetin	-	0.5	64.525 ^b
Kinetin	-	1.0	35.244 ^b

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf 0.05

nyata dengan perlakuan-perlakuan lainnya. Pembentukan tunas yang cenderung paling lama ditemukan pada medium yang diperkaya dengan kinetin tanpa auksin, yaitu pada saat kultur berumur 85.889 hari. Secara keseluruhan terlihat bahwa dalam menginduksi tunas BAP lebih efektif daripada kinetin. Untuk kelompok auksin NAA lebih cepat menginduksi tunas daripada IAA.

Tanaman mempunyai dua fase pertumbuhan, yaitu fase pembelahan sel dan fase pembesaran sel. Pada fase pembelahan sel zat pengatur tumbuh sitokinin lebih berperan. Sedangkan auksin dapat menstimulir sel pada saat mengalami pembesaran. Kedua zat pengatur tumbuh ini terbukti berperan dalam menunjang pertumbuhan jaringan apabila digunakan pada kombinasi jenis zat tumbuh dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tepat (Wareing dan Philips, 1981).

Pada medium untuk pertunasan ternyata ada beberapa eksplan yang telah membentuk akar.

Jumlah Tunas

Pada minggu kedua pengaruh interaksi antara perlakuan sitokinin dan auksin terhadap pertumbuhan atau jumlah tunas adventif belum menunjukkan hasil yang nyata (Tabel Lampiran 6). Interaksi tersebut baru menunjukkan pengaruh yang sangat nyata ($P=0.01$) pada minggu ketiga, dan keadaan ini berlangsung terus sampai akhir pengamatan

pada minggu kedelapan (Tabel Lampiran 7 sampai 12). Pengujian statistik dengan uji Duncan terhadap pengaruh interaksi perlakuan antara sitokinin dan auksin terhadap jumlah tunas pada minggu ketiga, keenam dan kedelapan disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 menunjukkan bahwa rata-rata jumlah tunas adventif yang dihasilkan eksplan pada umumnya tidak berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Pada minggu ketiga jumlah tunas adventif yang banyak berturut-turut dihasilkan pada medium dengan BAP 1 mg/l + NAA 0.5 mg/l sebanyak 6.50, medium dengan BAP 5 mg/l + NAA 1 mg/l sebanyak 6.33 dan medium dengan BAP 1 mg/l + NAA 1 mg/l sebanyak 5.70. Ketiga perlakuan berbeda nyata dengan perlakuan-perlakuan lainnya.

Setelah minggu keenam, kecenderungan jumlah tunas adventif yang banyak tetap dihasilkan pada tiga perlakuan medium seperti yang terjadi pada minggu ketiga. Jumlah tunas adventif yang banyak berturut-turut dicapai pada medium dengan BAP 5 mg/l + NAA 1 mg/l sebanyak 18.50, pada medium dengan BAP 1 mg/l + NAA 1 mg/l sebanyak 18.30 dan pada medium dengan BAP 1 mg/l + NAA 0.5 mg/l sebanyak 14.10.

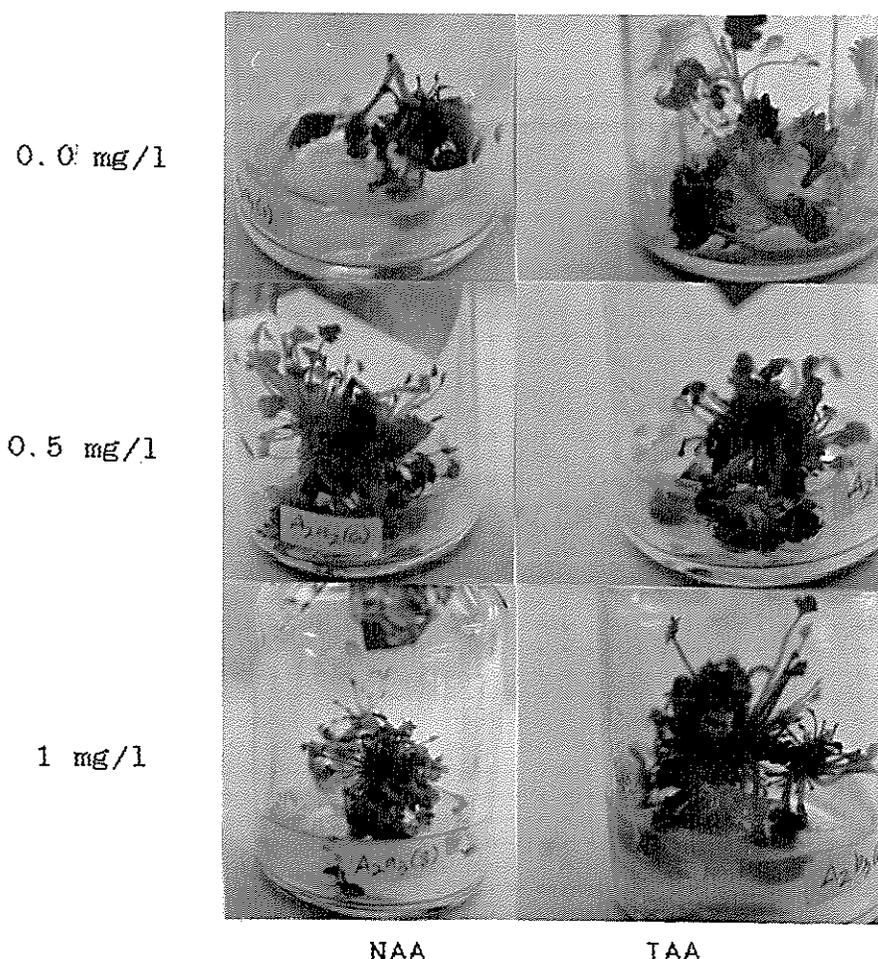
Pada minggu kedelapan peningkatan jumlah tunas adventif pada medium BAP 1 mg/l + NAA 1 mg/l terjadi sangat cepat sehingga cenderung mencapai jumlah tunas yang

Tabel 3. Rata-rata Jumlah Tunas pada Berbagai Medium Tumbuh dengan Penambahan Sitokinin dan Auksin

