

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Jambu bol (*Syzygium malaccense* (L.) Merr & Perry) merupakan tanaman buah tahunan kerabat jambu-jambuan. Buah jambu bol memiliki tekstur daging yang lebih lembut dan lebih padat dibandingkan dengan jambu-jambuan lainnya. Pada saat buah jambu bol masih muda warna kulit buahnya merah cerah dan pada saat matang warna tersebut akan menjadi merah yang sangat pekat mendekati hitam. Buah jambu bol ini memiliki ukuran jumbo, dan rasa yang manis.

Jambu bol sudah sejak lama ditanam luas di Semenanjung Malaya, Sumatra dan Jawa karena manfaatnya. Jambu bol banyak mengandung beberapa zat yang sangat baik bagi kesehatan tubuh. Diantaranya serat, Kalium, Fosfor, Vitamin A, Vitamin B1, Vitamin C, Tiamin, Riboflavin, asam askorbat, dan Niacin. Kini jambu bol sudah banyak ditanam di berbagai negara tropis, termasuk di negara Karibia (Admin, 2012).

Jambu bol memiliki nilai ekonomis dan peluang pasar yang cukup tinggi dibanding dengan jenis jambu lainnya. Untuk buah segar harga per kilo gramnya cukup besar, dengan kisaran harga sekitar Rp.18.000 sampai Rp.30.000, oleh karena itu tanaman ini menjadi salah satu primadona tanaman buah tropis (Nuranriani, 2012). Namun produksi jambu bol pada lima tahun terakhir ini dapat dikatakan selalu konstan atau tidak ada perubahan tingkat produksi di pasar, karena tanaman jambu bol merupakan jenis buah yang sudah termasuk tanaman langka karena masih kurang dikembangkan, sehingga perlu pengembangan terutama dalam penyediaan bibit (Anonimus, 2014).

Untuk menunjang pengembangan budidaya jambu bol diperlukan penyediaan bibit varietas unggul yang bermutu dan teknologi budidaya yang aplikatif. Perbanyak jambu bol

secara vegetatif konvensional yang sudah digunakan yaitu sambung (*grafting*) dan cangkok (Rukmana 1998). Namun cara ini memiliki kelemahan, khususnya bagi tanaman berkayu banyak faktor yang menghambat proses regenerasi antara lain daya meristematis tanaman yang rendah, oksidasi fenol yang tinggi, kurangnya ko-faktor perakaran dan kandungan lignin yang tinggi yang menghambat proses pembentukan akar (Mariska dan Purnamaningsih, 2001), dan bibit yang dihasilkan masih sangat terbatas. Perbanyakan menggunakan biji tidak menjamin benih yang dihasilkan akan sama dengan induknya, karena tanaman yang menyerbuk sendiri masih ada peluang untuk terjadinya penyerbukan silang (Meynarty *dkk*, 2013).

Perbanyakan secara kultur jaringan merupakan cara yang tepat untuk mengatasi perbanyakan bibitnya. Metode kultur jaringan dikembangkan untuk membantu memperbanyak tanaman, khususnya untuk tanaman yang sulit dikembangbiakkan secara generatif ataupun vegetatif. Bibit yang dihasilkan dari kultur jaringan mempunyai beberapa keunggulan, antara lain dapat diperbanyak dalam jumlah yang besar sehingga tidak terlalu membutuhkan tempat yang luas, mampu menghasilkan bibit dengan jumlah besar dalam waktu yang singkat, kesehatan dan mutu bibit lebih terjamin, kecepatan tumbuh bibit lebih cepat dibandingkan dengan perbanyakan konvensional (Gina, 2011).

Keberhasilan perbanyakan tanaman secara *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain pemilihan eksplan yang digunakan, sterilisasi eksplan, komposisi media dasar, penggunaan zat pengatur tumbuh (zpt) terutama auksin dan sitokinin serta faktor-faktor lingkungan dimana kultur ditempatkan. Penggunaan zpt memegang peranan penting dalam pertumbuhan dan morfogenesis pada kultur sel, jaringan maupun organ. Interaksi dan keseimbangan antara zpt yang diberikan dalam media yang diproduksi oleh sel secara endogen

menentukan arah perkembangan suatu kultur. Penggunaan auksin maupun sitokinin secara eksogen, mengubah level zpt endogen sel (Gunawan, 1988).

Menurut Susana (2002) bahwa pada tahap inisiasi kalus tingkat konsentrasi 2,4-D dan BAP memberikan pengaruh yang tidak nyata terhadap presentase terbentuknya kalus dan perkembangan kalus tetapi interaksi keduanya nyata terhadap peningkatan pertambahan bobot kalus umur 8 dan 10 minggu setelah tanam (mst). Perlakuan 0,5 mg/l 2,4-D + 0,35 mg/l BAP merupakan konsentrasi yang dapat menghasilkan pertambahan bobot kalus yang maksimal pada umur 8 dan 10 mst.

Berdasarkan uraian di atas menarik untuk meneliti mengenai induksi kalus eksplan daun muda jambu bol dengan pemberian 2,4-D dan BAP secara *in vitro*. Dan diharapkan melalui penelitian ini akan diperoleh dosis 2,4-D dan BAP yang paling optimum.

