

Perbanyak Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Dengan Teknik Kultur Jaringan Kombinasi IAA dan BAP

Propagation Of Tobacco Plants (Nicotiana tabacum) Using a Combination Of IAA And BAP Tissue Culture Techniques

Resti Yulia, Hafizhah Putrizalda, Annisa Afiah, Rada Armiliandi, Sari Rahma Pinta, Linda Advinda
Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang
Jalan Prof. Dr. Hamka, Air Tawar Padang, Sumatera Barat
Email : restiyulia03@gmail.com

ABSTRAK

Tembakau dengan nama latin *Nicotiana tabacum* adalah kelompok tumbuhan dari genus *Nicotiana*. Dengan semakin canggihnya teknologi dan banyaknya peminat tembakau, maka salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk perbanyak tanaman tembakau, yaitu kultur jaringan. Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman, seperti sekelompok sel atau jaringan yang ditumbuhkan dalam kondisi aseptik, sehingga bagian tanaman tersebut bisa dapat memperbanyak diri hingga tumbuh menjadi tanaman-tanaman yang baru kembali dengan sifat yang sama. Teknik kultur jaringan memanfaatkan prinsip perbanyak tumbuhan secara vegetatif. Penelitian ini bertujuan untuk melihat kualitas dan pengaruh kombinasi IAA dan BAP terhadap hasil kultur jaringan tanaman tembakau. Penelitian ini dilaksanakan di Ruang Kultur Jaringan, Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang selama 2 bulan. Penelitian ini disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan dan masing-masing dilakukan 10 kali pengulangan, yaitu IAA 0,5 ppm+BAP 1 ppm (A), IAA 0,5 ppm+BAP 2 ppm (B), IAA 0,5 ppm+BAP 3 ppm (C), IAA 1 ppm+BAP 1 ppm (D), IAA 1 ppm+BAP 2 ppm (E), IAA 1 ppm+BAP 3 ppm (F), dan kontrol (G). Hasil penelitian menunjukkan bahwa 18% eksplan berkalus, 65% eksplan yang terkontaminasi, dan 17% eksplan mengalami browning.

Kata Kunci: *Nicotiana tabacum*, kultur jaringan, IAA dan BAP, eksplan

PENDAHULUAN

Tembakau adalah kelompok tumbuhan dari genus *Nicotiana* yang daunnya biasa digunakan sebagai bahan baku dalam kegiatan merokok. Bahasa Indonesia tembakau merupakan serapan dari kata "*tabaco*" dari Bahasa Spanyol yang dianggap sebagai asal kata. Produksi tembakau terbesar berasal dari spesies *Nicotiana tabacum*, meskipun *Nicotiana rustica* juga digunakan di beberapa tempat. Bernardino de Sahagún merupakan orang pertama yang berhasil membedakan kedua spesies tersebut dalam *Kodeks Firenze* yang ditulis antara tahun 1540 dan 1585. Tembakau adalah produk pertanian semusim yang bukan termasuk komoditas pangan, melainkan komoditas perkebunan. Produk ini dikonsumsi bukan untuk makanan tetapi sebagai pengisi waktu luang atau "hiburan", yaitu sebagai bahan baku rokok dan cerutu.

Tembakau juga dapat dikunyah. Manfaat tembakau adalah mengobati gigitan serangga dan ular, mengobati flu, membantu dalam pengobatan mental, mempercepat produksi vaksin, potensinya sebagai obat herbal, sebagai sumber protein nabati, dan dapat dimanfaatkan untuk proses fitoremediasi.

Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk memperbanyak tanaman tembakau, yaitu kultur jaringan. Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman, seperti sekelompok sel atau jaringan yang ditumbuhkan dalam kondisi aseptik, sehingga bagian tanaman tersebut bisa dapat memperbanyak diri hingga tumbuh menjadi tanaman-tanaman yang baru kembali dengan sifat yang sama. Teknik kultur jaringan memanfaatkan prinsip memperbanyak tumbuhan secara vegetatif. Berbeda dari teknik memperbanyak tumbuhan secara konvensional, teknik kultur jaringan dilakukan dalam kondisi aseptik di dalam botol kultur dengan medium dan kondisi tertentu. Maka dari itu, teknik ini sering kali disebut kultur *in vitro*. Dikatakan *in vitro* (bahasa Latin), berarti "di dalam kaca" karena jaringan tersebut dibiakkan di dalam botol kultur dengan medium dan kondisi tertentu. Teori dasar dari kultur *in vitro* ini adalah *Totipotensi*. Teori ini memercayai bahwa setiap bagian tanaman dapat berkembang biak karena seluruh bagian tanaman terdiri atas jaringan-jaringan hidup. Oleh karena itu, semua organisme baru yang berhasil ditumbuhkan akan memiliki sifat yang sama persis dengan induknya.