Sitokinin		Auksin		Umur (minggu)		
BAP	Kinetin	NAA	IAA	3	6	8
..... mg/l jumlah tunas		
1	-	-	0.0	2.44bc	8.00cd	14.13d
1	-	-	0.0	0.00a	0.33a	0.33ab
1	-	-	0.0	0.36ab	3.38abcd	5.33ab
1	-	-	0.0	0.00a	0.00a	0.17ab
1	1	-	0.0	0.00a	0.88a	2.50ab
1	1	-	0.0	0.00a	0.33a	0.50ab
1	1	-	0.0	0.00a	0.00a	1.00ab
1	1	-	0.0	0.00a	0.00a	0.00a
1	1	-	0.5	0.20abc	4.20abcd	9.33bc
1	1	-	0.5	0.17a	0.55a	0.80ab
1	1	-	0.5	0.33ab	2.42abcd	5.50ab
1	1	-	0.5	0.00a	0.00a	0.20ab
1	1	-	0.5	0.00a	1.17ab	1.17ab
1	1	-	0.5	0.00a	2.63abcd	3.00ab
1	1	-	0.5	0.00a	0.33a	3.00ab
1	1	-	0.5	0.00a	0.00a	0.00a
1	1	-	1.0	0.80abc	5.20abcd	9.11abc
1	1	-	1.0	0.08a	0.83a	1.50ab
1	1	-	1.0	0.09a	5.46abcd	5.22ab
1	1	-	1.0	0.00a	0.18a	0.40ab
1	1	-	1.0	0.11a	1.13ab	2.25ab
1	1	-	1.0	0.00a	1.00ab	1.00ab
1	1	-	1.0	0.00a	1.14ab	4.00ab
1	1	-	1.0	0.00a	0.00a	0.00a
1	1	0.0	1.0	0.44abc	5.13abcd	7.14abc
1	1	0.0	-	0.00a	0.00a	0.00a
1	1	0.0	-	0.46abc	8.75d	6.00abc
1	1	0.0	-	0.00a	0.00a	0.00a
1	1	0.0	-	0.00a	0.00a	0.00a
1	1	0.0	-	0.00a	0.25a	5.50ab
1	1	0.0	-	0.00a	0.00a	0.00a
1	1	0.0	-	0.00a	0.00a	0.00a
1	1	0.0	-	0.00a	0.00a	0.00a
1	1	0.5	-	0.00a	7.46bcd	5.00a
1	1	0.5	-	6.50d	14.10e	17.20de
1	1	0.5	-	0.00a	4.44abcd	6.88abc
1	1	0.5	-	2.55c	6.13abcd	9.71abc
1	1	0.5	-	0.00a	0.00a	0.00a
1	1	0.5	-	0.00a	0.50a	0.50a
1	1	0.5	-	1.70abc	3.30abcd	4.40ab
1	1	0.5	-	1.00abc	3.55abcd	4.38ab
1	1	0.5	-	0.00a	2.00abc	3.00ab
1	1	1.0	-	5.70d	18.30e	24.33e
1	1	1.0	-	1.40abc	2.63abcd	3.86ab
1	1	1.0	-	6.33d	18.50e	18.33de
1	1	1.0	-	0.00a	0.00a	0.00a
1	1	1.0	-	0.20a	0.30a	1.90ab
1	1	1.0	-	2.00abc	4.75abcd	5.50ab
1	1	1.0	-	0.00a	0.58a	2.71ab
1	1	1.0	-	0.00a	0.00a	0.67ab

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf 0.05

paling banyak, yaitu 24.33. Keadaan tunas adventif yang terbentuk pada medium yang diperkaya dengan BAP 1 mg/l dan auksin, baik NAA maupun IAA pada berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Plantlet pada Medium yang Diperkaya dengan BAP 1 mg/l + Auksin (NAA, IAA) pada Umur 2 Bulan

Perlakuan-perlakuan lain yang juga membentuk tunas adventif dalam jumlah banyak adalah pada medium BAP 5 mg/l + NAA 1 mg/l yaitu 18.33, pada medium BAP 1 mg/l + NAA 0.5 mg/l yaitu 17.20 serta pada medium BAP 1 mg/l

tanpa auksin yaitu 14.13. Dari hasil tersebut terlihat bahwa perlakuan dengan BAP tetap memberikan jumlah tunas adventif yang lebih banyak bila dibandingkan pada medium yang diperkaya dengan kinetin.

Setelah kultur berumur delapan minggu ternyata ada eksplan yang belum membentuk tunas adventif, dan ini umumnya terjadi pada medium yang diperkaya dengan kinetin. Keadaan ini sesuai dengan hasil penelitian Rao, Handro dan Harada (1973) terhadap tanaman *Petunia inflata* dan *Petunia hybrida* yang menyatakan bahwa kinetin merupakan golongan sitokinin yang aktifitasnya lebih lemah dari BAP.

Secara keseluruhan dari hasil yang tertera pada Tabel 3 terlihat bahwa semua eksplan yang ditanam pada medium yang diberi sitokinin tanpa penambahan auksin, cenderung menghasilkan tunas adventif yang lebih sedikit bila dibandingkan dengan jumlah tunas adventif yang dihasilkan pada medium dengan penambahan sitokinin dan auksin. Hal ini jelas menunjukkan bahwa pembentukan tunas membutuhkan keseimbangan antara sitokinin dan auksin. Keadaan ini sesuai dengan pendapat Skoog dan Miller (1957), yang menyatakan bahwa proses diferensiasi dan organogenesis dalam kultur jaringan dikontrol oleh interaksi antara konsentrasi sitokinin dan auksin. Sejalan dengan hal tersebut, Skirvin dalam Conger (1981) juga mengatakan bahwa proliferasi tunas membutuhkan adanya auksin dan

sitokinin, tetapi dalam subkultur sitokinin saja sering lebih baik hasilnya.

Bila dilihat dari empat konsentrasi BAP yang digunakan sebagai perlakuan yang dikombinasikan dengan auksin, jumlah tunas adventif yang dihasilkan selalu menunjukkan pola yang sama. Jumlah tunas terbanyak selalu dihasilkan pada penggunaan BAP 1 mg/l, kemudian diikuti pada penggunaan BAP 5 mg/l, BAP 3 mg/l dan yang terakhir pada penggunaan BAP 7 mg/l. Peningkatan konsentrasi ternyata tidak selalu meningkatkan jumlah tunas adventif yang terbentuk, tetapi cenderung berfluktuasi.

Pada minggu kedelapan mulai ditemukan adanya gejala vitrifikasi pada beberapa plantlet. Gejala tersebut tampak dengan adanya perubahan warna plantlet dari hijau menjadi kekuningan atau kecoklatan. Hal ini diduga disebabkan karena adanya senyawa etilen di dalam botol kultur. Keadaan ini sesuai dengan hasil penelitian Dalton dan Street (1976) dalam George dan Sherrington (1984) yang menyatakan bahwa sintesis klorofil dan perkembangan kloroplas dihambat dengan adanya etilen.

Pembentukan Akar

Pemindahan tunas ke medium perakaran tidak selalu harus dilakukan, karena tanpa pemindahan ke medium perakaran ternyata ada yang telah mampu membentuk akar. Tetapi pada beberapa tunas yang terbentuk pada medium

pertunasan tidak sedikit yang harus dipindahkan dahulu ke medium perakaran sebelum akhirnya dipindahkan ke tanah.

Untuk pembentukan akar menurut Ben-Jaacov dan Dax (1981), garam MS sering dipakai pada setengah konsentrasi. Pengurangan garam MS menjadi setengah bahkan sampai seperempat konsentrasi dilakukan terutama untuk tahap perakaran (Skirvin, Chu dan Gomez, 1981). Pada penelitian ini ternyata tunas adventif yang dipindahkan pada semua perlakuan medium perakaran umumnya dapat membentuk akar, baik pada medium MS maupun MS1/2, dengan atau tanpa penambahan zat pengatur tumbuh auksin (NAA). Keadaan ini sesuai dengan penelitian Mariska, Gati dan Sukmadjaja (1988) terhadap tanaman *Geranium* dengan eksplan tangkai daun dan mata tunas yang menunjukkan bahwa akar dapat terbentuk baik pada medium MS maupun MS1/2 dengan atau tanpa penambahan zat pengatur tumbuh auksin (IAA). Hal ini diduga karena adanya auksin endogen yang terdapat pada tunas yang dapat menginduksi perakaran tanpa perlu ditambakkannya auksin ke dalam medium pertumbuhan.

