

## BAB II

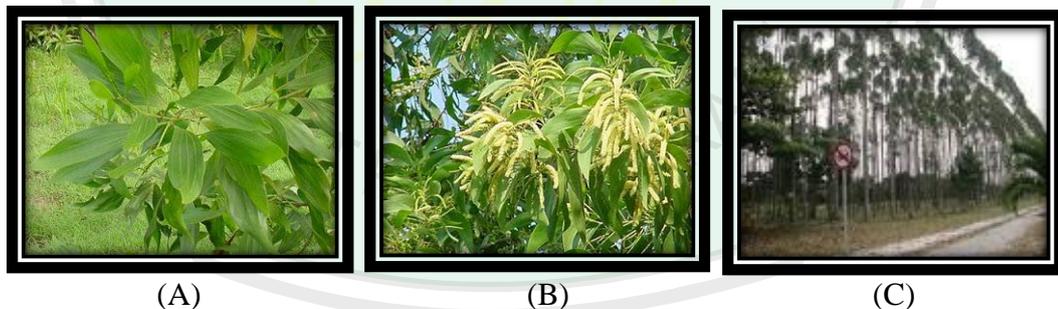
### KAJIAN PUSTAKA

#### 2.1 *Acacia mangium*

##### 2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi *Acacia mangium* menurut Tjiptrosoepomo (1988), adalah sebagai berikut:

Divisio : Magnoliophyta  
Classis : Magnoliopsida  
Ordo : Fabales  
Familia : Fabaceae  
Genus : *Acacia*  
Spesies : *Acacia mangium* Willd



Gambar 2.2.1 Tanaman *Acacia mangium*

Keterangan: (A) Daun *Acacia mangium*, (B) Bunga *Acacia mangium*, (C) Pohon *Acacia mangium* (Wijaya, 2011)

*Acacia mangium* termasuk famili fabaceae, genus *Acacia* meliputi lebih dari 1000 spesies pohon dan semak yang terapat di Afrika, Amerika, Asia dan Australia. Mangium merupakan spesies asli Indonesia, Australia, dan Papua New Guinea. Nama-nama lokal dari mangium antara lain adalah: mangle hutan (Seram),

nak (Maluku), laj (Aru), sedangkan di Australia dikenal dengan brown salwood, black wattle, dan di Papua New Guinea mempunyai nama arr (Turnbull, 1986).

Awang dan Taylor (1993) menyebutkan bahwa mangium pada mulanya mempunyai nama *Mangium montanum* Rumph, dalam Rumphius "herbarium amboinense" tahun 1750, kemudian diganti menjadi *Acacia* Sp, dalam spesies oleh C.L. Willd pada tahun 1986.

### 2.1.2 Karakteristik Morfologi

Pohon yang dewasa umumnya tumbuh mencapai tinggi 25-35 m dengan batang yang lurus, dan panjang batang bebas cabang dapat lebih dari setengah tinggi totalnya. Diameter setinggi dada (dbh) dapat mencapai lebih dari 60 cm, namun pada daerah atau tanah yang miskin hara, pohon biasanya berukuran lebih kecil dengan rata-rata tinggi 7-10 m. Pada waktu muda batangnya berwarna kehijau-hijauan, kulitnya halus pada batang bagian atas sedangkan pada bagian bawah berwarna kecoklat-coklatan dengan retakan-retakan mulai berkembang pada umur 2-3 tahun (Turnbull, 1986).

Daun *Acacia mangium* berupa phyllodia-phyllodia yang berukuran besar, mencapai panjang 25 cm dan lebar 10 cm serta berwarna hijau tua. Benih berwarna hitam dan berkilat dengan bentuk bertingkat dari longitudinal, elliptical, oval sampai oblong. Dengan ukuran panjang 3-5 mm dan lebar 2-3 mm. Benih tersusun secara longitudinal dan terkait pada kelopak (Fadjar, 1996).

Tahapan terbentuknya daun pada tanaman *Acacia mangium* dari anakan sampai dewasa adalah "pinnate-bipinnate-phyllode". Secara khas anakan yang

baru berkecambah dicirikan oleh adanya daun pinnate yang pertama dan yang kedua adalah bipinnate yang tersusun secara bergantian. Daun yang ketiga dan keempat adalah bipinnate. Daun-daun bipinnate (terbentuk pada minggu keempat atau kelima) sehingga daun memiliki petiole yang kecil dan rata. Pada minggu keenam, petiole berubah atau berkembang menjadi sebuah phyllodia penuh, membentuk daun-daun dewasa pada minggu ke Sembilan setelah perkecambahan (New, 1984).