Ada dua penggolongan media tumbuh: media padat dan media cair. Media padat pada umumnya berupa padatan gel, seperti agar, dimana nutrisi dicampurkan pada agar. Kultur jaringan menggunakan medium MS dengan kombinasi konsentrasi IAA dan BAP. BAP adalah salah satu sitokinin yang banyak dipakai dalam kultur jaringan. Zat pengatur tumbuh ini menunjukkan pengaruh yang beragam terhadap pembentukan tunas. Sebaliknya, IAA adalah salah satu jenis auksin, hormon ini dipakai untuk merangsang pembentukan akar. Sebelumnya telah dilakukan penelitian mengenai kultur jaringan dengan penambahan IAA dan BAP berdasarkan penelitian perlakuan IAA dan BAP berpengaruh nyata terhadap umur munculnya tunas. Eksplan yang ditanam pada media dengan konsentrasi auksin yang rendah dan sitokinin yang tinggi dapat menghasilkan pembentukan tunas yang baik, umur munculnya tunas dan jumlah tunas dibandingkan dengan media tanam dengan ZPT yang memiliki konsentrasi auksin tinggi dan sitokinin yang rendah. Hal ini diperkuat oleh Maryani, et al (2005) yang menunjukkan bahwa sitokinin (termasuk BAP) dan auksin (termasuk IAA) yang berperan saling melengkapi dalam menginduksi tunas. Berdasarkan uraian diatas, maka kami melakukan penelitian mengenai memperbanyak tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan teknik kultur jaringan menggunakan kombinasi IAA dan BAP untuk melihat kualitas dan pengaruh kombinasi IAA dan BAP terhadap hasil kultur jaringan tanaman tembakau.

METODE PENELITIAN

Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Ruang Kultur Jaringan, Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang. Penelitian dilakukan mulai bulan Oktober–Desember 2022.

Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 7 perlakuan dan masing-masing dilakukan 10 kali pengulangan. Diberikan perlakuan dengan kombinasi hormon tumbuh yaitu IAA 0,5 ppm+BAP 1 ppm (A), IAA 0,5 ppm+BAP 2 ppm (B), IAA 0,5 ppm+BAP 3 ppm (C), IAA 1 ppm+BAP 1 ppm (D), IAA 1 ppm+BAP 2 ppm (E), IAA 1 ppm+BAP 3 ppm (F), dan kontrol (G).

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah pisau scalpel, pinset, gelas ukur, cawan petri, botol selai, aluminium foil, mikropipet, *hot plate* dan *stirer*, *autoclave*, *plastic wrapping*, dan *Laminar Air Flow* (LAF). Bahan yang digunakan adalah daun tembakau, medium MS, agar swallow, sukrosa, tween-20, aquades, alcohol, bayclin, Indole Acetic Acid (IAA), Benzylamino Purin (BAP), plastik kaca, bakterisida, dan fungisida.

Pembuatan Larutan Stock

Larutan stock yang dibuat adalah larutan HCL 1 N sebanyak 100 ml, larutan KOH 1 N sebanyak 100 mL dan larutan bayclin 40%. Untuk pembuatan larutan HCL 1 N dilakukan dengan mengisi labu takar ukuran 1 Liter dengan akuades sebanyak 100 ml, lalu tambahkan 8,3 ml HCl pekat secara perlahan-lahan melalui dinding labu. Gojlok kemudian tambahkan akuades sampai tanda batas. Tunggu hingga dingin. Pindahkan larutan tersebut kedalam botol kaca dan beri label. Pembuatan larutan KOH 1 N sama dengan larutan HCL 1 N dibuat dengan mengisi labu takar namun ditambahkan 5,611 gr KOH pekat. Pembuatan larutan bayclin 40%, dilakukan dengan memasukkan bayclin 200 ml kedalam beaker glass, kemudian ditambahkan aquades 300 ml, digojlok hingga homogen.



Gambar SEQ Gambar_ ARABIC
1. Pembuatan Larutan Stock*

Sterilisasi Kertas Saring dan Aquades

Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 17,5 psi, selama 25 menit. Kertas saring dipotong menjadi seukuran cawan petri dan dimasukkan kedalam cawan petri. Aquades dimasukkan sebanyak 100 ml ke masing-masing botol, sebanyak 5 botol, lalu tutup menggunakan aluminium foil dan plastik wrap, lalu sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 17,5 psi selama 25 menit.



Gambar SEQ Gambar_ ARABIC 2. Sterilisasi kertas saring dan aquades*

Pembuatan Media Tanam

Pembuatan media dilakukan dengan mencampurkan 1,108 g MS instan, 7,5 g sukrosa, dan IAA dan BAP sesuai perlakuan ke dalam *beaker glass*, kemudian menambahkan aquades sebanyak lebih kurang 100 mL, dan mengaduknya hingga larut dengan batang pengaduk. Kemudian ditambahkan aquades hingga batas 250 mL, dan tetap dilakukan pengadukan larutan. Selanjutnya dilakukan pengukuran pH (5,6-5,8). Jika medium terlalu basah maka ditambahkan HCL 1 N, namun jika medium terlalu asam maka tambahkan KOH 1 N.