Dari hasil analisis sidik ragam pada Tabel Lampiran 13 terlihat bahwa terdapat pengaruh yang nyata dari perlakuan medium MS terhadap kecepatan induksi akar. Demikian pula terdapat pengaruh yang nyata dari konsentrasi NAA yang dipakai terhadap kecepatan induksi akar. Pengujian secara statistik menurut uji Duncan mengenai

Tabel 4. Pengaruh Medium MS terhadap Kecepatan Induksi Akar

Medium	Kecepatan Induksi Akar (hari)
MS	7.3638 ^a
MS1/2	10.0100 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf 0.05

pengaruh perlakuan medium MS terhadap kecepatan induksi akar dapat dilihat pada Tabel 4. Pada Tabel 4 terlihat bahwa pada medium MS pembentukan akar lebih cepat terjadi bila dibandingkan pada medium MS1/2. Selama pada medium perakaran, secara visual terlihat bahwa perkembangan tunas yang terjadi antara dua perlakuan medium menunjukkan perbedaan. Pada medium MS umumnya perkembangan tunas adventif lebih baik. Tetapi sebaliknya pada medium MS1/2 perkembangan tunas adventif terhambat. Pengurangan konsentrasi garam MS ternyata memberikan hasil yang berbeda terhadap plantlet, karena jumlah mineral yang tersedia lebih sedikit. Pada minggu ketiga daun-daun yang terbentuk menjadi berwarna kekuningan. Hal ini disebabkan karena berkurangnya unsur N yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan daun (Prawiranata, Harran dan Tjondronegoro, 1981). Keadaan plantlet tersebut akan

berpengaruh pada perkembangan selanjutnya, yaitu pada saat aklimatisasi.

Dalam kultur jaringan unsur N tersedia dalam bentuk NO_3^- dan NH_4^+ (George dan Sherrington, 1984). Dalam medium Murashige dan Skoog (1962), NH_4^+ selain berfungsi mensintesis sitokinin endogen, juga dapat meningkatkan absorpsi unsur lain seperti P, K, Ca, Mg dan S.

Pengujian secara statistik menurut uji Duncan mengenai pengaruh konsentrasi NAA terhadap kecepatan induksi akar disajikan pada Tabel 5. Dari tiga konsentrasi NAA yang diujikan, yang mempunyai kemampuan membentuk akar

Tabel 5. Pengaruh Konsentrasi NAA terhadap Kecepatan Induksi Akar

NAA (mg/l)	Kecepatan Induksi Akar (hari)
0.0	9.0992 ^b
0.5	7.1736 ^a
1.0	9.5969 ^b

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf 0.05

paling cepat adalah konsentrasi 0.5 mg/l yang berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 0.0 dan 1 mg/l. Antara kedua perlakuan tersebut, yaitu medium tanpa zat pengatur tumbuh dengan perlakuan NAA 1 mg/l kecepatan induksi akarnya tidak berbeda nyata. Konsentrasi NAA

0.5 mg/l yang ditambahkan dalam medium pembentukan akar merupakan batas optimum dalam menginduksi akar, sehingga peningkatan konsentrasi yang lebih tinggi memberikan hasil yang semakin menurun.

Jumlah Akar

Dari hasil analisis sidik ragam pada Tabel Lampiran 14, 15 dan 16 terlihat bahwa sejak minggu pertama sampai pengamatan terakhir pada minggu ketiga terdapat pengaruh yang nyata dari interaksi antara perlakuan medium dengan konsentrasi NAA terhadap jumlah akar yang terbentuk. Hasil pengujian statistik dengan uji Duncan mengenai pengaruh interaksi antara perlakuan medium dengan konsentrasi NAA terhadap jumlah akar yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel 6.

Pada minggu pertama tunas adventif yang ditanam pada medium MS1/2 dengan penambahan NAA 1 mg/l telah membentuk akar dengan jumlah rata-rata yang paling banyak, yaitu 8.50, serta berbeda nyata dengan semua perlakuan lainnya. Tetapi pada minggu kedua tunas adventif yang ditanam pada medium MS dengan penambahan NAA 0.5 mg/l, pertambahan jumlah akarnya cenderung meningkat dengan cepat walaupun dari pengujian secara statistik tidak berbeda nyata dengan jumlah akar pada medium MS1/2 tanpa penambahan NAA dan medium MS1/2 + NAA 1 mg/l. Peningkatan tersebut semakin jelas pada minggu ketiga, dimana akar yang

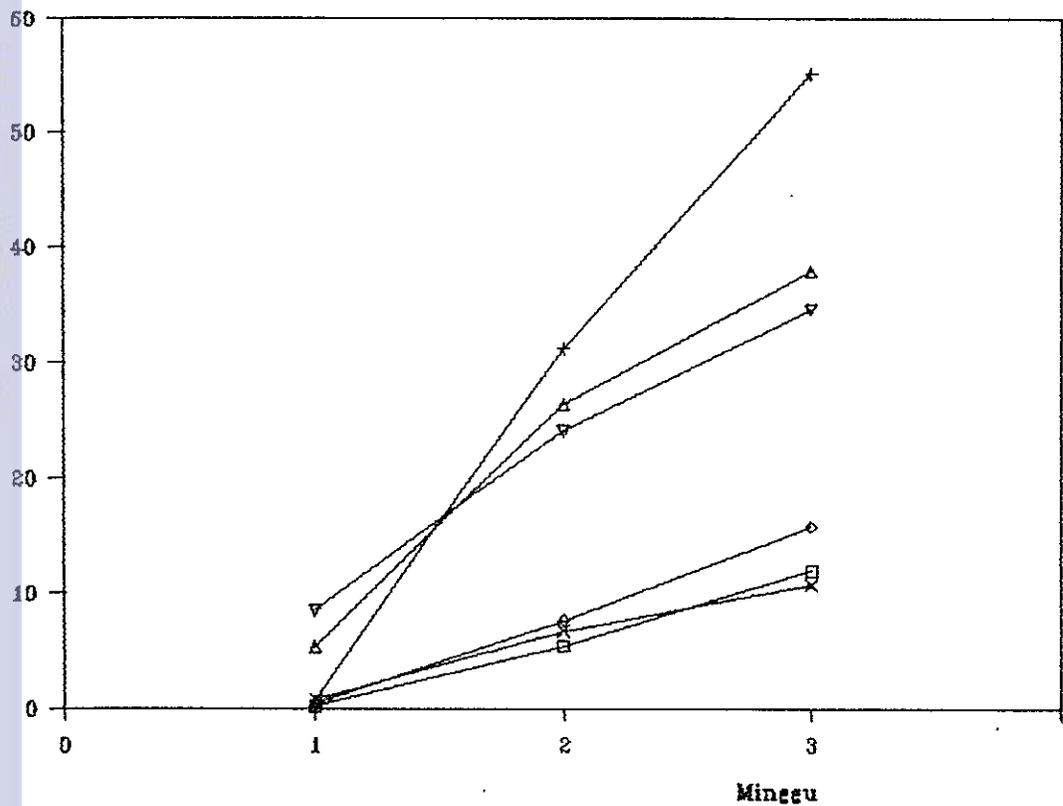
Tabel 6. Rata-rata Jumlah Akar pada Medium MS dan MS1/2 yang Diperkaya dengan NAA

Medium	NAA (mg/l)	Minggu ke-		
		1	2	3
	 jumlah akar		
MS	0.0	0.21 ^c	5.43 ^b	11.93 ^c
MS	0.5	0.71 ^c	31.29 ^a	55.07 ^a
MS	1.0	0.43 ^c	7.64 ^b	15.79 ^c
MS1/2	0.0	5.36 ^b	26.43 ^a	38.00 ^b
MS1/2	0.5	0.79 ^c	6.71 ^b	10.71 ^c
MS1/2	1.0	8.50 ^a	24.14 ^a	34.64 ^b

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama dalam kolom menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji Duncan pada taraf 0.05

terbentuk pada medium MS + NAA 0.5 mg/l mempunyai jumlah akar paling banyak, yaitu 55.07. Keadaan pertambahan jumlah akar pada tiga minggu pengamatan dapat dilihat pada Gambar 8. Dari gambar tersebut jelas terlihat bahwa jumlah akar yang terbentuk pada medium MS + NAA 0.5 mg/l mengalami peningkatan yang sangat pesat.

