

INISIASI TUNAS KOKOLECERAN (*Vatica bantamensis*) PADA BERBAGAI JENIS MEDIA TANAM DAN KONSENTRASI BAP (*BENZYL AMINO PURINE*) SECARA *IN VITRO*

BUD INITIATION OF KOKOLECERAN (*Vatica bantamensis*) ON VARIOUS MEDIA AND CONCENTRATIONS OF BAP (*Benzyl Amino Purine*) IN *IN VITRO*

Sri Sudyanti, Tubagus Bahtiar Rusbana, Susiyanti

Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Sultan Ageng Tirtayasa
Jalan Raya Jakarta Km. 4 Serang-Banten

Korespondensi : susiyanti@untirta.ac.id

Diterima 16 Desember 2016 / Disetujui 29 Juli 2017

ABSTRAK

Kokoleceran (*Vatica bantamensis*) merupakan tanaman endemik Banten yang hanya ada di Ujung Kulon, dan telah ditetapkan sebagai tanaman identitas Provinsi Banten. Saat ini Kokoleceran terancam punah. Berdasarkan data dari IUCN sejak tahun 1998 tidak ada lagi penelitian mengenai tanaman ini. Inisiasi Kokoleceran memerlukan teknologi untuk mencegah dari kepunahan. Salah satu perbanyakan massal bisa melalui teknik *in vitro* kultur jaringan. Penelitian dilaksanakan dari November 2015 sampai Maret 2016 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa, Serang, Banten. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktorial. Faktor pertama yaitu media yang terdiri dari MS dan WPM. Faktor kedua yaitu konsentrasi BAP yang terdiri dari empat taraf, yaitu : 0 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹, dan 3 mg L⁻¹. Hasil menunjukkan bahwa penggunaan media yang berbeda dan konsentrasi BAP tidak berpengaruh pada waktu kemunculan tunas, jumlah tunas, dan jumlah. Namun, kedua perlakuan berpengaruh terhadap warna media dan pertumbuhan kalus pada eksplan.

Kata kunci : BAP, endemis, *in vitro*, kokoleceran (*Vatica bantamensis*), media

ABSTRACT

Kokoleceran (*Vatica bantamensis*) is an endemic plant of Banten which is only in Ujung Kulon, and has been designated as identity of Banten province. Now the existence of *Kokoleceran* has been endangered. Based on data from the IUCN, since 1998 there has been no research. *Kokoleceran* initiation needs technology for preventing from the extinction. One of the mass propagation is through the technique culture *in vitro*. This research aimed to get the precise medium and BAP concentration for *Kokoleceran*, and knowing the response of *Kokoleceran* growth in *in vitro*. This research was done in November 2015 until March 2016 at the Laboratory of Biotechnology, Department of Agroecotechnology, Faculty of Agriculture, University of Sultan Ageng Tirtayasa, Serang, Banten. This research used Completely Randomized Design (CRD) two factors. The first factor was medium that were MS and WPM media. The second factor was BAP concentration which consisted of four levels namely 0 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹, and 3 mg L⁻¹. The results showed that the use of different media and BAP

concentrations had no impact on the time appear of shoot, shoot number, and root number. There was effect from both treatments on medium color, and growing of callus on the explants.

Key words : BAP (*Benzyl Amino Purine*), endemic, *kokoleceran (Vatica bantamensis)*, medium

PENDAHULUAN

Provinsi Banten memiliki keanekaragaman hayati berupa flora dan fauna yang sebagian diantaranya bersifat endemik. Keanekaragaman tersebut memiliki potensi yang tinggi namun belum dapat dimanfaatkan dengan maksimal, bahkan kondisinya semakin mengalami tekanan sebagai akibat dari pencurian plasma nutfah, penyelundupan satwa, perambahan hutan dan kebun, perburuan liar, dan perdagangan flora/fauna yang dilindungi (DISHUTBUN Propinsi Banten, 2012).

Melihat potensi yang dimiliki dari keanekaragaman hayatinya berupa flora, Provinsi Banten memiliki berbagai macam flora khas, salah satunya yaitu tanaman kokoleceran (*Vatica bantamensis*). Menurut Whitten *et al.* (1996), tanaman kokoleceran merupakan tanaman endemik Banten yang hanya berada di Semenanjung Ujung Kulon dan berdasarkan Keputusan Menteri Dalam Negeri Nomor 522.53-958 Tahun 2010 tentang penetapan flora dan fauna identitas daerah provinsi, dimana kokoleceran ditetapkan sebagai flora khas yang menjadi identitas/maskot Provinsi Banten (BLHD, 2014).

Menurut *International Union for Conservation of Nature (IUCN)* pada tahun 1998, saat ini kokoleceran ditetapkan sebagai tanaman yang terancam punah. Habitat dan ekologi berada di hutan hujan tropis. Tanaman tersebut belum tersebar luas dan diketahui masyarakat secara umum, sehingga pemanfaatannya

masih sangat minim. Padahal jika melihat genus yang sama seperti resak hiru (*Vatica rassak*), kayu tanaman tersebut dapat digunakan sebagai bahan bangunan dan bahan pembuat kapal.

Berdasarkan data dari IUCN, sejak tahun 1998 belum ada penelitian lebih lanjut terhadap tanaman kokoleceran. Melihat kondisinya yang terancam punah, maka perlu adanya upaya pembudidayaan untuk mencegah kepunahan. Menurut Ashton (1996) sampai saat ini teknik budidaya tanaman kokoleceran yang diketahui hanya dengan budidaya yang dilakukan secara generatif yaitu menggunakan biji, sedangkan budidaya menggunakan biji memerlukan waktu yang cukup lama. Sehingga teknik budidaya yang paling memungkinkan dilakukan yaitu perbanyakan secara *in vitro*.