1.2 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian *2,4-Dichlorophenoxy acetic acid* (2,4-D) terhadap induksi kalus pada eksplan daun muda jambu bol (*Syzygium malaccense* (L.) Merr & Perry).
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian *Benzyl amino purine* (BAP) terhadap induksi kalus pada eksplan daun muda jambu bol (*Syzygium malaccense* (L.) Merr & Perry).

3. Untuk mengetahui pengaruh interaksi antara pemberian *2,4-Dichlorophenoxy acetic acid* (2,4-D) dan *Benzyl amino purine* (BAP) terhadap induksi kalus pada eksplan daun muda jambu bol (*Syzygium malaccense* (L.) Merr & Perry).

1.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah :

1. Ada respon eksplan daun muda jambu bol dengan media kultur yang mengandung 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxy acetic acid*).
2. Ada respon eksplan daun muda jambu bol dengan media kultur yang mengandung BAP (*Benzyl amino purine*).
3. Ada interaksi eksplan daun muda jambu bol dengan media yang mengandung 2,4-D dan BAP.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah :

- a. Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk memperoleh cara perbanyak bahan tanaman jambu bol melalui kultur jaringan.
- b. Sebagai bahan informasi bagi petani dan pihak yang membutuhkan dalam kultur jaringan jambu bol dan budidaya tanaman jambu bol.

- c. Sebagai bahan penyusunan skripsi yang merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas HKBP Nommensen Medan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sistematika Tanaman Jambu Bol

Menurut (Rukmana, 1998) Sistematika (taksonomi) tanaman jambu bol diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Devisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Subkelas	: Rosidae
Ordo	: Myrtales
Famili	: Myrtaceae
Genus	: Syzygium
Spesies	: <i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr & Perry

2.2 Morfologi Tanaman Jambu Bol

Jambu bol merupakan tanaman yang pohonnya tumbuh menjulang, tingginya dapat mencapai lebih dari 10 m. Percabangan rapat, mendatar sampai condong ke atas (Ambarwati *dkk*, 2012).

2.2.1 Daun

Daunnya lebar, duduk saling berhadapan dua-dua pada tangkai bersama atau ranting. Daunnya agak tebal seperti kulit, berurat menyirip menonjol, warna daun hijau tua. Habitus tanaman seperti kerucut, tampak indah dengan penampilan spesifik.

Daun (*folium*) tergolong daun tunggal yang tidak lengkap. Pada suatu daun tidak lengkap terdiri atas beberapa bagian yaitu tangkai daun (*petiolus*), helaian daun (*lamina*). Pertulangan daun menyirip. bagian ibu tulang daun (*costa*) memanjang dari pangkal daun hingga ujung daun dan dari costa keluar kesamping tulang-tulang cabang (*nervus lateralis*) sehingga mengingatkan kita pada sirip-sirip ikan.

Daun tunggal terletak berhadapan, berbentuk memanjang (*oblongus*), karena memiliki panjang : lebar = 2,5-3 : 1 (25-30 x 7-10 cm) dengan tangkai pendek 1-1,5 cm, yang tebal dan kemerahan ketika muda. Memiliki daun bertepi rata (*integer*), daging daun *coriaceus*. Permukaan daun licin (*laevis*) dan mengkilat (*nitidus*). Ujung daun meruncing (*acuminatus*), ujung daun nampak sempit, panjang, dan runcing. Pangkal daun tumpul (*obtusus*), karena membentuk sudut tumpul (lebih besar dari 90°). Tangkai daun berbentuk silindris dan tidak menebal pada bagian pangkalnya. Daunnya rimbun hingga tanpak teduh, nyaman dibawahnya (Ambarwati *dkk*, 2012).

2.2.2 Batang

Tumbuhan ini berbentuk pohon. Batang jelas terlihat, berkayu (*lignosus*) keras, ditutupi lapisan kulit berwarna abu-abu, berbentuk silindris, permukaan batang pecah-pecah, batang berwarna coklat kemerahan, dan diameter batang sekitar 20 cm - 45 cm. Arah tumbuh batang tegak lurus dengan percabangan simpodial, arah tumbuh cabang ada yang condong ke atas ada pula yang mendatar. Kulit cabang berwarna kuning kehijauan, kemudian berubah menjadi cokelat merah (Rukmana, 1998)..

2.2.3 Bunga

Bunganya muncul sepanjang cabang dan ranting dengan warna merah jambu, berbentuk seperti sapu. Bunganya adalah bunga sempurna (*hermaphroditus*). Bunga muncul tunggal atau berkelompok pada satu kedudukan atau tangkai bersama dengan ratusan benang sari tiap bunganya. Kedudukan benang sari lebih rendah dari putiknya. Sifat bunga menyerbuk sendiri (*self pollination*), penyerbukan silang sangat rendah. Setelah penyerbukan semua benang sari

gugur. Di Indonesia musim berbunga jambu bol umumnya pada bulan Mei-Juni dan buah masak sekitar bulan Agustus-September (Rukmana, 1998).

2.2.4 Buah

Buahnya berbentuk lonjong, buah masak berwarna merah hingga merah tua, daging buah tebal berwarna putih, banyak mengandung air dan didalamnya terdapat 1-3 biji yang agak lunak. Ukuran buah bervariasi, ada yang kecil, sedang, dan ada pula yang berukuran besar. Bijinya cepat tumbuh, tidak tahan terkena sinar matahari dalam waktu lama (Rukmana, 1998).