### **2.1.3 Karakteristik Fisiologis**

Walaupun dianggap sebagai jenis yang selalu hijau mangium tidak tumbuh terus-menerus secara merata sepanjang waktu. Pengamatan secara fenologis dalam bulanan selama dua tahun pada mangium yang ditanam di enam tempat di Thailand, dengan kondisi iklim yang beragam, menunjukkan bahwa pertumbuhan yang pesat berlangsung sepanjang 12 bulan pertama setelah penanaman kemudian menurun untuk beberapa bulan pada tahun kedua. Pertumbuhan menurun atau berhenti sampai respon terhadap kombinasi curah hujan yang rendah dan suhu yang dingin pada bulan Januari-februari terjadi di Thailand. Pertumbuhan menjadi aktif pada bulan April sebelum musim hujan dimulai. Irama pertumbuhannya dicerminkan pada pola dalam kayu dengan penampakan cincin-cincin pertumbuhan (lingkaran tahun) terlihat pada penampang melintang batang (Atipanumpai, 1989).

Menurut Smit (1992), *Acacia mangium* sangat mudah beradaptasi dengan kondisi tempat tumbuh dan masih dapat tumbuh pada tanah yang tererosi, berbatu,

miskin mineral, cuaca yang sangat jelek dan alluvial. Hubungan simbiosisnya dengan bakteri pembentuk nitrogen dari genus *Rhizobium* memungkinkan tersedianya senyawa nitrogen pada pohon yang mencukupi untuk pertumbuhan. Hubungannya dengan jamur mycorrhiza (*Thelepora tamaroides*), yang telah diidentifikasi di Sabah, bahwa pohon dapat menyerap zat hara mikro dari tanah terutama fosfor.

Kemampuan *Acacia mangium* untuk tumbuh walaupun pada daerah atau tanah yang tidak produktif, membuatnya sebagai jenis yang menarik untuk penghutanan kembali (reforestation). Pada tanah yang bagus rata-rata kenaikan diameter dapat mencapai 3-4 cm/tahun. Di Sabah pada daerah berumput dan dangkal lapisan tanahnya serta berpasir, dilaporkan dapat menghasilkan 415 m<sup>3</sup>/hektar (Fadjar, 1996).

Pohon *Acacia mangium* tumbuh baik pada padang alang-alang, yang biasanya sulit untuk dihutankan kembali karena kondisi tanahnya yang tidak menguntungkan serta persaingan yang berat dengan alang-alang. Jenis ini dapat tumbuh pada tanah yang asam (Ph=4). Hal ini memberikan keuntungan utama dari mangium sebab tanah yang asam tersebut luas diseluruh daerah tropis. Pada tanah berkadar garam, jenis ini tidak disarankan untuk ditanam karena toleransinya yang rendah terhadap kadar garam.

## 2.2 Tempat Tumbuh

### 2.2.1 Penyebaran

Pohon *Acacia mangium* tumbuh secara alami di Maluku dengan jenis Melaleuca leucadendron. Selain itu terdapat pula di pantai Australia bagian utara, Papua bagian selatan (Fak-fak di Aguada (Babo) dan Tomage (Rokas, Kepulauan Aru, Maluku dan Seram bagian barat) (Leksono, 1996).

Penyebaran mangium di Indonesia menurut Turnbull (1989) meliputi daerah-daerah:

1. Irian Jaya

Wilayah merauke merupakan daerah penyebaran utama yang terkonsentrasi di bagian tenggara Irian Jaya dan merupakan sambungan daerah penyebaran dari Papua New Guinea. Penyebarannya tampak terbatas pada daerah sawanna dan hutan gugur monsoon. Daerah penyebaran lainnya terdapat di semenanjung Vogelkop yang terletak di daerah barat laut Irian Jaya (1°- 5° S, 111°- 134 ° E). Keberadaan mangium pada sejumlah tempat diketahui hanya dari koleksi spesimen herbarium yang kebanyakan dibuat pada periode colonial Belanda (Fadjar, 1996).

2. Maluku

Jenis dari *Acacia mangium* terdapat di tiga daerah utama, yaitu: kepulauan sula, pulau Seram, dan pulau Aru. Kepulauan Sura, terdiri dari pualau-pulau Taliabu, Mongole, dan Sasana (juga dinamakan Sulaibesi), yang membentuk kepulauan Sula. mangium dilaporkan terdapat di Taliabu, di daerah paling barat

pulau Sanana. Terdapat pada ketinggian permukaan air laut dibawah 50 m dpl, terdapat pada batas antara hutan-hutan dan daerah perladangan berpindah.