Perbanyakan secara *in vitro* adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplas, sel, jaringan, dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik. Sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali (Sandra, 2013).

Menurut Dixon dan Gonzales (2003) dalam Kusumawati *et al.* (2015), keberhasilan teknologi kultur *in vitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah penggunaan bahan tanam (sumber eksplan), ketepatan penggunaan media kultur dan penambahan zat pengatur tumbuh. Sumber eksplan menjadi syarat utama keberhasilan inisiasi. Menurut Uzun *et al.* (2014), bagian

tanaman yang dapat dijadikan sumber eksplan adalah pucuk muda, batang muda, daun muda, kotiledon, dan hipokotil.

Selanjutnya media kultur juga dapat menjadi penyebab tumbuh atau tidaknya suatu tanaman. Untuk mendapatkan pertumbuhan tanaman yang optimal dalam kultur jaringan, maka diperlukan media dengan komponen yang tepat. Media dasar yang diperuntukkan khusus tanaman berkayu yaitu media dasar *Woody Plant Medium* (WPM). Sedangkan menurut Kusumawati *et al.* (2015), ada media lain yang sering digunakan untuk perbanyakan sejumlah besar spesies tanaman yaitu Media *Murashige dan Skoog* (MS).

Zat pengatur tumbuh juga memegang peran yang penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Menurut Yuwono (2012), zat pengatur tumbuh dapat mendukung pertumbuhan suatu tanaman. Imelda *et al.* (2008) menyatakan bahwa sitokinin dan auksin merupakan zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan dalam kultur *in vitro*. Selanjutnya Mulyono (2010) menambahkan, auksin berfungsi untuk merangsang pembentukan akar sedangkan sitokinin berfungsi untuk merangsang tumbuhnya tunas-tunas aksilar.

Penggunaan sitokinin pada media kultur diharapkan dapat mengatasi masalah rendahnya laju pembelahan sel pada tunas tanaman. BAP (*Benzyl Amino Purine*) merupakan golongan sitokinin sintetik yang banyak digunakan dalam perbanyakan tanaman secara *in vitro*. Hal ini karena BAP mempunyai efektifitas yang cukup tinggi untuk perbanyakan tunas, mudah didapat dan relatif murah dibandingkan dengan golongan sitokinin lainnya (Yusnita, 2003).

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian yang berjudul inisiasi tunas kokoleceran pada berbagai jenis

media tanam dan konsentrasi BAP secara *in vitro* yang bertujuan untuk mendapatkan media tanam dan konsentrasi BAP yang sesuai untuk pertumbuhan tanaman kokoleceran secara *in vitro*.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan media tanam dan konsentrasi BAP yang sesuai untuk pertumbuhan tanaman kokoleceran secara *in vitro*, dan mengetahui respon pertumbuhan tunas kokoleceran pada berbagai jenis media tanam dan konsentrasi BAP secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2015 sampai Maret 2016 di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Sultan Ageng Tirtayasa Serang Banten.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, timbangan analitik, *laminar air flow cabinet* (LAFC), pH meter, botol kultur, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, *hand sprayer*, gelas ukur, gelas piala, erlenmeyer, pipet, skalpel, pinset, bunsen, cawan petri, *shaker*, *timer*, kompor, panci, pengaduk, lampu spiritus, corong, rak kultur yang dilengkapi dengan lampu neon sebagai sumber penyalinan, dan alat tulis.

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah eksplan yang berasal dari tunas tanaman kokoleceran, zat kimia penyusun media MS dan media WPM, zat pengatur tumbuh BAP dan IBA (*Indole Butyric Acid*), PVP (*Polivynilpirrolidone*), PPM (*Plant Preservative Mixture*), HCl 1 N, NaOH 1 N, air destilasi, alkohol 70%, alkohol 96%, natrium hipoklorit 10%, natrium hipoklorit 15%, tween, fungisida, bakterisida, antibiotik, deterjen, sukrosa, air destilasi,

bubuk agar-agar, kertas label, tisu, aluminium foil, dan plastik gulung.

Rancangan perlakuan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 2 faktor dengan 3 ulangan.

1) Faktor pertama adalah media tanam dengan 2 taraf konsentrasi yaitu:

A1 = Media MS

A2 = Media WPM

2) Sedangkan faktor kedua adalah zat pengatur tumbuh BAP dengan 4 taraf konsentrasi yaitu:

B1 = BAP 0 mg L⁻¹

B2 = BAP 1 mg L⁻¹

B3 = BAP 2 mg L⁻¹

B4 = BAP 3 mg L⁻¹

Percobaan terdiri dari 8 kombinasi perlakuan, tiap kombinasi perlakuan terdiri dari 3 ulangan, sehingga jumlah satuan unit percobaan adalah 24 satuan percobaan. Semua perlakuan diberi zat pengatur tumbuh IBA sebanyak 0,5 mg L⁻¹ untuk merangsang pertumbuhan akar.

Metode linier untuk rancangan ini adalah :

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

Dimana :

Y_{ijk} : Nilai pengamatan pada perlakuan media ke-i, konsentrasi BAP ke-j dan ulangan ke-k

μ : Nilai tengah umum

α_i : Pengaruh perlakuan media ke-i

β_j : Pengaruh konsentrasi BAP ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$: Pengaruh interaksi media ke-i dan konsentrasi BAP ke-j

\sum_{ijk} : Pengaruh galat perlakuan media ke-i, konsentrasi BAP ke-j dan pada ulangan ke-k

i : 1,2 (Taraf media)

j : 1,2,3,4 (Taraf konsentrasi BAP)

k : ulangan 1,2,3

bila hasil sidik ragam menunjukkan pengaruh nyata maka dilakukan uji lanjut dengan uji

DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) taraf 5 %.