Selanjutnya ditambahkan 2 g agar ke dalam larutan, dipanaskan sampai larut sambil diaduk menggunakan batang pengaduk. Pemanasan dihentikan setelah larutan terlihat jernih. Tuangkan medium ke dalam botol-botol kultur dan ditutup dengan aluminium foil (plastik) dan diikat dengan karet gelang. Sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 17,5 psi, selama 25 menit. Setelah botol kultur dingin maka diletakkan ke ruang inkubasi. Diamati medium 1×1 minggu hingga minggu ke 2. Apabila tidak terjadi kontaminasi, maka medium dapat digunakan untuk prosedur berikutnya.

Sterilisasi eksplan

Sterilisasi dilakukan dengan menempatkan beberapa helai daun pada beaker glass. Mencuci eksplan dengan air mengalir dan dilakukan dengan menggojolknya, kemudian membuang air cucian tersebut. Selanjutnya, eksplan direndam dalam larutan campuran 1 gram bakterisida (Agrept 20WP) dengan 1 gram fungisida (Dithane M 45) yang ditambahkan aquades steril hingga mencapai 100 mL, digojlok hingga 10 menit. Setelah

membuang sisa larutan sterilan, dilakukan pembilasan eksplan dengan akuadest seril hingga 3 kali.

Selanjutnya *beaker glass* ditutup dengan aluminium foil untuk dimasukkan ke dalam ruang kultur (LAF). Sebelum memasukkan ke LAF, terlebih dahulu *beaker glass* disemprot dengan alkohol 70%. Sterilisasi dilanjutkan dengan merendam eksplan menggunakan larutan Bayclin 40% dan 3 tetes tween-20 selama 10 menit atau sampai pinggiran daun berwarna putih. Selanjutnya eksplan dibilas kembali dengan aquades steril hingga 3 kali pengulangan.



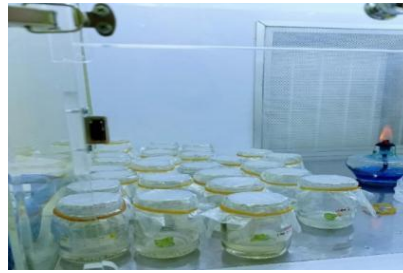
Gambar 5. Perendaman daun menggunakan fungisida dan bakterisida



Gambar 6. Sterilisasi dengan bayclin 40% dan tween-20

Penanaman Eksplan

Setelah daun disterilisasi, eksplan diambil menggunakan pinset, kemudian diletakkan di atas cawan petri steril yang sudah dialas dengan kertas saring steril. Selanjutnya, eksplan yang telah steril dipotong dengan ukuran 1×1 cm² dengan scalapel dan pinset steril. Potongan eksplan dimasukkan dalam botol medium (posisi bagian abaksial daun menghadap ke atas), kemudian ditutup kembali dengan aluminium foil, di-wrapping, dan diberi label. Botol kultur diletakkan di ruang kultur.



Gambar 7. Penanaman eksplan ke dalam media

Pemeliharaan Tanaman

Pemeliharaan dilakukan dengan menjaga kondisi ruang inkubasi tetap steril dengan penyemprotan alcohol 70% setiap hari dengan tujuan untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi.

Parameter pengamatan

Pengamatan dilakukan dua hari sekali setelah proses penanaman. Parameter pengamatan meliputi: jumlah tunas dihitung secara manual berdasarkan jumlah tunas yang mulai tumbuh dari eksplan yang ditanam dan tinggi tunas yang diukur secara manual menggunakan penggaris dari luar botol.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Eksplan tanaman tembakau ditumbuhkan berdasarkan kombinasi perlakuan ZPT yaitu menggunakan MS dengan menambahkan kombinasi konsentrasi IAA dan BAP yang berbeda. IAA adalah hormon auksin endogen yang disintesis dalam akar dan batang. Fungsinya adalah mengontrol proses fisiologi dan mengatur perpanjangan sel dalam batang maupun akar (Ekowahyuni, 2002). Mok *et al.*, (2002) melaporkan bahwa 6-benzyladenine (BAP) merupakan sitokinin tipe adenin yang meningkatkan pembelahan sel dan pembesaran pada sel kultur jaringan yang mampu merangsang pertumbuhan tunas planlet.

