

Induksi Pertumbuhan Eksplan Endosperm Ulin dengan IAA dan Kinetine

HIDAYAT

Staf Pengajar Fakultas Pertanian Universitas Tanjungpura, Jl. A. Yani Pontianak, 78124,

e-mail : hidayatuntan@yahoo.com

ABSTRACT

Growth Induction with IAA and Kinetine for Ulin Endosperm Explant

The aims of this research for examining the effect of concentrations of Indole Acetic Acid (IAA) and Kinetine on the growth of ulin. The research using Murashige and Skoog medium was conducted in Biotechnology Laboratory of Agriculture Faculty, Tanjungpura University from June 2003 to May 2004. All treatments were arranged in randomized complete design with ten treatments and four replications. The variable of this research was scoring on callus formation, time of callus formation (days) and number of callus. The result showed that (5.0 ppm IAA + 6.0 ppm Kinetine) and (6.0 ppm IAA + 5.0 ppm Kinetine) were better concentration combination for callus induction. The better for time of callus formation and numbers of callus were 5.0 ppm IAA + 6.0 ppm Kinetine.

Keywords: IAA, Kinetine, callus, ulin

PENDAHULUAN

Kayu ulin biasanya lebih dikenal dengan nama kayu besi berasal dari tanaman ulin. Saat ini keberadaan tanaman ulin di hutan-hutan sangat sedikit sebagai akibat eksploitasi yang berlebihan dan *illegal logging* sehingga mendekati kepunahan.

Ada upaya untuk melestarikan dan meremajakan dengan menggunakan cara konvensional seperti melalui biji, namun lamanya fase perkecambahan (9-12 bulan) merupakan faktor penghambat. Perbanyak dengan menggunakan cara vegetatif dengan menggunakan stek nampaknya tidak berhasil.

Budidaya jaringan merupakan alternatif untuk mengatasi kekurangan/ kelangkaan bibit ulin secara massal dan murah. Langkah awal yang dilakukan dalam budidaya jaringan ulin ini adalah mencari formula zat pengatur tumbuh (ZPT) yang tepat, jenis eksplan, dan selanjutnya aklimatisasi planlet yang dihasilkan. Kelebihan cara ini adalah dapat dilakukan secara massal (banyak) dengan sekali pembibitan, bahan tanam yang dibutuhkan sedikit, lebih cepat sehingga akan murah/ekonomis, mudah dalam penanganan bibit yang dihasilkan, resiko rusak dalam pengangkutan ke lapangan kecil. Medium yang banyak digunakan dalam

budidaya jaringan adalah Murashige and Skoog (MS).

Medium MS banyak sekali digunakan dalam perbanyakan melalui budidaya jaringan misalnya Soeprapto (1987) pada tanaman tebu klon POJ 3016; Maryanto (1987) pada tanaman tembakau; Hendarko (1982) pada tanaman Melinjo; Ambarwati (1987) pada tanaman melinjo. Keberhasilan morfogenesis suatu budidaya jaringan salah satunya ditentukan oleh eksplan. Bagian tanaman yang dapat dipergunakan sebagai eksplan bisa berupa embrio dewasa maupun embrio muda, bagian-bagian kecambah yang paling responsif, karena masih juvenil seperti kotiledon, hipokotil; dan pucuk kecambah (Rineksane, 2000).

Pembentukan akar akan diinduksi lebih mudah pada medium dengan aras konsentrasi 0,0186 - 0,93 mg/l NAA, selanjutnya dijelaskan pula oleh Gunawan (1991), untuk pertumbuhan budidaya pucuk oncidium perlu ditambahkan 0,5 mg/l NAA. Hasil penelitian Hussey (1978), inisiasi tunas adventif terjadi pada budidaya sisik umbi ganda yang ditanam pada media yang mengandung 0,5 mg NAA dengan konsentrasi Benzyl Amino Purin (BAP) yang bervariasi.

Normah (1992), melakukan penelitian dengan menggunakan eksplan biji manggis dalam media MS

yang ditambah dengan BAP dan NAA. Hasil penelitian tersebut menunjukkan, bahwa tunas terbanyak dihasilkan dari media yang ditambah dengan 30-40 μ M BAP dan 2,5 M NAA.