Tahapan Kegiatan

Sterilisasi Alat dan Air

Peralatan berupa botol kultur, pinset, scalpel, cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer dan peralatan gelas lainnya disterilkan dengan cara dicuci dengan detergen kemudian direndam ke dalam larutan klorox selama 24 jam dan kemudian di panaskan menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C dengan tekanan 17,5 psi (*pounds per square inch*) selama 15 menit. Setelah tahapan sterilisasi, alat-alat seperti cawan petri, pinset dan scalpel disimpan di dalam oven dengan suhu 80°C sampai alat tersebut digunakan. Sedangkan untuk sterilisasi air, air di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C dengan tekanan 17,5 psi selama 30 menit.

Pembuatan Media Pra Kondisi

Air steril ±500 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer kapasitas 1000 ml, kemudian ditambahkan sukrosa sebanyak 30 g L⁻¹. Air steril ditambahkan kembali hingga larutan mencapai 1000 ml. Kemudian diberikan bubuk agar-agar sebanyak 7 g L⁻¹. Media dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya dimasukkan ke setiap botol kultur sebanyak ±25 ml. Botol kultur yang sudah berisi media ditutup aluminium foil dan direkatkan dengan plastik wrap. Botol kultur disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit pada tekanan 17,5 psi.

Pembuatan Media Perlakuan

Sebelum pembuatan media langkah awal yang perlu dilakukan adalah pembuatan larutan stok. Pembuatan media dimulai dengan mengambil larutan stok media MS atau WPM sesuai dengan perlakuan, air steril ±500 ml dimasukkan ke dalam

erlenmeyer kapasitas 1000 ml, masing-masing larutan stok tersebut diambil sesuai konsentrasi yang ditetapkan. Sukrosa ditambahkan sebanyak 30 g L⁻¹ ke dalam larutan, lalu larutan diaduk hingga menjadi homogen. Selanjutnya ditambahkan zat pengatur tumbuh IBA sebanyak 0,5 mg L⁻¹, PVP sebanyak 0,5 mg L⁻¹, PPM sebanyak 0,5 mg L⁻¹ dan zat pengatur tumbuh BAP sesuai dengan perlakuan yang dicobakan. Air steril ditambahkan kembali hingga larutan mencapai 980 ml dengan kondisi sedang diaduk. Setelah itu diatur pH hingga 5,7-5,8 dengan pH meter. Apabila larutan belum menunjukkan nilai pH tersebut, dilakukan penambahan beberapa tetes NaOH 1 N untuk menaikkan pH atau HCl 1 N untuk menurunkan pH. Selanjutnya ditambahkan kembali air steril hingga 1000 ml. Kemudian diberikan bubuk agar sebanyak 7 g L⁻¹ sebagai bahan pematid media. Media dipanaskan hingga mendidih. Larutan yang sudah dibuat dimasukkan ke setiap botol kultur sebanyak ±25 ml. Botol kultur yang sudah berisi media ditutup aluminium foil dan direkatkan dengan plastik wrap. Botol kultur disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit pada tekanan 17,5 psi.

Sterilisasi Eksplan

Tunas dicuci di air mengalir sambil dibersihkan menggunakan spons, kemudian direndam dengan larutan deterjen sebanyak 2 g L⁻¹ selama 5 menit dan dibilas hingga bersih dengan air steril. Selanjutnya direndam dengan tween selama 10 menit dan dibilas hingga bersih. Kemudian direndam dengan larutan fungisida, bakterisida dan antibiotik sebanyak 2 g L⁻¹ dengan penambahan tween ± 3 tetes, masing-masing direndam selama 1 jam dan dibilas hingga bersih. Sterilisasi berikutnya dilakukan di dalam LAFC dengan meng-

gunakan natrium hipoklorit 15% selama 10 menit dan 10% selama 15 menit serta alkohol 70% selama 1 menit, kemudian dibilas hingga bersih.

Penanaman

Kegiatan penanaman dilakukan di dalam LAFC yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol 70%. Lampu ultraviolet (UV) diaktifkan 30 menit sebelum LAFC digunakan. Alat-alat yang akan dimasukkan ke dalam LAFC disemprot dengan alkohol 70%. Alat logam seperti pinset dan scalpel direndam ke dalam alkohol 96% sebelum digunakan untuk memotong eksplan, lalu dipanaskan di atas bunsen yang menyala. Bagian ujung eksplan dipotong dengan pisau guna memperkecil kemungkinan adanya desinfektan yang terbawa dalam eksplan. Kemudian ditanam ke dalam botol yang telah terisi media pra-kondisi. Setelah penanaman, botol kultur ditutup dengan aluminium foil dan direkatkan dengan plastik wrap. Seluruh kegiatan penanaman dilakukan dekat pembakar bunsen. Setelah 6 hari, eksplan yang tidak terkontaminasi dipindahkan ke dalam media perlakuan.

Pemeliharaan

Ruang kultur harus selalu dalam keadaan aseptik dan harus dibersihkan setiap hari. Lantai ruangan dipel menggunakan pembersih lantai, sedangkan botol-botol kultur yang berisi tanaman disemprot dengan alkohol 70% setiap tiga hari. Suhu ruangan diatur pada kisaran 22°C-26°C. Sumber cahaya yang digunakan berasal dari lampu fluorescent 20 watt yang dipasang pada setiap rak kultur.

Variabel Pengamatan

1. Waktu Muncul Tunas (HST)

Diamati setiap hari untuk mengetahui waktu muncul tunas.