2.2.5 Biji

Didalam tiap buah jambu bol terdapat sebutir biji. Biji berukuran besar, berbentuk bulat, dan penampakan kulit luar berwarna coklat. Biji jambu bol termasuk biji “apomixis”, yakni pembentukan biji atau buah tanpa penyerbukan. Biji apomixis dapat tumbuh menjadi tanaman normal dan sifat biji adalah poliembryoni, yang satu tunas lebih besar (bersifat generatif) dan yang lain kecil (vegetatif) atau sama seperti induknya (Rukmana, 1998).

2.2.6 Akar

Tanaman jambu bol memiliki sistem perakaran yang kuat (kokoh) dan dalam. Daya jangkauan akar dapat mencapai kedalaman 4 m atau lebih dan menyebar ke segala arah (Rukmana, 1998).

2.3 Jenis dan varietas Jambu Bol

Pada dasarnya jenis jambu bol dibedakan atas dua macam, yaitu jambu bol merah dan jambu bol putih. Penentuan jenis ini berdasarkan penampilan atau penampakan warna buah masak. Ciri-ciri (karakteristik) kedua jenis jambu bol adalah : (1) jambu bol merah ditandai

dengan buah berbentuk lonjong dan kulitnya berwarna merah muda bergaris-garis tidak merata atau polos, (2) jambu bol putih ditandai dengan buah berbentuk panjang lonjong dan kulitnya berwarna putih bersih (Rukmana, 1998).

2.4 Syarat Tumbuh Tanaman Jambu Bol

Tanaman jambu bol dapat tumbuh dengan baik di daerah yang memiliki curah hujan 500-3.000 mm/tahun. Dalam Pertumbuhannya tanaman jambu bol memerlukan intensitas cahaya matahari sebesar 40-80%. Temperatur yang ideal untuk pertumbuhan tanaman jambu bol adalah 18⁰-28⁰ C. Kelembaban udara antara 50-80 %.

Tanah yang cocok adalah tanah yang subur, gembur, banyak mengandung bahan organik. Tanah Inseptisol sangat baik, sedangkan tanah yang tidak terlalu subur seperti Ultisol dan Oksisol (Podsolik Merah Kuning) masih baik untuk budidaya jambu bol setelah diberi pupuk dan kapur. Tanah dengan keasaman (pH) antara 5,5-7,5 sangat cocok untuk pertumbuhannya. Tanaman jambu bol mempunyai daya adaptasi yang besar di lingkungan tropis dari dataran rendah sampai tinggi yang mencapai 1.200 m dpl (Anonimus, 2010).

2.5 Eksplan Daun Jambu Bol

Eksplan adalah bagian kecil jaringan atau organ yang diambil atau dipisahkan dari tanaman induk kemudian dikulturkan. Tanaman yang dijadikan sumber eksplan harus dari tanaman yang sehat, tumbuh baik atau normal dan tentunya memiliki sifat-sifat unggul. Bagian tanaman yang dapat dijadikan bahan eksplan adalah ujung akar (kaliptra), pucuk, daun, bunga, buah muda dan tepung sari. Selain itu faktor yang dimiliki bahan eksplan itu sendiri yaitu ukuran eksplan, umur fisiologis, sumber genotif dan sterilitas eksplan menentukan berhasil atau tidaknya

kulturisasi eksplan. Ukuran eksplan yang kecil umumnya mempunyai daya tahan yang kurang baik dibandingkan dengan eksplan yang ukurannya lebih besar. Ukuran eksplan yang baik adalah antara 0,5 hingga 1 cm, meskipun demikian, hal ini tidaklah mutlak pada semua eksplan, melainkan tergantung pada material tanaman yang dipakai serta jenis tanamannya.

Umur fisiologis eksplan terpengaruh terhadap kemampuannya untuk beregenerasi. Jaringan tanaman yang masih muda dan bersifat meristematik (sel-selnya masih aktif membelah) lebih mudah beregenerasi dibandingkan dengan jaringan yang sudah tua. Oleh karena itu bagian tanaman yang meristematik tingkat keberhasilan pengkulturannya lebih tinggi apabila dijadikan sebagai bahan eksplan. Bagian tanaman yang termasuk jaringan meristematik adalah pucuk apikal, pucuk lateral dan pucuk aksial. Pucuk aksial adalah pucuk dari tunas atau cabang aksial yang muncul pada ketiak daun, pucuk apikal adalah pucuk utama pada batang terminal yang mengarah ke atas dan pucuk lateral adalah pucuk yang muncul pada percabangan (Anonimus, 2013).

Menurut hasil penelitian Susana (2002) Penggunaan eksplan daun muda jambu bol pada media MS dengan penambahan 1,0 mg/l BAP memberikan kecenderungan persentase terbentuknya kalus tertinggi dibandingkan pada persentase BAP lainnya. Dari kombinasi antara 2,4-D dan BAP yang menghasilkan persentase kalus tertinggi terlihat bahwa 2,4-D pada konsentrasi rendah sementara BAP pada konsentrasi yang lebih tinggi. Pada konsentrasi 2,4-D yang lebih tinggi cenderung menurunkan persentase terbentuknya kalus dan pada konsentrasi BAP lebih rendah juga cenderung menurunkan persentase terbentuknya kalus. Hal ini kemungkinan disebabkan keseimbangan antara 2,4-D dan BAP untuk pembentukan kalus berada pada level sekitar 0,5 mg/l 2,4-D dan 1,0 mg/l BAP.