Keberadaan mangium di pulau Seram terdapat di daerah barat, yang ditunjukkan oleh sebuah koleksi specimen herbarium oleh Kuswate dan Soepodo pada tahun 1959. Sebuah eksplorasi dilaksanakan pada tahun 1979 di sekitar Piru di daerah barat daya pulau Seram, dilaporkan bahwa terdapat secara tersebar dan berasosiasi dengan *Melaleuca* spp. Berbatasan dengan daerah perladangan berpindah. Pohon-pohon terdapat dari ketinggian permukaan air laut sampai 300 m dpl. Curah hujan tahunan dilaporkan 2000 mm per tahun dengan musim kemarau yang jelas (Suratmo, 1980).

### **2.2.2 Persyaratan Tempat Tumbuh**

Tanaman *Acacia mangium* tidak memiliki persyaratan tumbuh yang tinggi, dapat tumbuh pada lahan miskin dan tidak subur. *Acacia mangium* dapat tumbuh baik pada lahan yang mengalami erosi, berbatu dan tanah Alluvial serta tanah yang memiliki pH rendah (4,2). Tumbuh pada ketinggian antara 30 - 130 m dpl, dengan curah hujan bervariasi antara 1.000 mm - 4.500 mm setiap tahun. Seperti jenis pionir yang cepat tumbuh dan berdaun lebar, jenis mangium sangat membutuhkan sinar matahari, apabila mendapatkan naungan akan tumbuh kurang sempurna dengan bentuk tinggi dan kurus (Leksono, 1996).

## **2.3 Manfaat**

### **2.3.1 Bidang Kultur Jaringan**

Manfaat yang diperoleh dalam penggunaan teknik kultur jaringan untuk pembudidayaan tanaman yaitu (Budiatmoko, 1998):

1. Membantu usaha penelitian pohon
2. Menghasilkan tanaman bebas virus dan penyakit/pathogen
3. Dapat dilakukan kapan saja (tidak tergantung musim dan iklim) karena dilakukan dalam laboratorium dan tidak membutuhkan lahan yang terlalu luas
4. Tingkat laju perbanyakan yang tinggi dalam waktu yang singkat
5. Hemat bahan baku karena hanya bagian kecil tanaman yang digunakan
6. Teknik ini merupakan sarana untuk mendapatkan produk sekunder tanaman dengan cepat dalam jumlah yang cukup besar.

### **2.3.2 Bidang Perkebunan**

Tanaman ini dapat ditanam di tanah yang kondisinya kurang menguntungkan (miskin hara, dan kondisi Ph yang rendah) selain itu tanaman mangium ini dapat tumbuh pada tanah yang tererosi untuk bisa ditanami.

### **2.3.3 Bidang Industri**

Kayunya bernilai ekonomi karena merupakan bahan yang baik untuk finis serta perabot rumah yang menarik seperti: lemari, kusen pintu, dan jendela serta baik untuk bahan bakar. Tanaman akasia yang berumur tujuh dan delapan tahun

menghasilkan kayu yang dapat dibuat untuk papan partikel yang baik, dan bubur kertas (*pulp*) yang berkualitas baik.

## **2.4 Kultur Jaringan**

### **2.4.1 Pengertian Kultur Jaringan**

Kultur jaringan adalah istilah umum yang ditujukan pada budidaya secara *in vitro* terhadap berbagai bagian tanaman yang meliputi batang, daun, tunas muda, akar, bunga, kalus, sel, protoplas dan embrio. Bagian-bagian tersebut yang diistilahkan seperti eksplan, diisolasi dari kondisi *in vivo* dan dikultur pada media buatan yang steril sehingga dapat beregenerasi dan berdeferensi menjadi tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009).

Menurut Wetherell (1982) bahwa sel atau jaringan tanaman pada dasarnya dapat ditanam secara terpisah dalam suatu kultur (*in vitro*). Sel dan jaringan yang ditanam dengan cara ini, memiliki kemampuan untuk regenerasi bagian-bagian yang diperlukan dalam upayanya untuk bisa tumbuh dengan normal, membentuk kembali menjadi tumbuhan yang utuh. Dengan kata lain bahwa di dalam masing - masing sel tumbuhan mengandung informasi genetik dan atau sarana fisiologis tertentu yang mampu membentuk tanaman lengkap bila ditempatkan pada lingkungan yang sesuai. Kemampuan inilah yang kemudian dikenal sebagai totipotensi.