2. Jumlah Tunas (Buah)

Dihitung dengan menjumlahkan tunas yang tumbuh. Dilakukan setiap satu minggu sekali dimulai 1 MST sampai 12 MST.

3. Jumlah Akar (Buah)

Dihitung dengan menjumlahkan akar yang tumbuh. Dilakukan setiap satu minggu sekali dimulai 1 MST sampai 12 MST.

4. Warna Eksplan

Pengamatan dilakukan pada akhir pengamatan (12 MST) dengan mengamati secara visual. Penentuan warna eksplan ditetapkan berdasarkan scoring :

0 : hijau muda

1 : hijau kecoklatan

2 : coklat kehijauan

3 : coklat kekuningan

4 : coklat kehitaman

5. Presentase Terbentuknya Kalus (%)

Perhitungan dilakukan pada akhir pengamatan (12 MST). Dihitung dengan menggunakan rumus :

% Terbentuknya Kalus =

$$\frac{\text{Jumlah eksplan yang membentuk kalus} \times 100\%}{\text{Total eksplan}}$$

6. Presentase Media Browning (%)

Perhitungan dilakukan satu minggu sekali dimulai 1 MST sampai 12 MST. Dihitung dengan menggunakan rumus :

% Browning =

$$\frac{\text{Jumlah eksplan yang browning} \times 100\%}{\text{Total eksplan}}$$

7. Presentase kontaminasi (%)

Perhitungan dilakukan satu minggu sekali dimulai 1 MST sampai 12 MST. Dihitung dengan menggunakan rumus :

% Kontaminasi =

$$\frac{\text{Jumlah eksplan terkontaminasi} \times 100\%}{\text{Total eksplan}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tunas yang digunakan berasal dari tanaman kokoleceran yang berada di Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya-LIPI asal Semenanjung Ujung Kulon yang berumur ± 26 tahun. Eksplan ditanam pada media pra-kondisi sebelum ditanam pada media perlakuan. Penggunaan media pra-kondisi terbukti memberikan hasil yang lebih steril. Tingkat *browning* dan kontaminasi yang terjadi pada media perlakuan dengan pra-kondisi terlihat lebih rendah dibandingkan dengan media perlakuan tanpa pra-kondisi. Berikut disajikan eksplan pada media pra-kondisi (Gambar 1).



Gambar 1. Eksplan pada Media pra-kondisi

Kontaminasi menjadi kendala utama pada penelitian ini. Oduyayo *et al.* (2007) mengatakan bahwa kontaminasi mikroba merupakan permasalahan yang selalu ada dalam kultur jaringan. Selanjutnya eksplan mengalami stagnasi hingga 12 MST, selain dari pertumbuhan tanaman berkayu yang cukup lambat, eksplan juga diduga mengalami dormansi alami, sehingga pertumbuhannya sangat lambat. Tunas muda kokoleceran akan mengalami proses

penuaan terlebih dahulu, kemudian akan mengalami dormansi yang cukup lama sebelum terjadi pertumbuhan dan menghasilkan tunas baru.

Waktu Muncul Tunas

Formulasi media tanam dan konsentrasi BAP tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap waktu muncul tunas pada eksplan. Namun pada perlakuan media tanam MS dengan penambahan BAP sebanyak 3 mg L^{-1} terdapat tonjolan-tonjolan pada eksplan yang diduga merupakan calon tunas. Seperti yang diungkapkan oleh George dan Sherington (1984) dalam Yunita (2004), bahwa komposisi hara makro yang terkandung pada media MS sangat relevan untuk media awal pertumbuhan eksplan. Berikut disajikan calon tunas pada eksplan (Gambar 2).



Gambar 2. Bakal Calon Tunas

Tunas yang di kulturkan mengalami kelambatan dalam pertumbuhannya. Hendaryono dan Wijayani (1994) menyatakan, bahwa eksplan yang diambil dari tanaman dewasa (tanaman berkayu) mempunyai kemampuan mengadakan regenerasi yang sangat lemah. Menurut

Cerianingsih *et al.* (2015) pertumbuhan berbagai bagian tanaman mengalami periode-periode dimana pertumbuhan yang terjadi sangatlah sedikit atau tidak sama sekali yang disebut dengan dormansi.

Bila dilihat dari konsentrasi BAP yang diberikan, BAP belum banyak berperan dalam terbentuknya tunas. Pemberian BAP 1 mg L^{-1} - 3 mg L^{-1} membutuhkan waktu yang cukup lama untuk menghasilkan tunas baru. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan tidak responsif terhadap zat pengatur tumbuh yang diberikan.

Jumlah Tunas

Formulasi media tanam dan konsentrasi BAP tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah tunas pada eksplan. Pemberian BAP baik dalam media MS maupun media WPM, belum mampu menghasilkan jumlah tunas pada eksplan. Dewi (2014) menyatakan bahwa tanaman tahunan memiliki pertumbuhan yang relatif lambat. Menurut Seswita *et al.* (1996) dalam Lestari (2011), penggandaan tunas pada tanaman berkayu atau tanaman tahunan pada umumnya memerlukan zat pengatur tumbuh sitokinin dalam konsentrasi yang lebih tinggi berkisar antara $5\text{-}10 \text{ mg L}^{-1}$, untuk meningkatkan kemampuan proliferasi tunas dan kadang perlu ditambahkan auksin dalam konsentrasi yang rendah ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ - $0,3 \text{ mg L}^{-1}$).

Jumlah Akar

Formulasi media tanam dan konsentrasi BAP tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah akar pada eksplan. Dengan penambahan IBA $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, eksplan belum mampu menghasilkan akar baik pada media MS maupun media WPM. Menurut Lestari (2011), pada tanaman tertentu terjadi kesulitan dalam pembentukan akar.