2.6 Media Kultur

Media merupakan faktor penentu dalam perbanyakan dengan kultur jaringan. Komposisi media yang digunakan tergantung dengan jenis tanaman yang akan diperbanyak. Media yang digunakan biasanya terdiri dari garam mineral, vitamin, dan hormon. Selain itu, diperlukan juga bahan tambahan seperti agar, gula, dan lain-lain (George dan Sherrington, 1984).

Zat pengatur tumbuh (hormon) yang ditambahkan juga bervariasi, baik jenisnya maupun jumlahnya, tergantung dengan tujuan dari kultur jaringan yang dilakukan. Media yang sudah jadi ditempatkan pada tabung reaksi atau botol-botol kaca. Media yang digunakan juga harus disterilkan dengan cara memanaskannya dengan autoklaf. Sterilisasi adalah bahwa segala kegiatan dalam kultur jaringan harus dilakukan di tempat yang steril, yaitu di laminar flow dan menggunakan alat-alat yang juga steril. Sterilisasi juga dilakukan terhadap peralatan, yaitu menggunakan etanol yang disemprotkan secara merata pada peralatan yang digunakan. Teknisi yang melakukan kultur jaringan juga harus steril (Aisyah *dkk*, 2011).

Ukuran botol, volume media dalam botol, dan ketersediaan oksigen dalam botol dapat mempengaruhi pertumbuhan kultur. Laju pertukaran udara dan kekenyalan media menentukan kelembaban botol. Apabila pertukaran gas besar dan media padat, kelembaban akan sangat rendah dan dapat menyebabkan media kering (Purnamaningsih, 2002).

Kultur jaringan tanaman pertama kali berhasil dilakukan oleh White pada tahun 1934. Pada tahun 1939, Whiter melaporkan keberhasilannya dalam membuat kultur kalus dari wortel dan tembakau. Pada tahun 1957, tulisan penting Skoog dan Miller dipublikasikan dimana mereka menyatakan bahwa interaksi kuantitatif antara auksin dan sitokinin menentukan tipe pertumbuhan dan morfogenik yang akan terjadi. Penelitian mereka pada tembakau mengindikasikan bahwa perbandingan auksin dan sitokinin yang tinggi akan menginduksi

pengakaran, sedangkan rasio sebaliknya akan menginduksi pembentukan tunas. Akan tetapi pola respon ini tidak berlaku universal (Bram, 2012).

2.7 Lingkungan Kultur

Lingkungan merupakan hasil interaksi antara bahan tanaman, wadah kultur, dan lingkungan eksternal ruang kultur, memiliki pengaruh yang sangat besar terhadap suatu sistem kultur jaringan. Agar pertumbuhan kultur seragam maka keseragaman faktor lingkungan harus diupayakan, tidak hanya di dalam ruang kultur, tetapi juga di dalam semua wadah kultur dengan cara menggunakan wadah yang seragam. Sejumlah faktor lingkungan terhadap pertumbuhan dan perkembangan kultur adalah suhu, cahaya, korbondioksida, oksigen, etilen, dan kelembapan. Perlu dipahami bahwa masing-masing faktor tidak bekerja sendiri-sendiri, tetapi saling berinteraksi satu sama lain dalam mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang dikulturkan.

Suhu rata-rata untuk kultur *in vitro* umumnya lebih tinggi dibandingkan suhu untuk pertumbuhan *in vitro* dari tanaman yang sama. Kebanyakan suhu ruang inkubasi dalam kultur *in vitro* di atur sama baik siang maupun malam. Pada banyak tanaman jaringannya tumbuh baik pada 17⁰ C sampai 32⁰ C. Beberapa peneliti ada yang menggunakan suhu ruang inkubasi yang disesuaikan dengan suhu alami tempat tumbuh tanaman tersebut secara *in vitro*, pada suhu siang hari diberikan suhu lebih tinggi dari rata-rata, dan pada malam hari lebih rendah 6⁰ C sampai 8⁰ C.

Tanaman-tanaman tropika umumnya dikehendaki suhu yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman subtropika yaitu rata-rata 27,7⁰ C dengan selang antara 24⁰ C sampai 32⁰ C. Suhu juga memegang peranan penting dalam mempengaruhi laju dan perbanyakkan jaringan. Diamantoglou dan Mitrakos (1979) melaporkan bahwa embryo tanaman *olive* tumbuh lambat pada suhu 25⁰ C namun 70 % mampu membentuk planlet, sedangkan pada suhu 15⁰ C, 20⁰ C atau 30⁰ C hanya setengahnya. Meristem tanaman kubis bunga tumbuh baik pada suhu 18⁰ C dan pada 22⁰ C tumbuhnya kurang memuaskan. Eksplan yang dikulturkan juga mengkehendaki suhu ruang tumbuh yang optimum agar tetap segar, seperti pucuk tanaman *Peach* akan tetap segar pada suhu 21⁰ C hingga 24⁰ C (80 hingga 90 %). Sedangkan pada 28⁰ C hanya 7 % yang segar. Kultur kalus juga menunjukkan laju pertumbuhan yang berbeda karena suhu. Penelitian Nickell dan Burkholder (1950) menunjukkan bahwa kalus dari *sorrel* tumbuh dinaikkan hingga 45⁰ C pertumbuhan sangat sedikit dan kalus menjadi coklat (Wattimena *dkk*, 1991).