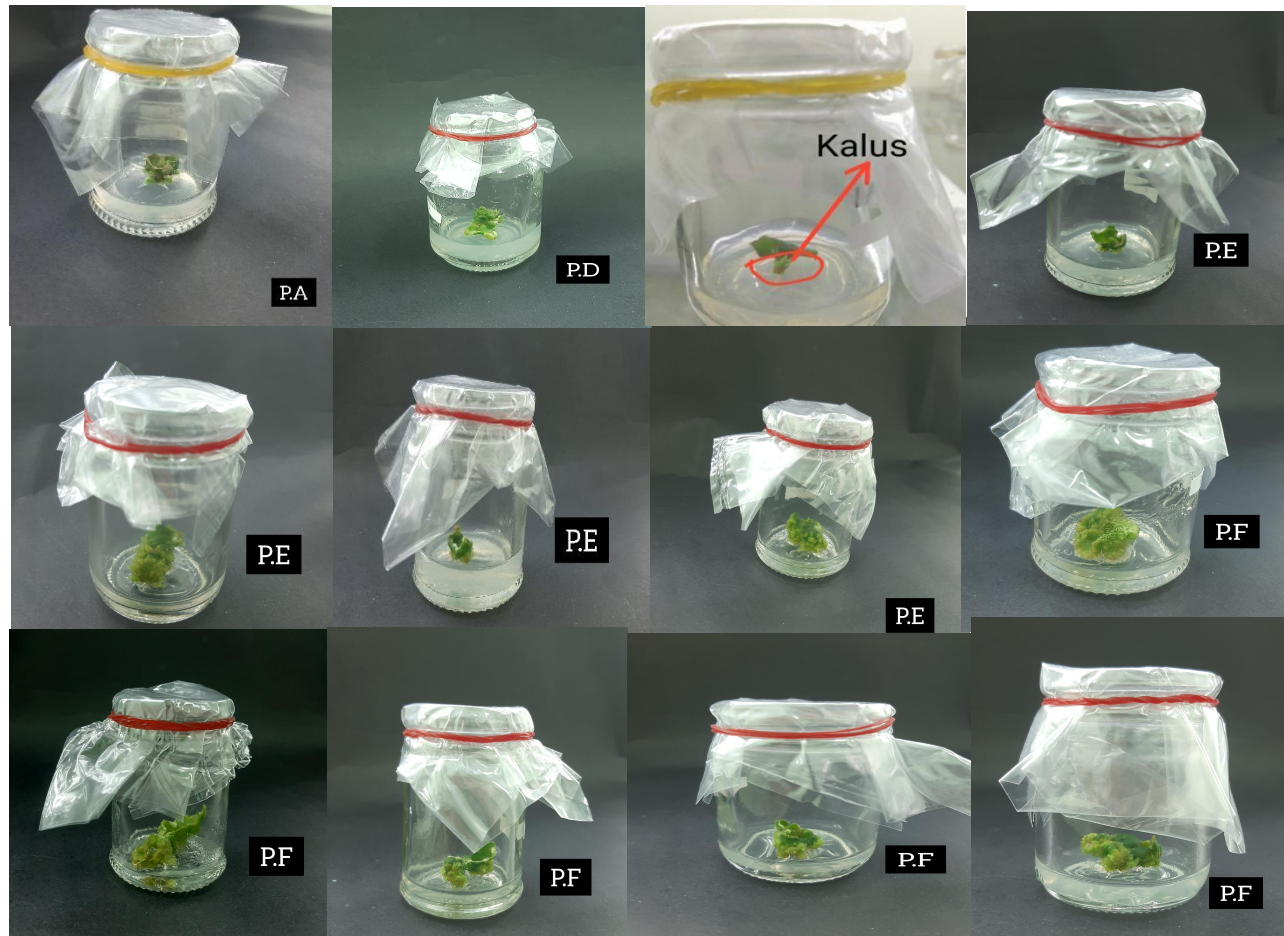
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, persentase hidup eksplan tanaman tembakau tidak dapat selalu dipertahankan. Kegagalan hidup eksplan terjadi pada masa awal penanaman. Eksplan dapat mengalami kontaminasi dan browning bahkan pada umur 7 HSI. Hasil pengamatan yang didapatkan setelah penanam eksplan tanaman tembakau yaitu 18% eksplan berkalus, 65% eksplan yang terkontaminasi, dan 17% eksplan yang mengalami browning. Menurut Zulkarnain (2009), kalus terbentuk dari keadaan dimana eksplan mengalami pelukaan pada proses penanaman, keadaan yang akan terjadi apabila kalus terbentuk yaitu pembengkakan dari eksplan tersebut. Karjadi dan Buchory (2008), mengatakan bahwa kontaminasi merupakan salah satu faktor yang

menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan pada kultur jaringan bahkan akibat terkontaminasi, eksplan dapat mati sebelum tumbuh menjadi plantlet. Penyebab terjadinya kontaminasi diduga akibat proses pengerjaan yang kurang steril ketika penanaman pada media kultur. Menurut Ru *et al.*, (2013), browning umumnya disebabkan oleh senyawa fenolik yang biasanya muncul dan terakumulasi ketika eksplan dilukai, yang biasanya disebabkan oleh aktivasi dari enzim Polyphenol oxidase (PPO). Pelukaan organ dapat menyebabkan terjadinya ketidak-seimbangan metabolisme dari ROS (Reactive Oxygen Species), peroksidasi pada membran lipid, dan kehilangan integritas membran sel yang dapat memicu over akumulasi dari senyawa fenolik dan menyebabkan terjadinya browning.