Sehingga dibutuhkan konsentrasi auksin yang tepat untuk dapat memacu pertumbuhan akar.

Warna Eksplan

Warna eksplan diawali dari warna hijau muda, hijau kecoklatan, coklat kehijauan, coklat kekuningan hingga coklat kehitaman (Gambar 3).

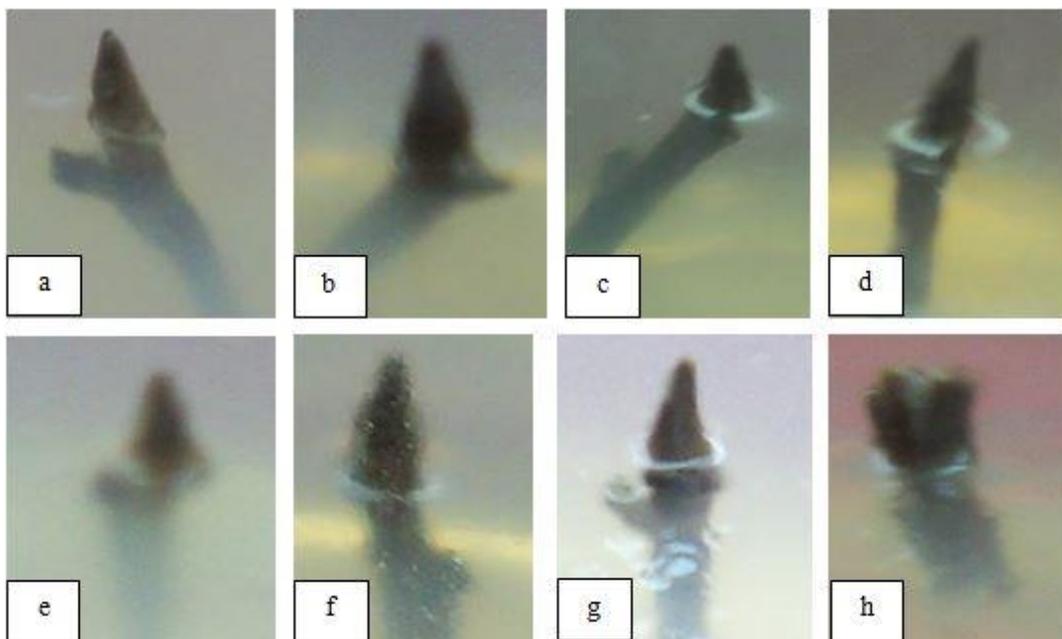
Perubahan warna eksplan menjadi kecokelatan merupakan salah satu indikasi terjadinya pencoklatan (*browning*) pada eksplan (Tabel 1). Menurut Hutami (2008), pencoklatan sangat umum terjadi pada spesies tanaman berkayu, terutama bila eksplan diambil dari pohon dewasa. Fitriani (2003) dalam Nisa dan Rodinah (2005) mendapatkan bahwa warna coklat pada eksplan menandakan sintesis senyawa fenolik. Pencoklatan ini sering membuat

tidak terjadinya pertumbuhan dan perkembangan eksplan.

Presentase Terbentuknya Kalus

Menurut Lina *et al.* (2013), kalus merupakan sel-sel yang belum terdiferensiasi, terbentuk di seluruh permukaan irisan eksplan sehingga semakin luas permukaan irisan eksplan, semakin cepat dan banyak kalus yang terbentuk.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa presentase eksplan terbentuk kalus sebesar 30% atau sebanyak 6 eksplan (Tabel 2). Kalus terbentuk pada umur 4 MST dan terdapat pada ujung eksplan yang sebelumnya telah mengalami pelukaan atau bekas irisan. Kalus yang terbentuk bermacam-macam, ada yang berwarna putih, putih kehijauan dan berwarna putih kecokelatan (Gambar 4).



Gambar 3. Penampilan dan warna dari eksplan kokoleceran pada berbagai media perlakuan: (a) A1B1. (b) A1B2. (c) A1B3. (d) A1B4. (e) A2B1. (f) A2B2. (g) A2B3. (h) A2B4.

Tabel 1. Warna Eksplan Kokoleceran

Perlakuan	Jenis Perlakuan	Skoring	Warna Eksplan
A1B1 (U1)	MS + BAP 0 mg L ⁻¹	3	Cokelat kekuningan
A1B1 (U2)		4	Cokelat kehitaman
A1B1 (U3)		3	Cokelat kekuningan
A1B2 (U1)	MS + BAP 1 mg L ⁻¹	3	Cokelat kekuningan
A1B2 (U2)		3	Cokelat kekuningan
A1B2 (U3)		3	Cokelat kekuningan
A1B3 (U1)	MS + BAP 2 mg L ⁻¹	3	Cokelat kekuningan
A1B3 (U2)		3	Cokelat kekuningan
A1B3 (U3)		3	Cokelat kekuningan
A1B4 (U1)	MS + BAP 3 mg L ⁻¹	3	Cokelat kekuningan
A1B4 (U2)		3	Cokelat kekuningan
A1B4 (U3)		3	Cokelat kekuningan
A2B1 (U1)	WPM + BAP 0 mg L ⁻¹	3	Cokelat kekuningan
A2B1 (U2)		3	Cokelat kekuningan
A2B1 (U3)		3	Cokelat kekuningan
A2B2 (U1)	WPM + BAP 1 mg L ⁻¹	4	Cokelat kehitaman
A2B2 (U2)		3	Cokelat kekuningan
A2B2 (U3)		3	Cokelat kekuningan
A2B3 (U1)	WPM + BAP 2 mg L ⁻¹	3	Cokelat kekuningan
A2B3 (U2)		3	Cokelat kekuningan
A2B3 (U3)		3	Cokelat kekuningan
A2B4 (U1)	WPM + BAP 3 mg L ⁻¹	3	Cokelat kekuningan
A2B4 (U2)		3	Cokelat kekuningan
A2B4 (U3)		3	Cokelat kekuningan