Penelitian ini bertujuan untuk menemukan aras konsentrasi IAA dan kinetine terhadap induksi pertumbuhan eksplan ulin.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Tanjungpura mulai Juni 2003 sampai Mei 2004.

Bahan penelitian berupa eksplan ulin yaitu berupa biji diambil bagian endosperm. Biji berasal dari tegakkan alam dan pembibitan dari biji yang diperlakukan khusus untuk menghindari kontaminasi internal dan eksternal, medium MS dan zat pengatur tumbuh.

Alat yang dipergunakan seperangkat peralatan laboratorium bioteknologi, kamera, bunsen, mistar, *air condition*, *Laminar air flow cabinet*, *thermos*, *kulkas*, *shaker*, dan alat tulis menulis.

Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan cara eksplan disterilisasi dengan cara biji dicuci dengan deterjen pada air mengalir selama 30 menit, kemudian dicelupkan dalam alkohol 70 %, dibakar di atas api spiritus sebanyak tiga kali. Kulit buah dikupas digojog (*shaker*) dengan larutan klorok 10 % selama 10 menit dibilas tiga kali dengan aqudest steril, kemudian digojog kembali dalam larutan klorok 5 % selama 2-5 menit, bilas aqudest setril tiga kali, eksplan dipotong berukuran 2-5 cm². Setelah itu celupkan dalam betadine 10 % lalu ditiriskan, semua perlakuan ini dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* kemudian setelah itu ditanam pada media.

Media dasar MS dibuat sesuai dengan kebutuhan dengan cara membuat larutan induk masing-masing 4. Pencampuran larutan induk dilakukan dengan penambahan NaEDTA dan vitamin. Keasaman media (pH) 5,8 diatur dengan menggunakan HCl 1 N dan KOH 1N. Media padat dibuat dengan menambah agar sebanyak 6,5 g/ media cair lalu disterilisasi. Padasuhu 121 °C dan tekanan 17,5 psi Media disimpan selama kurang lebih satu minggu kemudian siap ditanam eksplan.

Penelitian menggunakan rancangan experimental murni, pemilihan rancangan ini dikarenakan dilakukan di Laboratorium, sehingga kondisi lingkungan penelitian terkontrol secara baik.

Medium MS yang diberi perlakuan menggunakan metode eksperimen Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari sepuluh perlakuan dengan empat ulangan. Susunan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Susunan perlakuan aras konsentrasi IAA dan Kinetine terhadap eksplan Endosperm ulin

Perlakuan	Konsentrasi (ppm)									
IAA	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
Kinetine	10,0	9,0	8,0	7,0	6,0	5,0	4,0	3,0	2,0	1,0

Pengamatan dilakukan yang meliputi pengamatan kualitatif berupa terbentuknya kalus dengan membuat skor sebagai berikut : 1 = tidak terbentuk kalus, 2 = eksplan mulai bengkak, 3 = terbentuk kalus, 4 = terbentuk tunas

Pengamatan kuantitatif meliputi : waktu terbentuknya kalus (hari) dihitung sejak penanaman eksplan sampai minggu ke-24 dan jumlah kalus yang terbentuk.

Data kualitatif dianalisis nonparametrik dengan metode Hilderbrand (Huhn & Leon, 1995) yaitu data (X_{ij}) dikoreksi menjadi $X_{ij} \rightarrow X_{ij}^* = X_{ij} - r_j + r_i$, selanjutnya nilai X_{ij}^* diperingkat untuk semua data. Menghitung efek perlakuan dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

$$\chi^2_{hitung} = \frac{12}{t(N + 1)} \left[\sum_{i=1}^t (\bar{R}_{i\cdot} - \dots)^2 \right],$$

dimana N = tr (t = jumlah perlakuan; = peringkat terkoreksi; r = jumlah ulangan) selanjutnya hasil perhitungan dibandingkan terhadap nilai tabel dengan derajat bebas (t-1). Apabila nilai $\chi^2_{hitung} > \chi^2_{tabel(0,05)}$ maka terdapat perbedaan perlakuan yang diuji begitu pula sebaliknya.