2.8 Peranan Zat Pengatur Tumbuh Dalam Media Kultur

Pierik (1997) mengemukakan bahwan fitohormon adalah senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tanaman tingkat tinggi secara endogen. Senyawa tersebut berperan merangsang dan meningkatkan pertumbuhan serta perkembangan sel, jaringan, dan organ tanaman menuju arah diferensiasi tertentu. Senyawa-senyawa lain yang memiliki karakteristik yang sama dengan hormon, tetapi diproduksi secara eksogen, dikenal sebagai zat pengatur tumbuh (zpt).

Di dalam teknik kultur jaringan, kehadiran zat pengatur tumbuh sangat nyata pengaruhnya. Bahkan, Pierik (1997) menyatakan bahwa sangat sulit untuk menerapkan teknik kultur jaringan pada upaya perbanyakkan tanaman tanpa melibatkan zpt.

Induksi kalus dapat berhasil apabila dalam media ditambahkan zpt. Zat pengatur tumbuh merupakan senyawa organik yang berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan kultur. Zat yang sering digunakan antara lain auksin (2,4-D, picloram, IAA, dan NAA), sitokinin (BA, kinetin, dan adenin sulfat), giberelin (Giberelin acid), dan inhibitor. Konsentrasi zpt yang digunakan tergantung pada tahap perkembangan yang terjadi. Untuk menginduksi kalus embriogenik, sering digunakan auksin khususnya 2,4-D atau kombinasinya. Penggunaan auksin sendiri atau bersamaan dengan sitokinin juga memberikan hasil yang cukup baik pada beberapa jenis tanaman (Abdillah, 2013).

Menurut Fitrianti (2006) zpt yang banyak digunakan dalam kultur jaringan khususnya pada tujuan pengkalusan adalah auksin dan sitokinin. Zat pengatur tumbuh yang digolongkan auksin yang sering digunakan dalam kultur jaringan, seperti asam IBA, dan 2,4-D yang cenderung menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi pucuk tanaman. Oleh karena itu perlu diuji kembali peranan zpt dari golongan auksin terhadap pembentukan kalus yang optimal pada embryozigotik.

2.8.1 Auksin 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxy acetic acid)

Auksin dalam kultur jaringan berperan dalam pembentukan kalus, klorofil, morfogenesis akar, dan tunas serta embryogenesis. Auksin yang digunakan yaitu 2,4 *dchlorophenoxy acetic acid* (2,4-D), *indole 3- acetic acid* (IAA) dan *1-naphthalene acetic acid* (NAA). IAA merupakan auksin alamiah, sementara 2,4-D dan NAA adalah senyawa sintesis yang menirukan efek dari auksin yang terbentuk secara alamiah. Auksin yang paling sering digunakan untuk mendorong pembentukan kalus adalah 2,4-D (Armini *dkk*, 1991).

Menurut Gunawan (1991) tiap auksin sintetik berbeda dalam aktifitas fisiologis, pergerakan di dalam jaringan tanaman, pengikatan di dalam sel, dan sifat metabolisme. Dalam pemakaian dalam kultur jaringan tanaman, konsentrasi efektif berbeda-beda tergantung tipe organ (eksplan), metoda dan apa yang akan diinduksi (induksi kalus, induksi tunas, induksi akar dan lain-lain).

Penambahan auksin dalam jumlah yang lebih stabil, seperti asam 2,4-D cenderung menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi pucuk tanaman. Pemakaian zat asam 2,4-D biasanya digunakan dalam jumlah kecil dan dalam waktu yang singkat, antara 2-4 minggu karena merupakan auksin kuat, artinya auksin ini tidak dapat diuraikan di dalam tubuh tanaman pada (Wetherell, 1987). Pierik (1997) menganjurkan untuk membatasi penggunaan 2,4-D pada kultur *in vitro* karena 2,4-D dapat meningkatkan peluang terjadinya mutasi genetik dan menghambat fotosintesis pada tanaman yang diregenasikan.

Penelitian yang menggunakan 2,4-D untuk induksi kalus antara lain penelitian yang dilakukan oleh Yelnitis (2012) pada perbanyakan tanaman ramin dengan media MS dan penambahan beberapa konsentrasi 2,4-D yang digunakan, perlakuan 4.0 mg/l dan 5.0 mg/l merupakan perlakuan yang berhasil membentuk kalus. Kalus paling banyak dihasilkan dari perlakuan 2,4-D 5.0 mg/l yaitu mencapai 95 % dari eksplan yang dikulturkan. Hal ini menunjukkan bahwa untuk induksi kalus dibutuhkan 2,4-D dengan konsentrasi yang relatif tinggi. Hasil yang berbeda dari penelitian Yelnitis (2007) yang menunjukkan bahwa kalus dari potongan embrio muda tanaman *Shorea pinanga* dapat dihasilkan dari perlakuan 2,4-D dengan konsentrasi 3.5 mg/l. Selain memberikan persentase kalus yang lebih tinggi, kalus dari perlakuan 2,4-D 5.0 mg/l memperlihatkan pertumbuhan yang lebih cepat. Rata-rata induksi kalus dari perlakuan ini terjadi 21 hari setelah dikulturkan. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan yang

berbeda memberikan respon dan kecepatan tumbuh yang berbeda terhadap eksplan yang dikulturkan. Menurut Gunawan (1987) eksplan berbeda memberikan respon berbeda terhadap perlakuan yang sama.