Keterangan :

A1 = Media MS

B1 = BAP 0 mg L⁻¹

B3 = BAP 2 mg L⁻¹

A2 = Media WPM

B2 = BAP 1 mg L⁻¹

B4 = BAP 3 mg L⁻¹

Tabel 2. Pengaruh Jenis Media Tanam dan BAP terhadap Presentase Terbentuknya Kalus pada Tanaman Kokoleceran

Perlakuan	Eksplan Awal	Eksplan Akhir	Eksplan Terbentuk Kalus	Eksplan Terbentuk Kalus
		--Σ--		--%--
A1 B1	3	2	1	50
A1 B2	3	3	0	0
A1 B3	3	2	1	50
A1 B4	3	3	1	33,33
A2 B1	3	3	1	33,33
A2 B2	3	3	0	0
A2 B3	3	3	1	33,33
A2 B4	3	1	1	100
Total	24	20	6	30

Keterangan :

A1 = Media MS

B1 = BAP 0 mg L⁻¹

B3 = BAP 2 mg L⁻¹

A2 = Media WPM

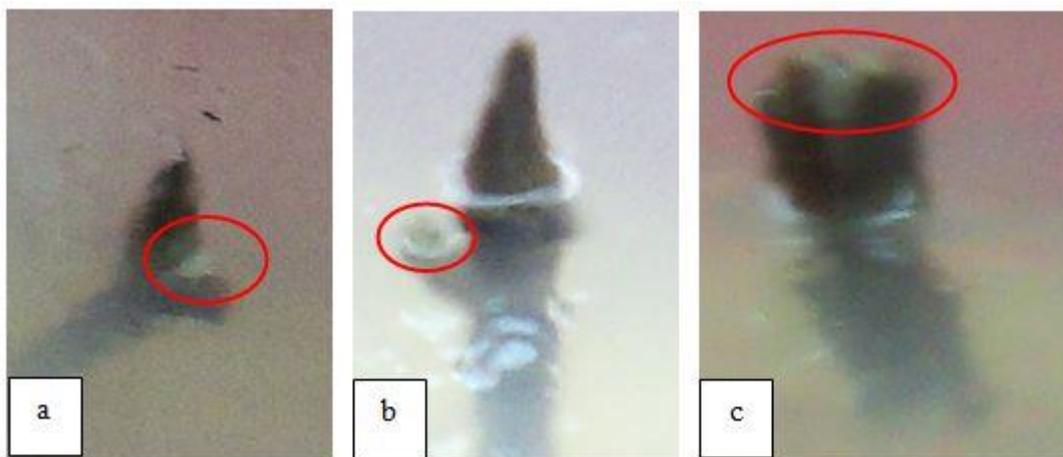
B2 = BAP 1 mg L⁻¹

B4 = BAP 3 mg L⁻¹

Pembentukan kalus yang terjadi disebabkan karena adanya penambahan zat pengatur tumbuh golongan auksin yaitu IBA sebanyak $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ke dalam media. Menurut George *et al.* (2008), auksin dapat digunakan untuk induksi kalus pada eksplan. Gunawan (1988) dalam Lidyawati *et al.* (2012) juga mengemukakan bahwa auksin berperan dalam mendorong pembelahan sel dan pembentukan kalus. Namun pertumbuhan kalus mengalami keterlamba-

tan dikarenakan kurangnya auksin yang diberikan.

Terdapat dua tipe kalus yang terlihat pada percobaan ini. Tipe pertama yaitu kalus putih kehijauan yang memiliki ciri-ciri struktur kalusnya kompak dan tumbuh secara berkelompok di salah satu sisi eksplan (kalus kompak). Kalus tipe dua berwarna putih kecoklatan, struktur kalusnya remah dan menyebar di seluruh permukaan eksplan (kalus remah).



Gambar 4. (a) Kalus berwarna putih. (b) Kalus berwarna putih kehijauan. (c) Kalus berwarna putih kecoklatan.

Presentase Media Browning

Pencoklatan (*browning*) pada media merupakan perubahan yang terjadi pada media yang berubah menjadi coklat (*browning*) setelah penanaman eksplan ke dalam media yang selanjutnya dapat menghambat pertumbuhan dan akhirnya menyebabkan kematian jaringan (Hutami, 2008). Hasil penelitian menunjukkan presentase media *browning* sebesar 75% atau sebanyak 14 media (Tabel 3).

Browning terlihat sejak awal penanaman (1 MST) di sekitar eksplan namun memudar setelah 2 MST dan mulai menyebar ke seluruh permukaan eksplan setelah 4 MST. *Browning* disebabkan

karena adanya senyawa fenol dari eksplan yang telah teroksidasi. Menurut Kosmiatin *et al.* (2005), beberapa macam tanaman khususnya tanaman berkayu mempunyai kandungan senyawa fenol yang tinggi yang teroksidasi ketika sel dilukai sehingga menghambat pertumbuhan eksplan.

Penggunaan media MS dan WPM memberikan pengaruh yang berbeda terhadap warna media. Seluruh media MS mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan (Gambar 5). Perubahan warna tersebut disebabkan karena fenol yang berada pada eksplan telah menyebar ke dalam media.