Tunas adventif yang ditanam pada medium MS maupun MS1/2 yang diperkaya dengan NAA pada bagian dasar tunasnya terbentuk kalus. Besarnya kalus yang terbentuk menunjukkan respon yang searah dengan semakin



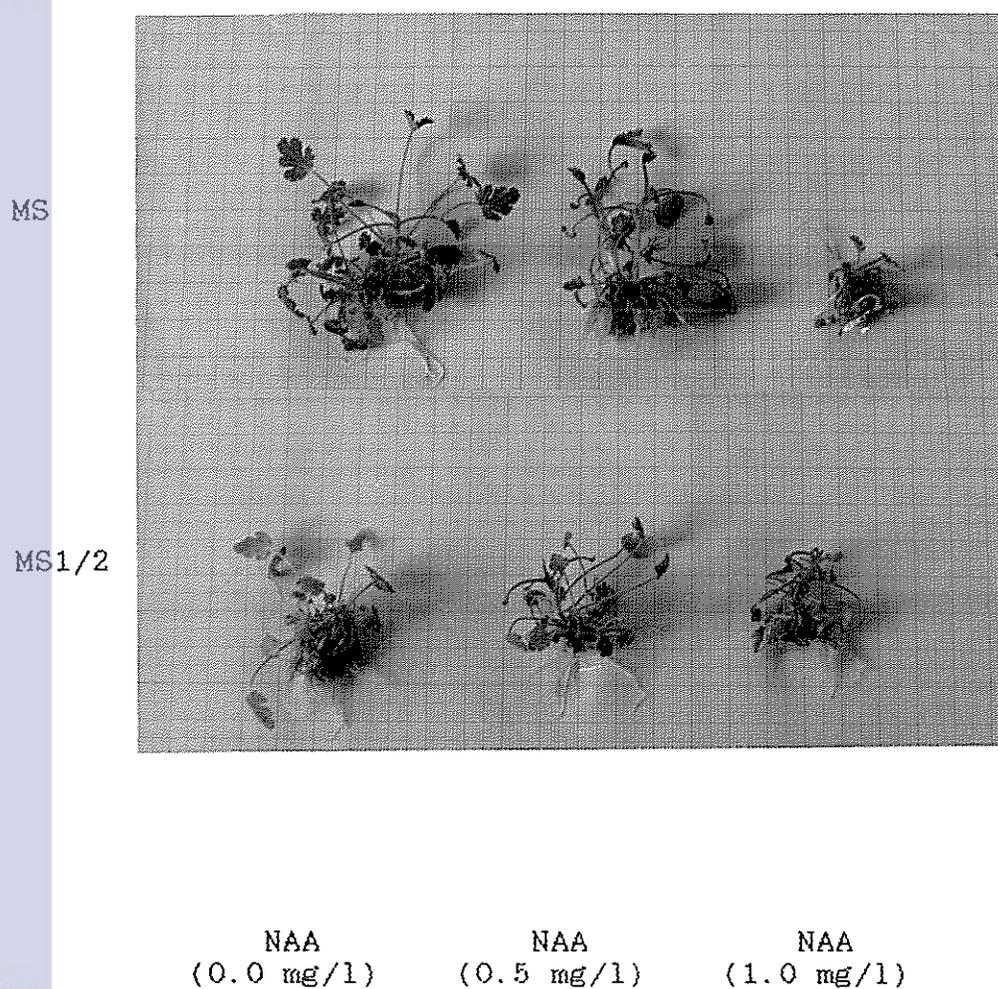
Keterangan :

- — □ : MS + NAA 0.0 mg/l
- + — + : MS + NAA 0.5 mg/l
- ◇ — ◇ : MS + NAA 1.0 mg/l
- △ — △ : MS1/2 + NAA 0.0 mg/l
- × — × : MS1/2 + NAA 0.5 mg/l
- ▽ — ▽ : MS1/2 + NAA 1.0 mg/l

Gambar 8. Grafik Pengaruh Interaksi antara Perlakuan Medium dengan Konsentrasi NAA terhadap Rata-rata Jumlah Akar

meningkatnya konsentrasi NAA. Pada medium kontrol tidak ditemukan adanya pembentukan kalus (Gambar 9).

Keadaan akar yang terbentuk pada medium MS maupun MS1/2 yang dikombinasikan dengan tiga konsentrasi NAA (0, 0.5 dan 1 mg/l) pada umur tiga minggu setelah penanaman dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Keadaan Plantlet Umur 3 Minggu setelah Penanaman pada Medium Perakaran

Pada medium MS yang diperkaya dengan NAA 0.5 mg/l, walaupun jumlah akar yang terbentuk banyak tetapi akarnya kecil-kecil dan halus, serta pemanjangan akar terhambat. Bila dibandingkan dengan keadaan akar yang terbentuk pada medium MS tanpa penambahan NAA terlihat bahwa walaupun jumlah akar yang terbentuk tidak terlalu banyak, tetapi akar tampak lebih kuat, penampang melintangnya lebih besar, dan pemanjangan akarnya tidak terhambat.

Pada Tabel 6 terlihat bahwa jumlah akar pada medium MS dan MS + NAA 1 mg/l tidak berbeda nyata pada minggu ketiga. Tetapi dari Gambar 9 terlihat bahwa keadaan akar yang terbentuk pada medium MS tanpa penambahan NAA lebih baik dari akar yang terbentuk pada medium MS + NAA 1 mg/l. Hasil tersebut berlawanan dengan hasil yang dicapai diantara perlakuan medium MS1/2 yang dikombinasikan dengan tiga konsentrasi NAA. Keadaan akar yang baik terbentuk pada medium MS1/2 + NAA 0.5 mg/l. Sedangkan pada medium MS1/2 + NAA 1 mg/l akar yang terbentuk kecil-kecil dan halus. Dari hasil tersebut terlihat adanya interaksi antara medium dengan konsentrasi NAA. Pada medium MS1/2 yang jumlah mineralnya telah dikurangi, penambahan NAA 0.5 mg/l masih memberikan pengaruh yang baik terhadap pembentukan akar.



Pada Gambar 9 secara keseluruhan dapat dilihat bahwa pertumbuhan tunas maupun akar pada medium MS + NAA 1 mg/l sangat terhambat. Sedangkan tunas adventif yang dipindahkan pada medium MS tanpa penambahan auksin pertumbuhan tunas maupun akarnya terlihat baik.

Menurut Lineberger (1983), NAA mempunyai pengaruh yang baik terhadap perakaran. Bila dibandingkan dengan hasil penelitian Mariska, Gati dan Sukmadjaja (1988), terlihat bahwa pemakaian IAA tidak sampai menghasilkan akar yang kecil-kecil dan halus seperti pada percobaan ini yang memakai NAA. Hal ini diduga karena aktifitas NAA lebih kuat bila dibandingkan dengan IAA.