Tabel 1. Jumlah Eksplan Berkalus, Eksplan Terkontaminasi, dan Eksplan Browning Eksplan tanaman Tembakau pada Minggu ke-4.

Konsentrasi IAA+BAP	Eksplan Berkalus	Eksplan Terkontaminasi	Eksplan Browning
0,5 ppm+1 ppm	1	7	2
0,5 ppm+2 ppm	0	5	5
0,5 ppm+3 ppm	0	9	1
1 ppm+1 ppm	3	3	4
1 ppm+2 ppm	4	6	0
1 ppm+3 ppm	5	5	0
Kontrol	0	10	0
Total	13	45	12

Menurut Hidayat (2007), pertumbuhan kalus pada eksplan ditandai dengan munculnya tonjolan-tonjolan kecil yang mengakibatkan eksplan membengkak pada jaringan di sekitar luka ke bagian tengah eksplan, kemudian jaringan membesar dan mengembang serta bertambah banyak. Kalus yang mulai tumbuh ditandai dengan membengkaknya eksplan terutama bagian irisan eksplan yang bersentuhan langsung dengan media dan munculnya bintik-bintik berwarna putih, setelah itu teksturnya menjadi agak kasar seperti gambar berikut ini.



Gambar 8. Eksplan Berkalus (*Callus explants*)

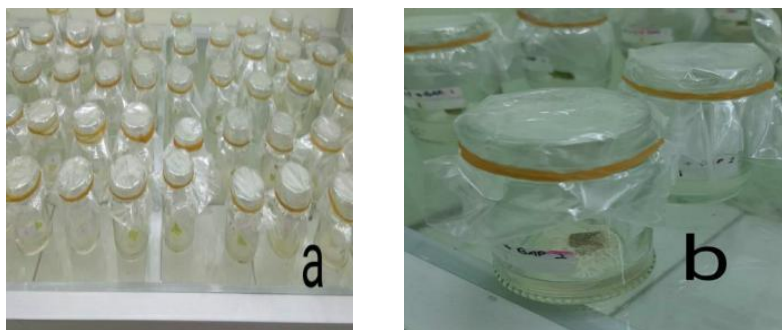
Berdasarkan penelitian ini, dapat dilihat pada gambar 8 kalus yang terbentuk berwarna hijau. Fatmawati (2008), berpendapat warna kalus menginduksi keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Selain berwarna hijau, juga terdapat kalus yang berwarna putih. Kalus yang berwarna putih mengindikasikan bahwa kalus belum mengandung klorofil. Menurut Ariati *et al.* (2012), kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Berjalannya pertumbuhan kalus maka akan diikuti dengan perubahan warna kalus (Rahayu, 2003).

Kalus yang terbentuk pada penelitian ini yaitu pada perlakuan konsentrasi IAA 1 ppm+BAP 1 ppm sebanyak 3 buah, konsentrasi IAA 1 ppm+BAP 2 ppm sebanyak 4

buah, konsentrasi IAA 1 ppm+BAP 3 ppm sebanyak 5 buah, pada hari ke 7 HSI dan konsentrasi IAA 0,5 ppm+BAP 1 ppm sebanyak 1 buah, pada hari 14 HSI. Menurut Indah dan Ermavitalini (2013), terhambatnya pembentukan kalus dikarenakan hormon endogen dan eksogen yang terdapat pada eksplan tidak dapat merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat. Cepat lambat munculnya kalus dipengaruhi oleh kerja hormon auksin dan sitokinin endogen dan eksogen yang saling berkorelasi. Pengaruh zat pengatur tumbuh auksin maupun sitokinin eksogen bergantung pada konsentrasi hormon endogen dalam jaringan tanaman. Pemberian konsentrasi ZPT yang tidak tepat dapat menghambat pertumbuhan kalus pada eksplan. Kebutuhan akan auksin untuk menginduksi kalus tergantung kadar auksin endogen.

Eksplan Terkontaminasi

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, tingkat kegagalan hidup eksplan tanaman tembakau sangat rendah. Seperti yang dilihat pada tabel 1 diatas sekitar 65% eksplan tanaman tembakau tidak dapat dipertahankan karena terkontaminasi. Kontaminasi merupakan salah satu penyebab dari kegagalan eksplan. Fitriani *et al.* (2019), melaporkan bahwa kontaminasi yang disebabkan oleh mikroorganisme yang hidup didalam sel tanaman atau ruang antar sel sangat sulit diatasi dengan sterilisasi permukaan. Kontaminan yang menginfeksi permukaan eksplan akan memberikan respon dalam kurun waktu 48 jam, namun kontaminan yang bersifat internal akan terlihat lebih lambat yaitu sebulan atau lebih setelah inisiasi. Mikroorganisme dapat masuk pada saat proses penanaman maupun pemeliharaan. Udara sebagai pembawa bahan partikulat, debu, dan tetesan air dapat sebagai tempat tumbuh bakteri.