Teknik kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan tanaman dengan metode mikropropagasi karena sebagian kecil saja dari tanaman yang digunakan untuk perbanyakan, terutama untuk jenis tanaman yang bisa diperbanyak secara

vegetatif. Tanaman ditumbuhkan dalam botol aseptik berisi media kaya hara yang tersedia langsung untuk pertumbuhan tanaman seperti zat hara makro, zat hara mikro, vitamin dan zat perangsang pertumbuhan (auksin dan sitokinin). Bahan tanaman yang ditumbuhkan disebut eksplan. Eksplan yang ditanam haruslah bebas dari organisme lain yang dapat mengganggu pertumbuhannya, mempunyai potensi regenerasi yang cukup tinggi dan mempunyai derajat pertumbuhan tinggi seperti sel gamet dan meristem. Terdapatnya organisme kontaminan yang hidup dalam media dapat menurunkan bahkan mematikan pertumbuhan eksplan. Hal ini merupakan masalah utama yang sering dihadapi (Saxena dan Dawan, 1996).

Teknologi kultur jaringan disebut pengembangan *in vitro* (secara harfiah berarti gelas) sebab pengembangannya dilakukan dalam gelas atau botol tertutup yang tembus cahaya dengan kondisi pertumbuhan yang diciptakan secara buatan untuk manipulasi berbagai kondisi lingkungan yang dibutuhkan. Teknik ini telah banyak digunakan terutama untuk tanaman komersial dan tanaman hias bahkan dewasa ini telah dikembangkan pula untuk tanaman-tanaman kehutanan. Perbanyakan melalui kultur *in vitro* sangat perlu untuk tanaman yang:

1. Persentase perkecambahan biji rendah
2. Tanaman yang unik
3. Perpohonan yang elit atau komersil

Berbeda dengan teknik perbanyakan vegetatif secara konvensional, teknik kultur jaringan melibatkan pemisahan sejumlah komponen biologis dan tingkat pengendalian yang tinggi untuk memacu proses regenerasi dan perkembangan eksplan. Setiap tahapan dari proses-proses tersebut dapat dimanipulasi melalui

seleksi bahan eksplan, medium kultur dan faktor-faktor lingkungan termasuk eliminasi mikroorganisme, seperti cendawan dan bakteri. Semua faktor-faktor tersebut dimanipulasi untuk memaksimalkan hasil yang dicapai dalam bentuk jumlah dan mutu propagula yang didapatkan (Zulkarnain, 2009).

Kultur jaringan terdiri atas beberapa tahap kegiatan. Profesor Murashige dari Universitas California membagi kultur *in vitro* dalam tiga tahap. Tahap I yang juga di sebut sebagai tahap persiapan eksplan, di mana eksplan dicucihamakan dan dibebaskan dari mikroorganisme, selanjutnya ditumbuhkan dalam media kultur dengan kondisi yang aseptik. Tahap II yaitu tahap penggandaan propagul dengan cara meningkatkan jumlah cabang asiler ataupun pembentukan tunas tunas baru. Tahap III adalah tahap pendewasaan lebih lanjut dari calon tanaman dengan merangsang pembentukan akar dan pertumbuhan (aklimatisasi). Tahap III ini juga disebut sebagai tahap penyesuaian atau tahap pra tanam (Wetherell 1982). Tahapan-tahapan ini kemudian disempurnakan oleh Wattimena (1992), menjadi 5 tahap, yaitu:

- 1) Seleksi tanaman induk
- 2) Pemantapan kultur aseptik
- 3) Produksi propagul
- 4) Persiapan planlet sebelum diaklimatisasi, dan
- 5) Aklimatisasi planlet

## 2.4.2 Faktor yang mempengaruhi kultur jaringan

Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan kultur jaringan adalah seleksi bahan tanaman (eksplan), teknik sterilisasi eksplan, komposisi medium dasar, keterlibatan zat pengatur tumbuh terutama auksin dan sitokinin, serta faktor-faktor lingkungan dimana kultur ditempatkan (Zulkarnain, 2009).

### 1. Seleksi Bahan Eksplan

Seleksi bahan eksplan yang cocok merupakan faktor penting dalam menentukan keberhasilan program kultur jaringan. Oleh karena itu, Pierik (1997), mengemukakan tiga aspek utama yang harus diperhatikan dalam seleksi bahan eksplan, yaitu genotip, umur, dan kondisi fisiologis bahan tersebut.