Data kuantitatif dianalisis varians apabila perlakuan berpengaruh dilanjutkan ke uji Beda Nyata Terkecil dengan taraf kepercayaan 5 %.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan penelitian minggu ke-24 terhadap kultur ulin asal endosperm yaitu bagian endosperm disajikan pada Tabel 2.

Data skoring hasil pengamatan selanjutnya dikoreksi, hasil peringkat terkoreksi disajikan pada Tabel 3. Berdasarkan hasil peringkat terkoreksi ini dihitung Chi-kuadrat yang didapatkan hasil sebesar 23,7135 apabila dibandingkan dengan $\chi_{9,0,01} = 21,67$, maka perlakuan tersebut berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan kalus eksplan ulin.

Data jumlah dan waktu terbentuk kalus disajikan pada Tabel 4, data yang diperoleh terlebih dahulu diuji Bartlette untuk melihat homogenitas variansnya sebagai salah satu syarat untuk dapat dianalisis varians, ternyata hasil uji Bartlette varians datanya telah homogen sehingga dapat dilakukan analisis varians.

Tabel 4 terlihat perlakuan (5,0 ppm IAA + 6,0 ppm Kinetine) dan (6,0 ppm IAA + 6,0 ppm Kinetine) memberikan pertumbuhan kalus yang terbaik, pemberian auxin dan sitokinin dengan konsentrasi yang seimbang akan merangsang pembentukan kalus pada jaringan meristematis tanaman. Pemberian IAA dengan aras konsentrasi 5,0 ppm dan kinetine sebesar 6,0 ppm memberikan efek perangsangan pertumbuhan kalus yang baik, begitu pula jika konsentrasi dibalik yaitu IAA 6,0 ppm dan kinetine 5,0 ppm. Pemberian auxin

dengan konsentrasi tinggi mempunyai efek menghambat pertumbuhan jaringan, yang disebabkan terdapat persaingan untuk mendapatkan tempat peletakan pada tempat kedudukan penerima, yaitu penambahan konsentrasi meningkatkan kemungkinan terdapatnya molekul yang sebagian melekat menempati tempat kedudukan penerima, yang menyebabkan kurang efektifnya gabungan tersebut (Gardner *et al.*, 1991).

Efek dari auxin secara selular adalah peningkatan sintesa nukleotida DNA dan RNA, sintesis protein dan enzim, peningkatan pertukaran proton, muatan membran dan pengambilan kalium (Gardner *et al.*, 1991).

Margara (1982 dan Pierik (1975) dalam Suryowinoto (1990) menambahkan bahwa meristem terdiri dari (1) meristem primer yaitu meristem batang, akar, apikal, dan lateral, (2) meristem akar yaitu meristem apikal, lateral, dan adventif, (3) meristem sekunder (kambium), (4) meristem interkaler, (5) meristem daun, dan (6) meristem fellogen.

Pertumbuhan kalus sebagai akibat respon terhadap zat tumbuh yang diberikan dan hormon yang terdapat dalam eksplan. Inisiasi kalus dimulai dengan pertumbuhan sel perenkim yang terletak pada bagian epidermis atau di bawah permukaan eksplan. Pertumbuhan kalus pada eksplan di tandai dengan munculnya tonjolan-tonjolan kecil yang menyebabkan eksplan membengkak pada

Tabel 2. Skor pertumbuhan eksplan endosperm ulin

Perlakuan (ppm IAA + kinetine	Ulangan				Total	Rata-rata
	I	II	III	IV		
1,0 + 10,0	2	1	1	1	5	1,25
2,0+ 9,0	1	2	2	1	6	1,50
3,0 + 8,0	2	2	1	1	6	1,50
4,0 + 7,0	2	3	1	1	7	1,75
5,0 + 6,0	4	4	3	2	13	3,25
6,0 + 5,0	3	2	4	1	10	2,50
7,0 + 4,0	3	1	1	1	6	1,50
8,0 + 3,0	3	1	1	1	6	1,50
9,0 + 2,0	2	2	1	1	6	1,50
10,0 + 1,0	1	2	1	1	5	1,25
Total	23	20	16	11		
Rata-rata	2,30	2,00	1,60	1,10		