Terlihat bahwa pengaruh NAA terlalu kuat dalam menginduksi perakaran terhadap tanaman *Pelargonium*. Pemakaian NAA memacu induksi akar, tetapi menekan pertumbuhan, dalam hal ini pemanjangan masing-masing akar yang terbentuk.

Dari hasil secara keseluruhan terlihat bahwa dalam mencari konsentrasi yang tepat dalam mempengaruhi pertumbuhan akar tidak hanya dilihat dari kemampuannya membentuk akar dalam jumlah banyak, tetapi juga harus dilihat keadaan akar yang terbentuk sehingga pada saat akan dipindahkan untuk aklimatisasi akar-akar tersebut dapat menunjang pertumbuhan plantlet.

Aklimatisasi

Keberhasilan plantlet yang hidup di pot atau pada tahap aklimatisasi sangat dipengaruhi medium kultur. Persentase keberhasilan plantlet karena pengaruh medium kultur dapat dilihat pada Tabel 7.

Persentase keberhasilan plantlet dari medium MS pada percobaan pendahuluan yang ditanam pada medium pasir steril adalah 93.3 %. Sedangkan plantlet yang ditanam pada medium campuran pasir dan tanah steril keberhasilannya mencapai 64.3 %.

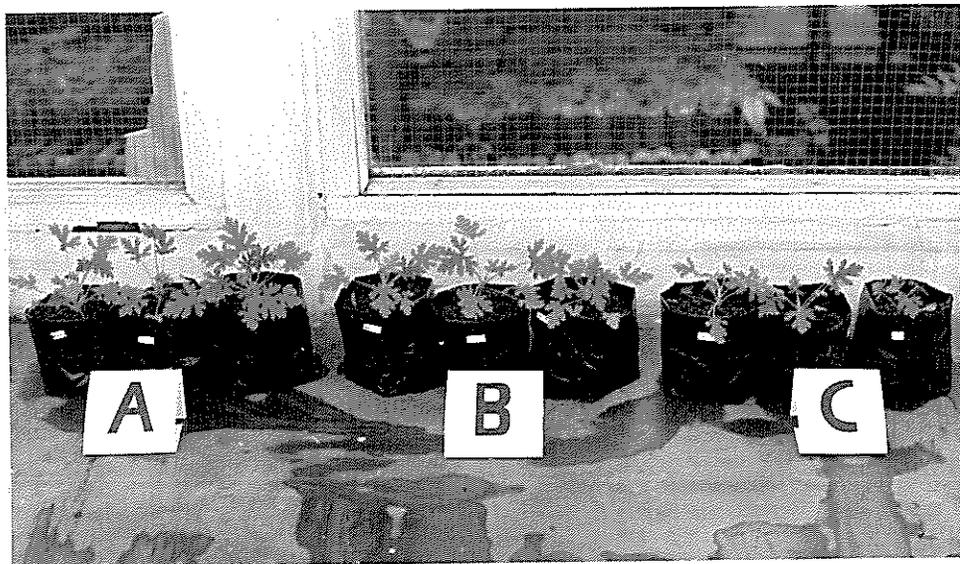
Plantlet yang terlebih dahulu mengalami perlakuan medium perakaran, pada saat aklimatisasi menunjukkan hasil yang berbeda antara perlakuan medium MS dan MS1/2.

Tabel 7. Pengaruh Medium Kultur terhadap Keberhasilan Pertumbuhan Plantlet dalam Pot *)

Asal Medium	Jumlah Plantlet yang Dipindahkan		Jumlah Plantlet yang Tumbuh		Keberhasilan (%)	
	A	B	A	B	A	B
Pendahuluan :						
MS	15	15	14	9	93.3	64.3
Perakaran :						
MS	18	-	17	-	94.4	-
MS1/2	18	-	0	-	0.0	-
**MS1/2	9	-	2	-	22.2	-

Keterangan : A : medium pasir steril
 B : medium pasir + tanah steril (1:1)
 *) : pemindahan umur 3 minggu
 **) : pemindahan umur 6 minggu

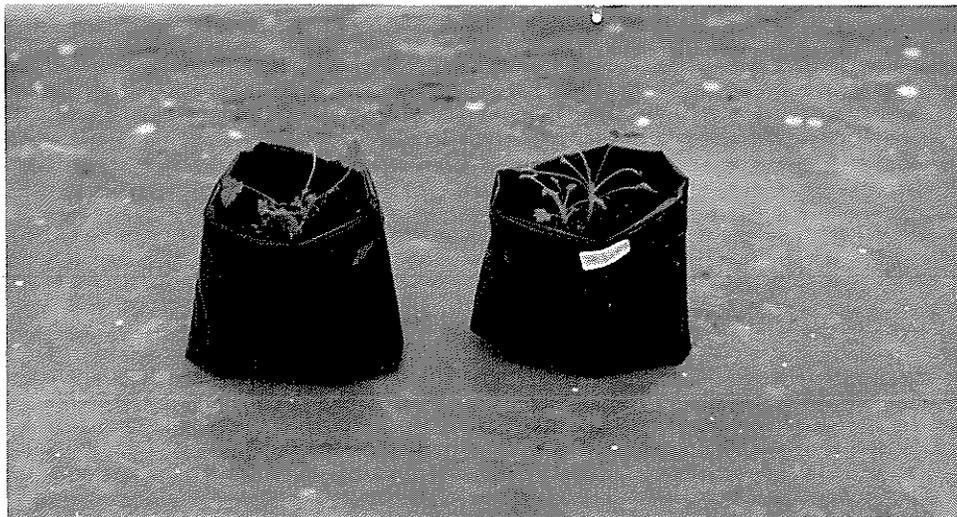
Persentase keberhasilan pada plantlet yang mengalami medium perakaran dengan medium dasar MS yang dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh NAA mencapai 94.4 %. Dari tiga konsentrasi NAA yang diujikan, pertumbuhan yang terbaik dicapai oleh plantlet yang berasal dari medium MS tanpa penambahan NAA, kemudian diikuti oleh plantlet yang berasal dari medium MS + NAA 0.5 mg/l, dan yang terakhir adalah plantlet yang berasal dari medium MS + NAA 1 mg/l (Gambar 10). Sedangkan yang menggunakan medium MS1/2 pada saat aklimatisasi semuanya mengalami kematian pada umur dua minggu setelah penanaman. Setelah dilakukan pengulangan terhadap plantlet yang berasal dari medium



Gambar 10. Plantlet pada Medium Pasir, Umur 6 Minggu setelah Penanaman
 A. Dari Medium MS, B. Dari Medium MS + NAA 0.5 mg/l, C. Dari Medium MS + NAA 1 mg/l

MS1/2, dengan waktu pemindahan enam minggu setelah penanaman keberhasilannya hanya mencapai 22.22 %, yaitu pada plantlet dari medium MS1/2 yang diperkaya dengan NAA 0.5 mg/l (Gambar 11). Dengan keadaan tersebut terlihat bahwa plantlet yang berasal dari medium MS1/2 dengan atau tanpa penambahan NAA, walaupun dipindahkan pada umur yang berbeda, yaitu tiga dan enam minggu keberhasilannya tetap sangat kecil.

Kematian plantlet umumnya didahului dengan proses kebusukan yang disebabkan karena kelembaban lingkungan yang terlalu tinggi. Pada medium campuran pasir dan tanah steril kelembabannya lebih tinggi bila dibandingkan dengan keadaan pada medium pasir steril saja.