Tabel 3. Pengaruh Jenis Media Tanam dan Konsentrasi BAP terhadap Presentase Media Browning pada Tanaman Kokoleceran

Perlakuan	Media Awal	Media Browning	Media Browning
		--Σ--	--%--
A1 B1	3	3	100
A1 B2	3	3	100
A1 B3	3	3	100
A1 B4	3	3	100
A2 B1	3	0	0
A2 B2	3	3	100
A2 B3	3	0	0
A2 B4	3	3	100
Total	24	18	75

Keterangan :

A1 = Media MS

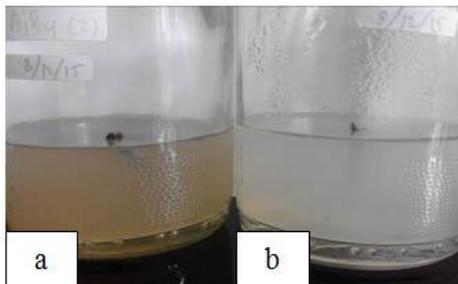
B1 = BAP 0 mg L⁻¹

B3 = BAP 2 mg L⁻¹

A2 = Media WPM

B2 = BAP 1 mg L⁻¹

B4 = BAP 3 mg L⁻¹



Gambar 5. Perbedaan warna media tanam.
(a) Media MS (b) Media WPM

Menurut Fauzi (2010), senyawa fenol umumnya dihasilkan oleh tanaman berkayu dan dikeluarkan ke medium bila jaringan tanaman tersebut ditumbuhkan. Sedangkan pada media WPM hanya sedikit yang mengalami perubahan warna hingga akhir pengamatan. Hal ini dikarenakan tingginya kandungan sulfur yang dimiliki oleh WPM. Menurut Goerge *et al.* (2008) sulfur memiliki kandungan yang bernama glutathion berfungsi sebagai antioksidan sehingga dapat mencegah terjadinya oksidasi.

Bhatt dan Dhar (2004) melaporkan bahwa *polivinilpirolidone* (PVP) 0,5% sangat efektif untuk menghilangkan

senyawa fenolat pada mikropropagasi *Myrica esculenta*. Namun pada penelitian ini PVP yang diberikan belum mampu menanggulangi senyawa fenol secara keseluruhan. Akibatnya eksplan serta media menjadi coklat.

Presentase Kontaminasi

Kontaminasi merupakan permasalahan yang selalu ada dalam kultur jaringan (Odutayo *et al.*, 2007). Hasil penelitian menunjukkan presentase eksplan terkontaminasi sebesar 16,67% atau sebanyak 4 eksplan (Tabel 4). Kontaminasi yang terjadi disebabkan karena eksplan yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari lapangan, kemungkinan bahan tanam tersebut lebih banyak mengandung berbagai kontaminan yang dapat dijumpai baik pada permukaan maupun dalam jaringan, sehingga kontaminasi mikroba pada eksplan tersebut belum berhasil dieliminasi sepenuhnya. Menurut Bausher dan Niedz (1998) *dalam* Dewanto (2014), pengontrolan kontaminasi mikroba sangat sulit dilakukan terutama untuk tanaman berkayu yang berasal dari lapangan.

Tabel 4. Pengaruh Jenis Media Tanam dan Konsentrasi BAP terhadap Presentase Kontaminasi pada Tanaman Kokoleceran

Perlakuan	Eksplan Awal	Eksplan Terkontaminasi	Eksplan Terkontaminasi	Keterangan
		--Σ--	--%--	
A1 B1	3	1	33,33	Jamur
A1 B2	3	0	0	
A1 B3	3	1	33,33	Bakteri + jamur
A1 B4	3	0	0	
A2 B1	3	0	0	
A2 B2	3	0	0	
A2 B3	3	0	0	
A2 B4	3	2	66,67	Jamur
Total	24	4	16,67	

Keterangan :

A1 = Media MS

B1 = BAP 0 mg L⁻¹

B3 = BAP 2 mg L⁻¹

A2 = Media WPM

B2 = BAP 1 mg L⁻¹

B4 = BAP 3 mg L⁻¹

Kontaminasi yang disebabkan oleh jamur ditandai dengan munculnya hifa yang berupa benang-benang halus yang berwarna putih, sedangkan kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri ditandai dengan munculnya lendir-lendir yang berwarna kekuningan. Jamur merupakan sumber kotaminan terbanyak dalam penelitian ini.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Penggunaan media tanam baik media MS maupun media WPM belum mampu menunjukkan hasil yang terbaik bagi pertumbuhan eksplan pada semua parameter.
2. Pemberian zat pengatur tumbuh BAP dengan konsentrasi 0, 1, 2, dan 3 mg/l dengan penambahan IBA 0,5 mg/l belum dapat memacu pertumbuhan tunas dan akar eksplan pada semua parameter. Namun memacu

pertumbuhan kalus pada beberapa perlakuan.