jaringan di sekitar luka ke bagian tengah eksplan, kemudian jaringan membesar dan mengembang serta bertambah banyak. Ini berarti penambahan ZPT belum mampu menyumbangkan pertumbuhan yang maksimal dalam memacu pertumbuhan eksplan, karena itu penambahan dalam konsentrasi yang tepat kemungkinan dapat menginisiasi pertumbuhan yang lebih baik seperti terjadi pertumbuhan pembentukan tunas dan planlet.

Diperkirakan IAA yang diberikan pada media belum cukup untuk menginduksi eksplan membentuk tunas dan planlet disebabkan terajadnya penguraian pada proses sterilisasi dengan menggunakan suhu tinggi (autoclave) dan terkena cahaya lampu pada rak tumbuh.

Pemakaian IAA dalam budidaya jaringan eksplan asal biji, IAA akan habis dioksidasi oleh enzim bila terkena cahaya, oleh karena itu jumlah yang diberikan harus besar (1-30 ppm) (Wahyurini, 2002).

Terlihat pada Tabel 4 , perlakuan memberikan jumlah kalus terbanyak yaitu 2,50 kalus dan waktu terbentuk kalus tercepat (147, 75 hari) adalah pada perlakuan pemberian pemberian (5,0 ppm IAA + 6,0 ppm Kinetine)

IAA berperanan pada proses pembelahan, difrensiasi , dan pemanjangan sel. Di samping itu pula

IAA berperan dalam proses pertumbuhan jaringan yang dibudidayakan. Dijelaskan oleh Pierik (1988), meristem adalah sekelompok sel yang sedang membelah. Ada sel-sel yang bersifat meristematis dan dinamakan meristemoid. Keadaan seperti ini diperlukan dalam budidaya jaringan dimana jaringan nonmeristem terangsang menjadi bersifat meristem (Suryowinoto, 1990).

Auxin (IAA) dalam budidaya jaringan berperan dalam mempengaruhi perkembangan dan pembesaran sel, sehingga tekanan dinding sel terhadap protoplasma berkurang, hal ini mengakibatkan protoplast dapat mengabsorpsi air di sekitar sel, sehingga sel menjadi panjang terutama sel-sel di bagian maristem. Di sisi lain NAA dapat juga mendorong terbentuknya sejumlah sel yang cukup banyak tetapi tidak membelah, kumpulan dari sel ini yang disebut kalus. Kalus terbentuk karena terjadinya penumpukan sel-sel yang mengembang akibat dari masuknya air, unsur hara dan ZPT ke dalam sel, semua bahan tersebut tidak dapat disebarkan ke seluruh tubuh tanaman seperti akar, batang, dan daun, sehingga berkumpul di satu titik.

Menurut Wetter & Constable (1991), bahwa jaringan muda umumnya membentuk kalus. Pernyataan ini didukung oleh Gunawan (1987), bahwa bagian

Tabel 3. Peringkat data terkoreksi pertumbuhan eksplan endosperm ulin

Perlakuan IAA + kinetine	Ulangan				Total	Rata-rata
	I	II	III	IV		
..... ppm						
1,0 + 10,0	12	3	6,5	14	35,5	8,875
2,0+ 9,0	2	26	29	21,5	78,5	19,625
3,0 + 8,0	16,5	26	9,5	21,5	73,5	18,375
4,0 + 7,0	24	34	14,5	28	100,5	25,125
5,0 + 6,0	39	40	37	36	152,0	38,000
6,0 + 5,0	35	33	38	32	138,0	34,500
7,0 + 4,0	30,5	4,5	9,5	21,5	66,0	16,500
8,0 + 3,0	30,5	4,5	9,5	21,5	66,0	16,500
9,0 + 2,0	16,5	26,5	9,5	21,5	74,0	18,500
10,0 + 1,0	1	18	6,5	14,5	40,0	10,000
Total	207	215,5	169,5	232	824,0	
Rata-rata	20,7	21,55	16,95	23,2	20,6	