Gambar 11. Plantlet dari Medium MS1/2 + NAA 0.5 mg/l pada Saat Dipindahkan (setelah 6 Minggu dalam Kultur)

Tingginya kelembaban yang mempengaruhi keadaan tersebut disebabkan karena adanya tanah yang mempunyai sifat menyimpan air. Sehingga pada saat ditutup dengan penyungkup plastik kelembabannya semakin meningkat dan kejenuhan akan uap air lebih cepat terjadi. Keadaan ini dapat dilihat dari uap air pada penyungkup plastik. Pada medium pasir dan tanah steril kejenuhan uap air sudah tampak pada hari ketiga setelah penanaman, sehingga harus dilakukan pelubangan pada penyungkup. Sedangkan pada medium pasir steril pelubangan pada penyungkup baru dilakukan satu minggu setelah penanaman. Hal ini disebabkan karena kelembaban lingkungan yang lebih rendah sehingga untuk mencapai kejenuhan uap air diperlukan waktu yang lebih lama.

Setelah lingkungan di dalam penyungkup tampak lembab, atau sudah mencapai tingkat kejenuhan, plastik penyungkup dilubangi. Hal ini dimaksudkan untuk sedikit demi sedikit mengurangi kelembaban sehingga pada saat penyungkup dibuka plantlet tidak mengalami perubahan lingkungan yang terlalu ekstrim. Walaupun demikian setelah penyungkup dibuka, tidak bisa dipindahkan langsung ke rumah kaca. Hal ini untuk mencegah kematian plantlet karena perbedaan suhu ruang yang tinggi. Kegagalan tanaman hasil kultur jaringan untuk tumbuh, lebih sering disebabkan karena

hilangnya air dalam jumlah besar, segera setelah tanaman dipindahkan ke lapangan (Hughes, 1981).

Setelah dipindahkan ke rumah kaca beberapa hari kemudian plantlet dipindahkan ke medium campuran tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1. Perubahan kesuburan plantlet yang teramati setelah dipindahkan ke medium tersebut menunjukkan bahwa penambahan sumber makanan sangat dibutuhkan.

Dari proses-proses yang terjadi, terlihat bahwa tahap aklimatisasi merupakan tahap penyesuaian tanaman dengan lingkungan luar yang terbuka setelah tumbuh beberapa waktu pada lingkungan yang terkendali.



KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pada saat kultur berumur 8 minggu, tunas adventif yang terbentuk paling banyak mencapai jumlah 24.33 ditemukan pada interaksi antara sitokinin dan auksin, yaitu BAP 1 mg/l + NAA 1 mg/l.

Kinetin kurang efektif dibandingkan dengan BAP dalam mempengaruhi jumlah tunas adventif yang terbentuk. Penggunaan BAP pada konsentrasi 1 mg/l cenderung sudah cukup merangsang pembentukan tunas adventif. Peningkatan konsentrasi sitokinin, baik kinetin maupun BAP sampai 7 mg/l tidak searah dengan peningkatan jumlah tunas adventif yang terbentuk.

Perakaran terjadi dengan baik bila tunas adventif dikulturkan dalam medium MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh.

Diantara dua medium MS dan MS1/2, keberhasilan pertumbuhan plantlet yang tinggi pada tahap aklimatisasi didapat dari medium MS.

Saran

Pada penelitian lebih lanjut, untuk mendapatkan tunas adventif dalam jumlah banyak dengan eksplan daun *Pelargonium graveolens* L'Her., maka konsentrasi BAP yang diujikan kisarannya diperkecil dari 0.5 sampai 2 mg/l.

Journal of Plant Tissue Culture and Biotechnology
IPB University

DAFTAR PUSTAKA

Abidin, Z. 1983. Dasar-dasar Pengetahuan Zat Pengatur Tumbuh. Angkasa, Bandung.

Anonymous. 1988. *Pelargonium* bunga baru. Trubus, Th. XIX, No : 20.

Backer, C. A. and R. C. Bakhuizen Van den Brink. 1963. Flora of Java. Volume I. N. V. Noordhoof, Netherland.

Bailey, L. H. 1949. Manual of Cultivated Plants. Macmillan Company, New York.

Ben-Jaacov, J. and Edna Dax. 1981. *In vitro* propagation of *Gravillea rosmarinifolia*. HortScience. 16:309-310.

Benson, L. 1957. Plant Classification. D. C. Heat and Company, Boston.

Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan. 1983. Plant Tissue Culture : Theory and Practice. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

Burstorm, H. 1957. Root surface development sucrose invension, and free space. *Physiol. Plant.* 10: 741-751.

Chen, H. R. and A. W. Galston. 1977. Growth and development of *Pelargonium* pith cells *in vitro* II. Initiation of organized development. *Physiol. Plant.* 20(2):533-539.

Crocket, J. U. 1977. Herbs. Time-Life Encyclopedia of Gardening, New York.

Debergh, P. and L. Maene. 1977. Rapid clonal propagation of pathogen-free *Pelargonium* plants starting from shoot tips and apical meristem. *Acta Hortic.* 78:449-454.

Doraswamy, K. and M. Sundaram. 1982. Geranium cultivation in South India. *In* C. K. Atal and B. M. Kapur (ed.). Cultivation and Utilization of Medicinal Plant. Regional Research Council of Institute Industrial Research, India.

- Drew, R. A. 1980a. Tissue culture in horticultural crops. *Queensland Agric. Journal.* 106(1):6-12.
- . 1980b. Pineapple tissue culture unequalled for rapid multiplication. *Queensland Agric. Journal.* 106(5):447-451.
- Esau, K. 1953. *Plant Anatomy.* John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Gamborg, O. L. and J. P. Shyluk. 1981. Nutrition, media and characteristic of plant cell and tissue cultures. *In* T. A. Thorpe (ed.). *Plant Tissue Culture, Methods and Application in Agriculture.* Academic Press, New York.
- Gautheret, R. J. 1955. The nutrition of plant tissue cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 6:433-484.
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture.* Exegetics Ltd., England.
- Gulati, *et al.* 1982. Cultivation of *Pelargonium graveolens* as annual crop. *In* C. K. Atal and B. M. Kapur (ed.). *Cultivation and Utilization of Medicinal Plant.* Regional Research Council of Institute & Industrial Research, India.
- Harney, D. M. 1982. Tissue culture of some herbaceous horticultural plant. *In* D. T. Tomes (ed.). *Application of Plant Cell and Tissue Culture in Agriculture and Industry.* University of Guelph, Guelph.
- Hennen, G. R. and T. J. Sheehan. 1978. *In vitro* propagation of *Platycerium stemaria* (Beauvois) Desv. *HortScience.* 13(3):245.
- Hilderbrandt, A. C. 1973. Plant cell suspension cultures. *In* P. F. Kruse and M. K. Patterson (ed.). *Tissue Culture Methods and Applications.* Academic Press, London.
- Hughes, K. W. 1981. Ornamental Species. *In* B. V. Conger (ed.). *Cloning Agricultural Plants via In Vitro Techniques.* CRC Press Inc., Florida.
- Hussey, G. 1978. The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. *Sci. Prog. Oxf.* 65:151-157.