3. Tidak terdapat interaksi antara media tanam dengan zat pengatur tumbuh yang diberikan pada pertumbuhan eksplan.

Saran

1. Pengambilan bahan tanam (eksplan) kokoleceran sebaiknya dilakukan pada musim kemarau.
2. Perlu dicari kondisi terbaik bagi pertumbuhan tunas dan akar eksplan kokoleceran, antara lain penggunaan jenis, konsentrasi serta keseimbangan zat pengatur tumbuh yang tepat untuk memperoleh hasil yang optimal.
3. Perlu penelitian lanjutan dengan menggunakan berbagai jenis eksplan mengingat pertumbuhan kokoleceran dari eksplan tunas pucuk sangat lambat, sehingga membutuhkan waktu yang relatif lama untuk menumbuhkan tunas kokoleceran.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashton, P.S. 1996. *Vatica bantamensis* In: Plants Yielding Non-Seed Carbohydrates. *Prosea*. 9 p.364.
- _____. 1998. *Vatica bantamensis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.1. www.iucnredlist.org. [11 September 2015].
- Bhatt, I.D. and U. Dhar. 2004. Factor controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch.-Ham. ex. D. Don: A High Value Wild Edible of Kumun Himalaya. *African J. Biotechnology*. 3 (10) : 534-540.
- BLHD. 2014. Blhd.bantenprov.go.id. *Konservasi dan Rehabilitasi Kerusakan SDA*. <http://Blhd.bantenprov.go.id/> [2 November 2015].
- Cerianingsih, M.W., I.A. Astarini, dan I.G.M.O. Nurjaya. 2015. Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh *Indole-3-Butyric Acid* (IBA) Dan *6-Benzil Amino Purin* (BAP) Pada Kultur *In Vitro* Tunas Aksilar Anggur (*Vitis vinifera* L.) Varietas Prabu Bestari Dan Jestro Ag 86. *J. Metamorfosa*. Journal of Biological Sciences. II (1) : 1-8.
- Dewanto, M.W. 2014. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh BAP dan NAA Terhadap Pertumbuhan Tunas Ulin (*Eusideroxylon zwageri* T. et B.) secara *in Vitro*. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Dewi, P.S. 2014. Multiplikasi Tunas Tanaman Gaharu (*Aquilaria filaria*) Pada Media WPM dengan Penambahan Konsentrasi Kinetin dan NAA (*Naphtalene Acetic Acid*) secara *in Vitro*. *Skripsi*. Universitas Sultan Ageng Tirtayasa. Banten.
- DISHUTBUN Propinsi Banten. 2012. [11 September 2015]. Dishutbun.bantenprov.go.id
- Fauzi, A.R. 2010. Induksi Multiplikasi Tunas Ubi Kayu (*Mannihot esculenta* Crantz.) var. Adira 2 secara *in Vitro*. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- George, E.F., M.A. Hall, dan G.J.D. Klerk. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Springer. Netherlands.
- Hendaryono D.P.S., dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan, Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Secara Vegetatif*. Kanisius. Yogyakarta.
- Hutami, S. 2008. Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. *J. AgroBiogen* 4(2):83-88.
- Imelda, M., A. Wulansari., dan Y.S. Poerba. 2008. Regenerasi Tunas dari Kultur Tangkai Daun Iles-iles (*Amorphophallus muelleri* Blume). *J. Biodiversitas*. 9(3) : 173-176
- IUCN. 1998. Guidelines for Re-Introduction. Prepared by IUCN / SSC Re-introduction Specialist Group. IUCN, Gland, Swizerlland and Cambridge, UK., 10 pp. Kosmiatin, M., A. Husni, dan I. Mariska. 2005. Perkecambahan dan Perbanyak Gaharu secara *in Vitro*. *J. AgroBiogen*. 1(2):62-67
- Kusumawati, E., Y.P. Sari, dan T. Purnaningsih. 2015. Pengaruh NAA dan BAP Terhadap Inisiasi Tunas Mengkudu (*Morinda citrifolia*) secara *in Vitro*. *J. Budidaya Tanaman Perkebunan*. 1 (1)
- Lestari, E.G. 2011. *Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyak Tanaman melalui Kultur Jaringan*. *J. AgroBiogen* 7(1) : 63-68
- Lidyawati, N. N., Waeniati, Muslimin, dan I.N. Suwastika. 2012. Perbanyak Tanaman Melon (*Cucumis melo* L.) secara *in Vitro* Pada Medium MS dengan Penambahan *Indole Acetic Acid* (IAA) dan *Benzil Amino Purin* (BAP). *J. Natural Science* . 1 (1) : 43-52

- Lina, F.R., E. Ratnasari, dan R. Wahyono. 2013. Pengaruh 6-benzylamino purine (BAP) dan 6-furfuryl amino purine (Kinetin) pada Media MS Terhadap Pertumbuhan Eksplan Ujung Apikal Tanaman Jati secara *in Vitro*. *J. LenteraBio*. 2 (1) 57–61
- Mulyono, D. 2010. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Auksin: *Indole Butiric Acid* (IBA) dan Sitokinin: *Benzil Amino Purine* (BAP) dan Kinetin dalam Elongasi Pertunasan Gaharu (*Aquilaria beccariana*). *J. Sains dan Teknologi Indonesia*. 12 (1)
- Nisa, C., dan Rodinah. 2005. Kultur Jaringan Beberapa Kultivar Buah Pisang (*Musa paradisiaca* L.) dengan Pemberian Campuran NAA dan Kinetin. *J. Bioscientiae*. 2 (2) : 23-36
- Odutayo, O.I., N.A. Amusa, O. O. Okutade, and Y.R. Ogunsanwo. 2007. *Determination of the Source of Microbial Contaminants of Cultured Plant Tissues*. *Plant Pathology Journal*. 6 (1) : 77-81
- Sandra, E. 2013. *Cara Mudah Memahami dan Menguasai Kultur Jaringan*. IPB Press. Bogor.
- Uzun S, Ilbas AI, Ipek A, Arslan N, Barpete S. 2014. Efficient *in Vitro* Plant Regeneration From Immature Embryos of Endemic *Iris sari* and *I. schachtii*. *J. Agric. For*. 38: 348-353.
- Whitten, T., R.E. Soeriaatmadja, S.A. Afiff. 1996. *The Ecology of Indonesia Series Volume II : The Ecology of Java and Bali*. Periplus Editions (Hk) Ltd.
- Yunita, R. 2004. Multiplikasi Tunas Melinjo (*Gnetum gnemon*) secara *in Vitro*. *J. Sagu* 3(1) :1-8.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan: Cara Memperbanyak Tanaman secara Efisien*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Yuwono, T. 2012. *Bioteknologi Pertanian*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.