2.8.2 Sitokinin BAP (*Benzyl amino purine*)

Sitokinin adalah senyawa yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sama halnya dengan kinetin (6-furfurylamino purine). Peranan auksin dan sitokinin sangat nyata dalam pengaturan pembelahan sel, pemanjangan sel, difrensiasi sel, dan pembentukan organ.

Pemberian sitokinin ke dalam medium kultur jaringan penting untuk menginduksi perkembangan dan pertumbuhan eksplan. Senyawa tersebut dapat meningkatkan pembelahan sel, proliferasi pucuk, dan morfogenesis pucuk (Smith, 1992) bahkan menurut George dan Sherrington (1984), apabila ketersediaan sitokinin di dalam medium kultur sangat terbatas maka pembelahan sel pada jaringan yang dikulturkan akan terhambat. Akan tetapi, apabila jaringan tersebut disubkulturkan pada medium dengan kandungan sitokinin yang memadai maka pembelahan sel akan berlangsung secara sinkron.

Keberhasilan penggandaan tunas melalui kultur meristem sangat tergantung pada keseimbangan zpt auksin dan sitokinin, terutama keseimbangan antara 2,4-D (2,4-*Dichlorophenoxy acetic acid*) dan BAP (6-*benzylaminopurine*). BAP adalah zpt sintetik yang berperan dalam pembelahan sel dan morfogenesis sedangkan 2,4-D adalah zpt yang dapat meningkatkan terjadinya mutasi genetik dan menghambat fotosintesis pada tanaman yang diregenerasikan (Pierik, 1997).

Penelitian yang menggunakan BAP untuk merangsang pembentukan tunas antara lain penelitian yang dilakukan oleh Hadipoentyanti dan Udarno (2000) pada tanaman panili hibrida menghasilkan tunas terbanyak pada kombinasi media MS + BA 0,5 mg/l. Hasil yang sama juga didapatkan dari penelitian Geetha dan Ross (2000) multiplikasi panili pada media MS dengan penambahan BA 2,5 mg/l menghasilkan tunas terbanyak yaitu 9,66 tunas (Seswita *et al.* 2001).

BAB III

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan UPT. BIH Gedung Johor , Kecamatan Medan Johor, Sumatera Utara dan dilaksanakan pada bulan September 2014 sampai dengan Desember 2014.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jambu bol varietas *jamaika*, media kultur yang digunakan adalah media MS (*Murashige dan Skoog*, 1962), Bacto agar, zat pengatur tumbuh (2,4-D dan BAP), deterjen, betadine, NaClO (sodium hypoklorit), aquades steril, alkohol 70%.

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf, Laminar *Air Flow Cabinet* (L AFC), lampu spiritus, botol kultur, erlenmeyer, gelas ukur, Petridis, pisau scalpel, timbangan analitik, hot plate, pinset, pH meter, aluminium foil, steerer, beaker glass, shaker, kertas label, kertas sampul, kompor listrik, timer, rak kultur, baju laboratorium, masker, tutup kepala.

3.3 Metode Penelitian

Rancangan Acak Lengkap (RAL) adalah rancangan yang paling umum digunakan dalam percobaan kultur jaringan yang faktor-faktor genetik dan fisiologis bahan eksplan bersifat homogen dan wadah kultur ditempatkan pada rak dengan intensitas cahaya yang sama (Little dan Hills, 1978). Berdasarkan uraian di atas penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari dua faktor perlakuan, yaitu:

I. Faktor konsentrasi 2,4-D (*2,4 dichlorophenoxy acetic acid*) yang disusun dalam 4 taraf yaitu:

D₀ = 0,0 mg/l

$$D_1 = 0,2 \text{ mg/l}$$

$$D_2 = 0,4 \text{ mg/l}$$

$$D_3 = 0,6 \text{ mg/l}$$

II. Faktor konsentrasi BAP (*6-benzylaminopurine*) yang disusun dalam 4 taraf yaitu:

$$A_0 = 0 \text{ mg/l}$$

$$A_1 = 1 \text{ mg/l}$$

$$A_2 = 2 \text{ mg/l}$$

$$A_3 = 3 \text{ mg/l}$$

Dengan demikian diperoleh kombinasi perlakuan sebanyak $4 \times 4 = 16$ kombinasi yaitu:

$$D_0A_0 \quad D_1A_0 \quad D_2A_0 \quad D_3A_0$$

$$D_0A_1 \quad D_1A_1 \quad D_2A_1 \quad D_3A_1$$

$$D_0A_2 \quad D_1A_2 \quad D_2A_2 \quad D_3A_2$$

$$D_0A_3 \quad D_1A_3 \quad D_2A_3 \quad D_3A_3$$

Jumlah perlakuan : 16

Jumlah ulangan : 3

Jumlah eksplan/botol : 1

Jumlah eksplan sisipan : 3

Jumlah tanaman utama : 48

Jumlah seluruh botol

: $48 \times 3 = 144$ botol

Model linier aditif yang digunakan untuk RAL Faktorial adalah:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dimana:

Y_{ijk} = Hasil pengamatan dari faktor BAP ke-i dan faktor

2,4-D ke-j pada ulangan ke-k

μ = Nilai tengah

α_i = Pengaruh perlakuan BAP taraf ke-i ($i=1,2,3,\dots,t$)

β_j = Pengaruh perlakuan 2,4-D taraf ke-j ($j=1,2,3,\dots,t$)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Pengaruh interaksi BAP taraf ke-i dan 2,4-D taraf ke-j

ϵ_{ijk} = Galat pada perlakuan taraf ke-i dan perlakuan taraf ulangan ke-j ($j=1,2,3,\dots,r$) pada ulangan ke-k

Untuk mengetahui pengaruh dari factor yang di coba serta interaksinya maka data hasil percobaan dianalisis dengan menggunakan sidik ragam. Hasil analisis sidik ragam yang nyata atau sangat nyata pengaruhnya dilanjutkan dengan uji jarak Duncan pada taraf $\alpha = 0,05$ dan $\alpha = 0,01$ untuk membandingkan perlakuan dan kombinasi perlakuan (Malau, 2005).

3.3 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian meliputi beberapa kegiatan yaitu:

3.4.1 Pengadaan dan Seleksi Tanaman Jambu Bol

Sumber bahan tanaman berasal dari tanaman induk jambu bol varietas Jamaika dari Malaka, untuk dijadikan eksplan. Daun tanaman jambu bol diambil dari pohon koleksi Balai Induk Hortikultura (BIH) Gedung Johor, Kecamatan Medan Johor, Sumatera Utara.

3.4.2 Sterilisasi Ruang Kultur dan Alat

Ruang kultur adalah suatu ruangan untuk menempatkan botol-botol kultur yang sudah terdapat eksplan di dalamnya. Botol-botol kultur tersebut ditempatkan pada rak-rak kultur yang dilengkapi dengan lampu neon dengan intensitas kira-kira $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ruangan ini dilengkapi pula dengan AC untuk mendapatkan suhu udara yang dikehendaki, yaitu $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Di dalam ruangan ini terdapat pula peralatan lain, seperti : timer pengatur fotoperiodesitas (biasanya 16 jam/ hari; termometer udara; higrometer; *shaker* (meja penggojok) untuk kultur yang diinkulasikan pada medium cair. Ruang kultur harus selalu dibersihkan untuk menghindari kemungkinan terjadinya kontaminasi terhadap kultur, bahkan bila perlu di dalam ruangan ini ditaburi dengan tablet-tablet formalin.

Alat-alat yang akan digunakan untuk pembuatan larutan stok media seperti gelas piala, erlenmeyer, dan labu ukur, dicuci dengan menggunakan deterjen dan dibilas dengan akuades steril. Hal yang sama juga dilakukan terhadap botol kultur, cawan petridis dan alat-alat tanam. Selanjutnya alat-alat tersebut disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 15 psi dan temperatur 121°C selama 60 menit (Zulkarnain. 2009).

3.4.3 Pembuatan Media Kultur

Dalam pembuatan medium kultur, beberapa batasan yang berkaitan dengan konsentrasi bahan-bahan terlarut, seperti mol (berat gram molekul) dan molaritas (jumlah mol suatu senyawa yang terdapat dalam satu liter larutan), terlebih dahulu harus dipahami dengan baik. Hal itu

bertujuan agar medium yang dibuat memiliki kandungan bahan-bahan terlarut dengan konsentrasi yang tepat dan sesuai dengan formulanya.

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS padat. Tahap pertama dalam pembuatan media adalah membuat larutan stok. Larutan stok adalah larutan bahan media yang dibuat dalam jumlah atau volume besar. Pembuatan larutan stok bertujuan untuk menghemat pekerjaan menimbang bahan yang berulang-ulang setiap kali membuat media. Larutan stok disimpan di tempat bertemperatur rendah. Pembuatan larutan stok bahan kimia terdiri dari hara makro dengan pembesaran 10x, hara mikro dengan pembesaran 100x, larutan iron dengan pembesaran 100x, larutan vitamin, sukrosa, myo-inositol dan agar-agar.

Tahap berikutnya, sukrosa dimasukkan ke dalam beaker glass yang telah berisi akuades 500 ml, lalu di aduk dengan menggunakan magnetic stirrer sebagai pengaduk. Kemudian ditambahkan myo-inositol diaduk hingga larut. Dimasukkan unsur hara makro, larutan stok hara mikro, iron dan vitamin. Kemudian larutan dibuat dalam volume 900 ml. Keasaman diukur dengan pH meter. pH yang dikehendaki adalah 5,8. Untuk mengatur pH yaitu menaikkan atau menurunkan pH dapat digunakan larutan NaOH dan HCl 0,1 N.