Tabel 4. Rata-rata jumlah kalus dan waktu tumbuh kalus eksplan endosperm ulin

Konsentrasi : IAA + Kinetine (ppm)	Jumlah Kalus ppm	Waktu Terbentuk Kalus (hari)
1,0 + 10,0	2,25a	159,75b
2,0+ 9,0	1,75a	162,00b
3,0 + 8,0	1,50a	160,50b
4,0 + 7,0	1,50a	164,75b
5,0 + 6,0	2,50b	147,75a
6,0 + 5,0	1,75a	149,25a
7,0 + 4,0	1,25a	160,75b
8,0 + 3,0	1,25a	162,25b
9,0 + 2,0	1,75a	164,50b
10,0 + 1,0	1,25a	163,25b

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti huruf yang sama tidak berpengaruh nyata pada $p=0,05$

tanaman seperti embrio muda, hipokotil, kotiledon, dan batang muda (bagian maristem) merupakan bagian yang mudah menghasilkan kalus. Hal ini terbukti pada semua perlakuan budidaya jaringan kemiri yang berasal dari maristem dapat membentuk kalus, karena pada jaringan muda terdapat hormon auksin yang dapat merangsang terbentuk kalus.

Kinetine berperan dalam mendorong morfogenesis sel. Proses perpanjangan sel (fase G1 dalam pertumbuhan sel) berlangsung baik karena terpenuhi kebutuhan nutrisinya. Adanya kinetine yang ditambah pada media tumbuh mengakibatkan fase transkripsi dan translasi RNA berlangsung lebih giat, yang selanjutnya akan bertambah giat memasuki fase pembesaran sel (G2) ke fase pembelahan sel (Duncan & Widhom, 1990 dalam Wijayani, 2002).

Proses pertumbuhan jaringan pada stadia kultur merupakan proses yang bertahap dari sel sebagai satu kesatuan terkecil dari jaringan yang mengadakan proses yang berhubungan dengan aktivitas hidup seperti metabolisme, tumbuh, berkembang, berkembang biak, dan perangsangan (Soeryowinoto, 1990).

Menurut Stepan & Sarkissian (1990) morfogenesis jaringan yang dibudidayakan dipengaruhi oleh interaksi serta keseimbangan antara zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dari luar (eksogen) dan hormon tumbuh

yang dihasilkan sel itu sendiri.

Sitokinin merupakan turunan dari adenin, golongan ini berperan penting dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis. Interaksi dan perimbangan antara auxin dan sitokinin yang diberikan dalam medium dan yang diproduksi secara endogen oleh tanaman, menentukan arah perkembangan suatu kultur yang ditanam (Gunawan, 1987).

Auxin dan sitokin merupakan zat pengatur tumbuh yang biasanya dibutuhkan dalam media budidaya jaringan dan diberikan dalam konsentrasi yang sesuai dengan pertumbuhan yang diinginkan (Pierik, 1975). Murashige (1974) menyatakan bahwa auxin dan sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang kritis sehingga dalam penggunaannya harus hati-hati; perlu diteliti macam dan konsentrasinya. Penggunaan auxin dalam budidaya jaringan umumnya memberikan respon terhadap pemanjangan sel, pembentukan kalus, dan akar adventif, sedangkan pada konsentrasi tinggi mendorong pembentukan kalus saja.

Sitokinin digunakan untuk merangsang pembelahan sel, terutama bila ditambahkan bersama-sama dengan auxin. Konsentrasi 1,0 sampai 10,0 ppm mendorong pembentukan tunas adventif dan menghambat pembentukan akar. Pembentukan tunas

aksiler meningkat karena menurunnya dominansi apikal (Pierik, 1975).