- Johnsons, B.B. and E. D. Mitchell. 1978. *In vitro* propagation of Broccoli from stem, leaf, and leaf rib explants. HortScience. 13(3):246-247.
- . 1979. *In vitro* propagation of Gloxinia from leaf explants. HortScience. 13(2):149-150.
- Jona, R. and I. Gribaudo. 1987. Adventitious bud formation from leaf explants of *Ficus lyrata*. HortScience. 22(4):651-653.
- King, P. J. and H. E. Street. 1977. Growth pattern in cell cultures. In H. E. Street (ed.). Plant Tissue and Cell Culture (2nd Edition). Blackwell Scientific Publication, London.
- Lineberger, R. D. 1983. Shoot proliferation, rooting, and transplant survival of tissue-cultured 'Hally Jolivette' Cherry. HortScience. 18(2):182-185.
- Macmillan, H. F. 1954. Tropical Planting and Gardening. Macmillan & Co., New York.
- Margara, J. 1984. Bases de la Multiplication Vegetative. Institut National de la Recherche Agronomique, Versailles.
- Mariska, I., E. Gati dan D. Sukmadjaja. 1988. Kultur mata tunas dan tangkai daun pada tanaman Geranium secara *in vitro*. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balittro), Bogor. Belum dipublikasikan.
- Moore, T. C. 1979. Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer-Verlag, New York.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
- . 1974. Plant propagation through tissue cultures. Annu. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.
- Osman, A. E. 1973. Study of citonellol and geraniol contents of Egyptian Geranium oil. The Flavour Industry. p. 225-229.

- Pierik, R. L. M. 1988. Micropropagation in relation to its commercial application for agro-development in Indonesia. Makalah Seminar Bioteknologi Tumbuhan. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi dan PT Fiototek Unggul, Jakarta.
- Pillai, S. K. and A. C. Hilderbrandt. 1968. Geranium differentiated *in vitro* from stem tip and callus culture. *Plant Dis. Rptr.* 52:600-601.
- _____. 1969. Induced differentiation of Geranium plants from undifferentiated callus *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 56:52-58.
- Prawiranata, W., S. Harran dan P. Tjondronegoro. 1981. Dasar-dasar Fisiologi Tumbuhan. Jilid II. Departemen Botani, Fakultas Pertanian. Institut Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rao, P. S., W. Handro and H. Harada. 1973. Hormonal control of differentiation of shoot, root and embryos in leaf and stem cultures of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*. *Physiol. Plant.* 28:458-463.
- Scully, R. M. 1967. Aspects of meristem culture in the *Cattleya alliance*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 35:103-107.
- Seabrook, J. E. A. 1980. Laboratory Culture. In E. J. Staba (ed.). *Plant Tissue Culture as A Source of Biochemical*. CRC Press, Inc., Florida.
- Skirvin, R. M. 1981. Fruit crops. In B. V. Conger (ed.). *Cloning Agricultural Plants via In vitro Techniques*. CRC Press Inc., Florida.
- _____. M. C. Chu and E. Gomez. 1981. *In vitro* propagation of thornless trailing Blackberries. *HortScience*. 16:310-312.
- Smith, R. H. and A. E. Nightingale. 1979. *In vitro* propagation of Kalanchoe. *HortScience*. 14(1):20.
- Steeves, T. A. 1973. Leaves. In P. F. Kruse and M. K. Patterson (ed.). *Tissue Culture Methods and Applications*. Academic Prees, London.

- Skoog, F. and D. J. Armstrong. 1970. Cytokinins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21:359-385.
- , and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 15:118-131.
- Szweykowska, A. 1974. The role of cytokinins in control of cell growth and differentiation in culture. *In* H. E. Street (ed.). *Tissue Culture and Plant Science*. Academic Press, New York.
- Thorpe, T. A. 1981. *Plant Tissue Culture, Methode and Application in Agriculture*. Acad. Press, New York.
- Tjiptadi, G. B. 1985. Pengembangan usaha minyak atsiri. Hasil Pertemuan konsultasi Pengembangan Tanaman Minyak Atsiri. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balittro), Bogor.
- Van Steenis, G. G. G. J. 1958. *Flora Malesiana*. Vol. 6. Netherland.
- Wareing, P. F. and I. D. J. Phillips. 1981. *Growth and Differentiation in Plants* (3rd Edition). Pergamon Press, Oxford.
- Wattimena, G. A. 1987. Diktat Zat Pengatur Tumbuhan. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi, IPB, Bogor.
- Weier, T. E., C. R. Stocking and M. G. Barbour. 1974. *Botany An Introduction to Plant Botany*. (5th Edition). John Wiley & Sons, Toronto.
- Wetherell, D. F. 1982. *Introduction to in vitro propagation*. Avery Publishing Group Inc., New Jersey.
- Winata, L. 1987. Teknik Kultur Jaringan. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi, IPB, Bogor.
- Yeoman, J. R. M. M. 1982. *Plant Cell and Tissue Culture. A Laboratory Manual*, New York.

Tabel Lampiran 1. Komposisi Medium Murashige-Skoog (1962) yang Telah Dimodifikasi

Unsur Makro	mg/l
NH ₄ NO ₃	1 650
KNO ₃	1 900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Unsur Mikro	mg/l
KI	0.85
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Fe-Versenate (EDTA)	43
Vitamin	mg/l
Inositol	100
Asam nikotinat	0.5
Piridoksin-HCl	0.5
Thiamin-HCl	0.1
Zat Pengatur Tumbuh *	mg/l
Sitokinin (kinetin, BAP)	0, 1, 3, 5, 7
Auksin (NAA, IAA)	0, 0.5, 1
Sukrosa	30 000
Agar	7 500

* disesuaikan dengan perlakuan; Sumber : Thorpe, T. A. (1981)

Tabel Lampiran 2. Kombinasi perlakuan Sitokinin dan Auksin pada Medium Pertunasan

			A U K S I N					
			NAA (mg/l) (a)			IAA (mg/l) (b)		
			0	0.5	1	0	0.5	1
S I T O K I N I N	BAP (mg/l) (A)	0	A _{1a1}	A _{1a2}	A _{1a3}	-	A _{1b2}	A _{1b3}
		1	A _{2a1}	A _{2a2}	A _{2a3}	A _{2b1}	A _{2b2}	A _{2b3}
		3	A _{3a1}	A _{3a2}	A _{3a3}	A _{3b1}	A _{3b2}	A _{3b3}
		5	A _{4a1}	A _{4a2}	A _{4a3}	A _{4b1}	A _{4b2}	A _{4b3}
		7	A _{5a1}	A _{5a2}	A _{5a3}	A _{5b1}	A _{5b2}	A _{5b3}
	K i n (mg/l) (B) e t i n	0	-	-	-	-	-	-
		1	B _{2a1}	B _{2a2}	B _{2a3}	B _{2b1}	B _{2b2}	B _{2b3}
		3	B _{3a1}	B _{3a2}	B _{3a3}	B _{3b1}	B _{3b2}	B _{3b3}
		5	B _{4a1}	B _{4a2}	B _{4a3}	B _{4b1}	B _{4b2}	B _{4b3}
		7	B _{5a1}	B _{5a2}	B _{5a3}	B _{5b1}	B _{5b2}	B _{5b3}

Tabel Lampiran 3. Perlakuan Medium Perakaran

	M E D I U M					
	MS			MS1/2		
	* Auksin			* Auksin		
	0	0.5	1	0	0.5	1
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						