Agar ditambahkan ke dalam erlenmeyer setiap perlakuan, lalu dipanaskan diatas *hot plate* dengan pengaduk magnetik, sampai larutan menjadi bening (semua agar telah larut). Media siap dipindahkan ke dalam botol kultur steril. Kemudian botol kultur tersebut ditutup dengan aluminium foil dan diberi label sesuai dengan perlakuan. Media dalam botol tersebut disterilisasikan di dalam autoklaf dengan tekanan 17,5 psi, suhu 121⁰ C selama 120 menit. Selanjutnya dapat disimpan dalam ruang kultur sebelum digunakan.

3.4.4 Sterilisasi Bahan Tanaman

3.4.4.1 Sterilisasi di luar laminar

Daun muda direndam dalam larutan deterjen selama 30 menit kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya eksplan direndam dalam larutan Dithane M-45 dan Benlate, masing-masing dengan konsentrasi 2 g/l dan diletakkan pada shaker selama 30 menit, kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Eksplan dipotong-potong dengan ukuran 1 cm x 1 cm dengan menggunakan scapel dan pincet di dalam petridish berisi aquades steril sehingga fenolit dan getah yang keluar pada saat pemotongan dapat larut dalam air (Susana, 2002).

3.4.4.2 Sterilisasi di dalam laminar

Eksplan yang sudah dipotong direndam dalam larutan NaClO (1,3 %) ditambah Tween-20 (2 tetes) selama 15 menit. Setelah itu dilanjutkan dengan perendaman dalam NaClO (1,3 %) dan Tween (2 tetes) selama 10 menit, lalu dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Eksplan direndam dalam larutan alkohol 70 % selama 1 menit, lalu dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Sterilisasi dilanjutkan dengan merendam eksplan dalam larutan betadine (5 %) selama 5 menit. Eksplan dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali, kemudian diletakkan pada petridis yang sudah steril.

3.4.5 Sterilisasi *Laminar Air Flow Cabinet*

Sterilisasi *Laminar Air Flow Cabinet* dengan menggunakan alkohol 70% kemudian dibiarkan terlebih dahulu \pm 10 menit, setelah itu lampu UV (Ultra Violet) berwarna biru dihidupkan selama 30 – 60 menit.

3.4.6 Penanaman eksplan

Setelah tunas muda jambu bol disterilkan melalui perendaman dalam larutan Clorox, masing-masing eksplan di potong kecil-kecil di dalam Petridis dan menggunakan amoksilin sebagai antibiotic kemudian eksplan ditanam pada satu botol media agar inisiasi.

Medium dasar yang digunakan adalah formulasi Murashige & Skoog (1962) yang diberi tambahan (mg/l) : thiamine HCl 0.4; nicotinic acid 0.5; pyridoxin HCl 0.5; glycine 2; sukrosa 30.000; agar 8.000; NaH₂PO₄, 170. Botol kemudian ditutup dengan menggunakan tutup botol plastik yang tahan panas dan diberi kode perlakuan. Kemudian botol-botol yang berisi eksplan ditempatkan dalam rak-rak kultur jaringan.

3.4.7 Pemeliharaan kultur

Botol-botol kultur yang berisikan eksplan yang ditempatkan di dalam rak-rak kultur jaringan dan disusun sedemikian rupa pada rak kultur yang suhunya telah diatur, ditempatkan pada kondisi terang dengan penyinaran lampu TL Neon ± 50 cm dari botol-botol kultur. Dalam pemeliharaan kelembaban (RH) lingkungan harus mendekati 100% karena RH di sekeliling kultur mempengaruhi pola pengembangan. Temperature yang dibutuhkan untuk mendapatkan pertumbuhan yang optimum berkisar 20⁰C – 25⁰C (Hendrayono dan Wijayani, 1994). Ruangan ini diusahakan bebas dari bakteri dan cendawan, dimana setiap hari botol disemprot dengan menggunakan alkohol 70 %.

3.5 Pengamatan

3.5.1 Persentase Eksplan Membentuk Kalus (%)

Persentase eksplan membentuk kalus dilakukan dengan cara menghitung jumlah eksplan membentuk kalus pada media perlakuan, dengan rumus :

$$\text{Persentase Eksplan Membentuk Kalus} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang membentuk kalus}}{\text{Jumlah eksplan per perlakuan}} \times 100 \%$$

3.5.2 Pertumbuhan Kalus

Pengamatan terhadap pertumbuhan kalus pada eksplan dilakukan dengan cara memberikan symbol sebagai berikut :

- : Tidak terbentuk kalus
- + : Sedikit kalus tumbuh
- ++ : 1/3 eksplan kalus tumbuh
- +++ : 1/2 eksplan kalus tumbuh
- ++++ : Penuh atau seluruh eksplan tertutup kalus

3.5.3 Bobot Kalus (g)

Berat kalus diukur dan dilakukan pada akhir penelitian dengan cara menimbang eksplan dengan menggunakan timbangan digital. Pertama-tama botol berisi media MS + eksplan ditimbang, lalu botol kultur yang berisi media MS + eksplan. Kemudian hasilnya dihitung dengan cara mengurangkan bobot botol kultur yang berisi media MS + eksplan dengan botol kultur yang berisi media MS.