Dijelaskan oleh Katuuk (1989) pada budidaya jaringan sitokinin berfungsi untuk mengatur pertumbuhan dan morfogenesis, sedangkan auxin dapat merangsang pembesaran sel dan pertumbuhan akar

Pemakaian sitokinin pada kadar 0,0191 ppm sampai 1,91 ppm cukup baik untuk menginduksi pembentukan tunas. Jika pembentukan tunas sudah diinduksi pada eksplan atau kalus tanpa produksi akar sekaligus. Pembentukan akar akan diinduksi lebih mudah pada medium dengan kadar NAA atau 0,0186-0,93 mg/l, selanjutnya dijelaskan pula oleh Gunawan (1987), untuk pertumbuhan kultur pucuk *oncidium* perlu ditambahkan 0,5 mg NAA.

Nampaknya peranan auxin (IAA) dan sitokinin (BAP) pada media Murashige and Skoog pada alpukat dengan menggunakan eksplan endosperm aras konsentrasi yang baik untuk pembentukan planlet adalah 1,0 mg/l IAA dan 5,0 mg/l BAP (Hidayat, 2005)

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Aras konsentrasi (5,0 ppm IAA + 6,0 ppm Kinetine) dan (6,0 ppm IAA + 5,0 ppm Kinetine). Waktu tercepat dan jumlah kalus terbanyak diperoleh pada aras konsentrasi (5,0 ppm IAA + 6,0 ppm Kinetine).

Saran

Diperlukan adanya peneliti lebih lanjut terutama dengan membedakan asal eksplan seperti kotiledone dan endosperm serta penelitian sampai tingkat aklimatisasi planlet yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, A.D. 1987. *Induksi Kalus dan Difrensiasi pada Kultur Jaringan Gnetum Gnemon L.* Fak. Biologi UGM. Yogyakarta.
- Gardner, F.P., R.B. Pearce, & R.L. Mitchell. *Fisiologi Tanaman Budidaya.* Diterjemahkan oleh Susilo, H. 1991. UI-Press. Jakarta. 428 hal.
- Gunawan, L. W. 1987. *Teknik Kultur Jaringan.* Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. PAU-

Bioteknologi IPB. Bogor.

- Hendarko, S. 1982. *Komposisi Kimia Medium untuk Pertumbuhan Kalus Melinjo (Gnetum gnemon L.).* PPs-UGM. Yogyakarta
- Hidayat. 2005. Pemberian IAA dan BAP pada budidaya jaringan embrio alpukat. *Agripura* 1 (1): 38-46
- Huhn & J. Leon. 1995. Nonparametric analysis of cultivar performance trials: experimental results and comparison of different procedures based on ranks. *Agron. J.* 85: 627-632.
- Hussey, G. 1987. The application of tissue culture to the vegetative propagation of Plants. *Sci. Prog.:* 16-75.
- Katuuk, J. R. P. 1989. *Teknik Kultur Jaringan dalam Mikropopagasi Tanaman.* Depdikbud Dikti. Proyek Pengembangan Lembaga Pendidikan dan Tenaga Kependidikan. Jakarta.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiology.*
- Normah, M. N. 1992. Micropropagation of mangoesteen (*Garcinia mangostana L.*) through callus and multiple shoot formation. *Biotrop Spec. Publ.* 49: 81-85.
- Pierik, R. L. M. 1975. Callus multiplication of *Aunthurium andraenum L.* in liquid media. *Neth. J. Agric. Sci.:* 229.
- Rineksane, I. A. 2000. *Perbanyakan Tanaman Manggis Secara In-Vitro dengan Perlakuan Kadar BAP, Air Kelapa, dan Arang Aktif.* Tesis PPS-UGM. Yogyakarta. 69 hal.
- Suryowinoto, M. 1990. *Pemuliaan Tanaman Secara In vitro.* PPS-UGM. Yogyakarta :vi+ 354 hal.
- Wahyurini, E. 2002. Pengaruh bahan eksplan dan zat pengatur tumbuh terhadap pertumbuhan melati (*Jasminum sambac Ait*) secara in-vitro. *Agriwet* 6 (1): 13-22.
- Wijayani, A. 2002. Pertumbuhan kentang pada berbagai intensitas cahaya dan konsentrasi benzil amino purin. *Agriwet* 5 (2): 98-104.