* konsentrasi auksin dalam mg/l

Tabel Lampiran 4. Sidik Ragam Kecepatan Induksi Kalus

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Jenis & Konsentrasi Auksin (Ja)	5	0.016	0.003	0.96
Jenis Sitokinin (Js)	1	0.001	0.001	0.32
Ja x Js	5	0.021	0.004	1.30
Konsentrasi Sitokinin (Ks)	3	0.018	0.006	1.79
Ja x Ks	15	0.064	0.004	1.31
Js x Ks	3	0.012	0.004	1.24
Ja x Js x Ks	14	0.045	0.003	0.97
Galat	280	0.919	0.003	
T o t a l	326	1.096		

Tabel Lampiran 5. Sidik Ragam Kecepatan Induksi Tunas

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Jenis & Konsentrasi Auksin (Ja)	5	0.038	0.008	2.26*
Jenis Sitokinin (Js)	1	0.015	0.015	4.42*
Ja x Js	5	0.045	0.009	2.66*
Konsentrasi sitokinin (Ks)	3	0.038	0.013	3.74*
Ja x Ks	15	0.048	0.003	0.94
Js x Ks	3	0.034	0.011	3.39*
Ja x Js x Ks	14	0.024	0.002	0.48
Galat	259	0.877	0.003	
T o t a l	305	1.119		

* Berbeda nyata pada taraf 0.05

Tabel Lampiran 6. Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Kedua

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Jenis & Konsentrasi Auksin (Ja)	5	0.357	0.071	0.83
Jenis Sitokinin (Js)	1	0.162	0.162	1.89
Ja x Js	5	0.374	0.075	0.87
Konsentrasi Sitokinin (Ks)	3	0.165	0.055	0.64
Ja x Ks	15	1.281	0.085	1.00
Js x Ks	3	0.165	0.055	0.64
Ja x Js x Ks	15	1.243	0.083	0.97
Galat	480	41.100	0.086	
T o t a l	527	44.847		

Tabel Lampiran 7. Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Ketiga

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Jenis & Konsentrasi Auksin (Ja)	5	313.822	67.764	11.52**
Jenis Sitokinin (Js)	1	124.210	124.023	38.14**
Ja x Js	5	136.210	27.242	8.43**
Konsentrasi Sitokinin (Ks)	3	114.404	38.135	15.24**
Ja x Ks	15	134.515	8.968	2.17**
Js x Ks	3	163.397	54.087	20.92**
Ja x Js x Ks	15	226.300	15.087	3.15**
Galat	412	1670.059	4.054	
T o t a l	459	2882.730		

** Berbeda nyata pada taraf 0.01

Tabel Lampiran 8. Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Keempat

Sumber Kergaman	db	JK	KT	F-hit
Jenis & Konsentrasi Auksin (Ja)	5	520.191	104.038	11.52**
Jenis Sitokinin (Js)	1	344.574	344.575	38.14**
Ja x Js	5	381.018	76.204	8.43**
Konsentrasi Sitokinin (Ks)	3	412.996	137.665	15.24**
Ja x Ks	15	293.603	19.574	2.17**
Js x Ks	3	567.132	189.044	20.92**
Ja x Js x Ks	15	427.168	28.478	3.15**
Galat	386	3487.366	9.035	
T o t a l	433	6434.048		

** Berbeda nyata pada taraf 0.01

Tabel Lampiran 9. Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Kelima

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Jenis & Konsentrasi Auksin (Ja)	5	999.601	199.920	13.27**
Jenis Sitokinin (Js)	1	668.480	668.480	46.72**
Ja x Js	5	843.293	168.659	11.79**
Konsentrasi Sitokinin (Ks)	3	662.411	220.084	15.43**
Ja X Ks	15	530.970	35.398	2.47**
Js x Ks	3	1081.081	360.360	25.19**
Ja x Js x Ks	15	773.837	51.589	3.61**
Galat	332	4750.103	14.308	
T o t a l	379	10309.776		

** Berbeda nyata pada taraf 0.01

Tabel Lampiran 10. Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Keenam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Jenis & Konsentrasi Auksin (Ja)	5	1249.479	249.896	12.42**
Jenis Sitokinin (Js)	1	1297.401	1297.401	64.46**
Ja x Js	5	1239.101	247.820	12.31**
Konsentrasi Sitokinin (Ks)	3	980.026	326.675	16.23**
Ja x Ks	15	895.467	59.698	2.97**
Js x Ks	3	1661.635	554.212	27.53**
Ja x Js x Ks	14	958.365	68.455	3.40**
Galat	302	6118.900	20.128	
T o t a l	350	14401.373		

** Berbeda nyata pada taraf 0.01

Tabel Lampiran 11. Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Ketujuh

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Jenis & Konsentrasi Auksin (Ja)	5	1706.835	341.367	15.09**
Jenis Sitokinin (Js)	1	2008.634	2008.635	88.68**
Ja x Js	5	1136.880	227.376	10.05**
Konsentrasi Sitokinin (Ks)	3	1829.603	609.868	26.96**
Ja x Ks	15	640.183	42.674	1.89*
Js x Ks	3	2177.065	725.688	32.07**
Ja x Js x Ks	14	828.084	59.149	2.61**
Galat	304	6199.333	22.625	
T o t a l	320	16526.617		

** Berbeda nyata pada taraf 0.01

* Berbeda nyata pada taraf 0.05

Tabel Lampiran 12. Sidik Ragam Jumlah Tunas pada Minggu Kedelapan

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Jenis & Konsentrasi Auksin (Ja)	5	968.003	193.601	7.25**
Jenis Sitokinin (Js)	1	1736.350	1736.350	65.01**
Ja x Js	5	758.024	151.605	5.68**
Konsentrasi Sitokinin (Ks)	3	2498.734	832.912	31.18**
Ja x Ks	15	512.068	34.138	1.28
Js x Ks	3	2209.200	766.400	27.57**
Ja x Js x Ks	14	686.258	49.018	1.84**
Galat	238	6357.174	26.711	
T o t a l	284	15725.811		

** Berbeda nyata pada taraf 0.01

Tabel Lampiran 13. Sidik Ragam Kecepatan Induksi Akar

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Medium MS	1	0.0271	0.0271	10.25**
NAA	2	0.0200	0.1001	3.78*
Medium MS x NAA	2	0.0027	0.0013	0.52
Galat	78	0.2065	0.0026	
Total	83	0.2563		

** Berbeda nyata pada taraf 0.01

* Berbeda nyata pada taraf 0.05

Tabel Lampiran 14. Sidik Ragam Jumlah Akar pada Minggu Pertama

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Medium MS	1	411.857	411.857	28.34**
NAA	2	193.738	96.869	6.66**
Medium MS x NAA	2	229.357	114.679	7.89**
Galat	78	1133.714	14.535	
Total	83	1968.666		

** Berbeda nyata pada taraf 0.01

Tabel Lampiran 15. Sidik Ragam Jumlah Akar pada Minggu Kedua

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Medium MS	1	271.440	271.440	1.59
NAA	2	262.453	131.226	0.77
Medium MS x NAA	2	8484.738	4242.369	24.82**
Galat	78	13331.786	170.920	
Total	83	22350.417		

** Berbeda nyata pada taraf 0.01

Tabel Lampiran 16. Sidik Ragam Jumlah Akar pada Minggu Ketiga

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F-hit
Medium MS	1	28.582	28.583	0.10
NAA	2	1361.167	680.583	2.72
Medium MS x NAA	2	21946.167	10973.083	36.63**
Galat	78	23365.643	299.560	
Total	83	46701.560		

** Berbeda nyata pada taraf 0.01