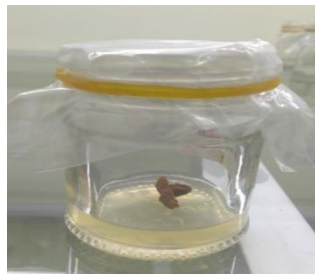
Gambar 9. Eksplan tanaman tembakau yang terkontaminasi oleh jamur (a) dan bakteri (b)

Berdasarkan gambar 9 diatas dapat dilihat, kontaminasi pada penelitian ini menunjukkan bahwa sumber kontaminan pada eksplan disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Kontaminasi berasal dari kontaminan eksternal baik berupa jamur maupun bakteri, begitu pula kontaminan internal yang pada umumnya berasal dari bakteri dan

jamur yang tumbuh di dalam jaringan tanaman. Menurut Wojtania dan Pulawska (2005), kontaminasi yang disebabkan oleh jamur menginfeksi eksplan kultur jaringan tanaman tembakau ditandai dengan ciri berwarna putih dan membentuk benang-benang halus serta menyebar hingga menutupi permukaan eksplan dan media tanam. Selain itu kontaminasi yang disebabkan oleh jamur juga menunjukkan warna putih kelabu hitam yang merupakan jenis *Mucor* dan *Rhizopus* Berdasarkan penelitian Susilowati *et al.*, (2001), hampir 80 % dari kultur *in vitro* yang diamati terserang kedua cendawan ini. Karakteristik morfologi yang ditunjukkan, yaitu hifa berbentuk benang berwarna putih hingga kelabu hitam, bagian tertentu tampak sporangium dan sporangiospora berupa titik-titik hitam seperti jarum pentul. Sumber kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri menunjukkan ciri-ciri terbentuknya lapisan lendir berwarna putih dan lendir berwarna putih kecoklatan di bagian permukaan media yang terkontaminasi.

Eksplan Browning

Selain karena terkontaminasi, eksplan tanaman tembakau juga tidak dapat dipertahankan karena media berubah warna menjadi kecoklatan (browning). Seperti yang terlihat pada tabel 1 sekitar 17% media eksplan tanaman tembakau yang mengalami browning. Dapat dilihat pada gambar 3 berikut ini.



Gambar 10. Eksplan tanaman tembakau yang mengalami browning

Pencoklatan (browning) pada media merupakan perubahan yang terjadi pada media yang berubah menjadi coklat (browning) setelah membenamkan eksplan ke dalam media yang selanjutnya dapat menghambat pertumbuhan dan akhirnya menyebabkan kematian jaringan. Browning di sebabkan oleh eksudasi senyawa fenolik dari jaringan eksplan. Senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder terbanyak yang terdapat pada jaringan tanaman. Senyawa fenolik tersebut terekudasi dari jaringan tanaman akibat luka irisan baik ketika eksplan diambil dari tanaman donor maupun ketika preparasi jaringan eksplan.

Brault (1999) menyebutkan sitokinin merupakan komponen penting yang terlibat dalam mengontrol perkembangan tunas. Pada level sel sitokinin berperan sebagai pengontrol banyak ekspresi gen, perkembangan kloroplas, dan sintesa metabolit

sekunder. Sitokinin juga berperan dalam pertumbuhan tunas adventif pada kultur jaringan. Skoog and Miller, (1957) dalam Kieber (2002) mengatakan sitokinin terlibat dalam berbagai aspek pada pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Dalam perkembangan seluler auksin berperan dalam meningkatkan aktivitas pembelahan sel. Auksin memiliki peranan yang penting dalam inisiasi akar pada kultur in vitro, hal ini dijelaskan oleh (Woodward, 2005) bahwa auksin berperan dalam memicu pembentukan akar lateral dari kalus yang belum terdiferensiasi.

Rasio sitokinin dan auksin menentukan morfogenesis yang terjadi pada kultur kalus in vitro. Kalus yang ditempatkan pada media dengan rasio sitokinin lebih tinggi dari pada auksin biasanya menghasilkan banyak tunas dan sedikit akar sedangkan kalus yang ditempatkan pada media dengan rasio auksin lebih tinggi dari pada sitokinin akan menghasilkan akar lebih banyak dari pada tunas. Eksplan yang diinokulasikan pada media dengan rasio sitokinin dan auksin seimbang akan menghasilkan proliferasi kalus.

George (1999) mengemukakan bahwa rasio auksin yang lebih tinggi pada medium akan memicu pertumbuhan kalus dan menginisiasi terbentuknya akar. Interaksi antara sitokinin dan auksin berperan dalam mengontrol banyak aspek pertumbuhan dan diferensiasi sel. Ketika dikombinasikan dengan auksin, sitokinin memicu diferensiasi dan perkembangan sel, organ, dan seluruh bagian tanaman. Secara umum, rasio sitokinin yang tinggi dari pada auksin akan memicu terbentuknya tunas dan pada medium dengan konsentrasi sitokinin yang rendah tidak mampu membuat kalus terdiferensiasi (Lee, 2002). Hal inilah yang menyebabkan akar tidak tumbuh pada medium dengan penambahan auksin. Menurut Minocha cit. Suyadi (2003) dalam Maryani (2003) apabila kondisi auksin dan sitokinin endogen berada pada kondisi sub optimal, maka diperlukan penambahan auksin dan sitokinin secara eksogen, sehingga diperoleh perimbangan auksin dan sitokinin optimal.

Solusi Agar Tidak Terjadi Kontaminasi Pada Eksplan Daun Untuk Penelitian Selanjutnya

Kesulitan perbanyak tumbuhan yang terkontaminasi mikroorganisme dengan kultur jaringan, yaitu bagaimana mematikan atau menghilangkan mikroorganisme dengan bahan sterilisasi tanpa mematikan tumbuhan (eksplan) (Darmono, 2003). Menurut Gunawan (1987) bahan-bahan sterilisasi yang biasa digunakan umumnya bersifat toksik terhadap jaringan. Melihat hal tersebut konsentrasi sterilan harus diperhatikan agar bisa menghilangkan kontaminan tetapi tidak merusak atau mematikan eksplan.

Berbagai cara sterilisasi telah banyak dilakukan oleh peneliti maupun pelaksana kultur in vitro dengan menggunakan berbagai macam cara yang diharapkan efektif untuk menghilangkan sumber kontaminan yang terdapat dalam eksplan. Kombinasi bahan sterilan dan waktu perendaman yang tepat merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan sterilisasi. Ada berbagai bahan kimia sterilant yang

dibutuhkan untuk sterilisasi eksplan yaitu natrium hipoklorit (NaClO), Sodium hipoklorit (klorox), merkuri khlorit (Sublimat), detergent dan alkohol 70% (Shofiyani dan Hajoeningtjas, 2010). Berdasarkan dari penelitian sebelumnya pada sterilisasi daun tanaman kemiri dengan perlakuan NaClO 1% dengan lama perendaman 2,5 menit terbukti mampu menurunkan kontaminasi hingga 0% (Lutfiyani, 2018). Fauzan et al.(2017) menyatakan pada penelitiannya perlakuan HgCl_2 300 mg/L merupakan konsentrasi terbaik untuk sterilisasi kultur tunas samping jati yang dapat menghasilkan kultur dengan tingkat aseptik tertinggi yaitu sebanyak 85%. Menurut Suratman et al. (2013) Pemberian bahan sterilisasi NaClO 3 % selama 5 menit yang dikombinasikan dengan HgCl_2 0,1 % selama 5 menit memberikan hasil yang terbaik dalam menekan persentase terkontaminasi pada eksplan daun.

Sehingga untuk penelitian selanjutnya metode sterilisasi untuk penelitian ini dapat menggunakan macam-macam jenis bahan sterilisasi, yaitu kaporit, alkohol 70%, HgCl_2 , dan Dithane. Pada jenis sterilan tersebut masuk kedalam bahan kimia desinfektan. Desinfektan sendiri adalah bahan kimia yang digunakan untuk membunuh atau menurunkan jumlah mikroorganisme penyebab kontaminasi yang tidak diharapkan, misalnya bakteri, jamur, dan virus (Rismana, 2002). Dalam penggunaan bahan kimia desinfektan sebagai bahan sterilisasi memiliki mekanisme pengaruh terhadap mikroorganisme kontaminasi masing-masing dari setiap jenis bahan kimia desinfektan tersebut. Mekanisme pengaruh kaporit terhadap terhadap kontaminan, yaitu dengan melepaskan ion klorin yang mampu membunuh mikroorganisme dengan cara mengoksidasi sel membran sehingga akan merusak sel mikroorganisme tersebut (Estrela, 2002). Mekanisme pengaruh alkohol terhadap kontaminan, yaitu denaturasi sel protein mikroorganisme dengan cara merusak atau memecah struktur protein pada mikroorganisme (Adji, 2007). Mekanisme pengaruh HgCl_2 terhadap kontaminan, yaitu dengan melepaskan ion Hg^{2+} yang dapat menyebabkan pengaruh toksik pada proses presipitasi protein sehingga menghambat aktivitas enzim yang akan bertindak sebagai bahan yang bersifat korosif (Alfian, 2006). Mekanisme pengaruh fungisida Dithane terhadap kontaminasi, yaitu bahan aktif yang terkandung didalamnya adalah mankozeb yang dapat mencegah infeksi jamur dengan menghambat perkecambahan spora yang menempel dipermukaan tanaman (Djojsumarto, 2004).

PENUTUP

Kesimpulan

Berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan, didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Persentase hidup eksplan tanaman tembakau tidak dapat selalu dipertahankan, sehingga terjadi kegagalan hidup eksplan pada masa awal penanaman.
2. Eksplan mengalami kontaminasi dan browning pada umur 7 HSI.

3. Hasil pengamatan yang didapatkan setelah penanam eksplan tanaman tembakau, yaitu 18% eksplan berkalus pada konsentrasi IAA 1 ppm+BAP 1 ppm, 65% eksplan yang terkontaminasi pada semua konsentrasi, dan 17% eksplan yang mengalami browning pada konsentrasi IAA 0,5 ppm+BAP 1 ppm, IAA 0,5 ppm+BAP 2 ppm, IAA 0,5 ppm+BAP 3 ppm, dan IAA 1 ppm+BAP 1 ppm.

REFERENSI

- Adji, Dhirgo. 2007. Perbandingan Efektivitas Sterilisasi Alkohol 70%, Inframerah, Otoklaf, dan Ozon terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus subtilis*. *Jurnal Sain Veteriner*. Vol 25, No 1. Hlm. 17-24.
- Alfian Z. 2006. Merkuri: Antara Manfaat Dan Efek Penggunaannya Bagi Kesehatan Manusia Dan Lingkungan. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam: Universitas Sumatera Utara, Medan
- Ariati, Sri N, Muslimin, Waeniati, Suwastika, dan Nengah. 2012. Induksi tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) pada media MS dengan penambahan 2,4-D, BAP dan air kelapa. *Jurnal Natural Science*. 1 (1) : 74-78.
- Darmono, D.W. 2003. *Menghasilkan Anggrek Silangan*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Estrela, C., Barbin E.L., Spano J.C., Marchesan, M.A., 2002. Mechanism of action of sodium Hypochlorite. *BrazDentJ*. 13(2):113-117.
- Fauzan, Y.S.A, Supriyanto, Tajuddin T. 2017. Efektivitas Merkuri Klorida ($HgCl_2$) Pada Sterilisasi Tunas Samping Jati (*Tectona Grandis*) In Vitro. *Jurnal Bioteknologi Biosains Indonesia*. Vol 4 No 2.
- Fitriani, Y., G. Wijana dan Darmawati, IAP. 2019. Teknik sterilisasi dan efektivitas 2,4-D terhadap pembentukan kalus eksplan daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth) in vitro. 8 (1): 41-52.
- Hidayat. 2007. Induksi pertumbuhan eksplan endosperm ulin dengan IAA dan Kinetine. *Agritrop*. 26 : 147 – 152.
- Indah PN, dan Ermavitalini, D. 2013. Induksi kalus daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada beberapa kombinasi konsentrasi BAP dan 2,4-D. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2 : 1-6.
- Karjadi dan Buchory 2008. Pengaruh komposisi media dasar, penambahan bap, dan pikloram terhadap induksi tunas bawang merah. *J Hortikultura*. 18(1): 1-9.

- Megasari, E., N. Hermita & S. Susiyanti. 2020. Respon perkecambah benih sintetik nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) terhadap pemberian konsentrasi alginat dan NAA sintetik tanaman. *Jurnal Agrista*. 24 (1): 12-18.
- Mok, M.C., R.C. Martin and D.W.S. Mok, 2002. Cytokinins: Biosynthesis Metabolism and Perception. In *Vitro Cell Dev. Biologyc. Plant*. 36(2):102- 107.
- Rahayu B, Solichatun, Anggarwulan, dan Endang. 2003. Pengaruh asam 2,4-diklorofenoksi asetat (2,4-d) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*. 1 (1) : 1-6
- Rismana, 2002. *Sanitasi dan desinfektan, langkah awal yang efektif mencegah penyakit*. Infomedia, Jakarta
- Ru, Z., Lai, Y., Xu, C., and Li, L. (2013). Polyphenol oxidase (PPO) in early stage of browning of *Phalaenopsis* leaf explants. *Journal of Agricultural Science*. 5(9). 57-64 .
- Sadat, Muhammad Sajali. dkk. 2018. Pengaruh IAA dan BAP Terhadap Induksi Tunas Mikro Dari Eksplan Bonggol Pisang Kepok (*musa paradisiaca*L). *Jurnal Agroteknologi* FP USU. 6(1): 107-112
- Suratman, Pitoyo, A. Mulyani, S. 2013. Keefektifan Penggunaan Bahan Sterilisasi Dalam pengendalian Kontaminasi Eksplan Pada Perbanyakan tanaman Sirsak (*Annona Muricata* L.) Secara In Vitro. *Jurnal Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta*
- Susilowati, A. dan S. Listyawati, 2001. Keanekaragaman jenis Mikroorganisme sumber kontaminasi kultur In Vitro di Sub Lab Biologi laboratorium MIPA Pusat UNS. *Biodiversitas*. Vol. 2, nomor 1. Hal 110-114.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman. Solusi Perbanyakan Tanaman Budi Daya*. Jakarta. BumiAksara