Walaupun tanaman dapat diperoleh dari sejumlah besar genotip, kemampuan regenerasi setiap genotip sangat berbeda (Thomas, 1985). Pengaruh genotip pada poliferasi sel dapat dilihat pada kapasitas regeneratifnya. Pada umumnya, tanaman dikotil lebih mudah berpoliferasi pada kultur *in vitro* daripada tanaman monokotil. Selain itu tanaman Gymnospermae memiliki kapasitas regeneratif yang lebih terbatas dibandingkan dengan tanaman Angiospermae (Hartman, 1990). Tanaman yang umumnya mudah diperbanyak melalui teknik perbanyakan vegetatif konvensional akan mudah pula diperbanyak melalui teknik kultur jaringan (Pierik, 1997).

Perbanyakan tanaman secara vegetatif konvensional, jaringan-jaringan jenuhnya sering memperlihatkan peluang keberhasilan yang lebih besar.

Peluang keberhasilan perbanyak tanaman secara *in vitro* meningkat pula dengan digunakannya jaringan-jaringan muda sebagai bahan eksplan. Hartman (1990), menyatakan bahwa jaringan-jaringan yang sedang aktif tumbuh pada awal masa pertumbuhan biasanya merupakan bahan eksplan yang paling baik. Jaringan yang kurang aktif sering menginginkan modifikasi jenis dan takaran zat pengatur tumbuh selama pengkulturan. Oleh karena itu, Pierik (1997) menyarankan untuk menggunakan jaringan-jaringan yang mudah dan lunak karena pada umumnya jaringan tersebut lebih mudah berpoliferasi dari pada jaringan berkayu atau yang sudah tua. Jaringan muda (juvenil) biasanya memiliki kapasitas regeneratif yang tinggi dan seringkali digunakan sebagai bahan penelitian.

Eksplan merupakan sebutan bagi bahan tanaman yang dikulturkan, bagian tanaman yang dijadikan sebagai eksplan mencakup ujung pucuk, irisan-irisan batang, daun, daun bunga, daun keping biji, akar, buah, embrio, meristem pucuk apikal (yang betul-betul merupakan titik tumbuh) dan jaringan nuselar. Eksplan harus diusahakan agar dalam keadaan aseptik melalui prosedur sterilisasi dengan berbagai bahan kimia. Melalui eksplan yang aseptik kemudian diperoleh kultur yang aksenik yaitu kultur dengan hanya satu macam organisme yang diinginkan (Gunawan, 1998).

## 2. Sterilisasi Bahan Eksplan

Kultur jaringan meliputi penanaman sel atau agregat sel, jaringan, dan organ tanaman pada medium yang mengandung gula, vitamin, asam-asam amino, garam-garam anorganik, air, zat pengatur tumbuh, dan bahan pematat.

Komposisi medium tumbuh ternyata sangat menguntungkan pula bagi pertumbuhan cendawan dan bakteri. Bila diberi kesempatan maka mikroorganisme tersebut akan tumbuh dengan cepat dan dalam waktu singkat akan menutupi permukaan medium serta eksplan yang ditanam. Selanjutnya, mikroorganisme tersebut akan menyerang eksplan melalui luka-luka akibat pemotongan dan penanganan pada saat sterilisasi sehingga mengakibatkan kematian eksplan. Disamping itu, beberapa mikroorganisme melepaskan senyawa beracun ke dalam medium kultur yang dapat menyebabkan kematian jaringan. Oleh karena itu dalam inisiasi suatu kultur, harus diusahakan kultur yang aksenik, artinya kultur hanya dengan satu macam organisme yang diinginkan (dalam hal ini jaringan tanaman), (Zulkarnain, 2009).

Beberapa sumber kontaminasi mikroorganisme pada sistem kultur jaringan dapat dikemukakan sebagai berikut (Zulkarnain, 2009):

- a. Medium sebagai akibat proses sterilisasi yang tidak sempurna
- b. Lingkungan kerja dan pelaksanaan yang penanaman yang kurang hati-hati dan kurang teliti
- c. Eksplan
  - i. Secara internal (kontaminan terbawa didalam jaringan)
  - ii. Secara eksternal (kontaminan berada dipermukaan eksplan) akibat prosedur sterilisasi yang kurang kurang sempurna
- d. Dari serangga atau hewan kecil yang berhasil masuk ke dalam botol kultur setelah diletakkan di dalam ruang kultur ataupun ruang stok

Dari semua sumber kontaminasi, yang paling sulit diatasi adalah yang berasal dari eksplan. Oleh karena itu dalam memilih metode sterilisasi haruslah selektif, kita hanya mengeliminasi jamur atau bakteri yang tidak diinginkan dengan gangguan seminimal mungkin terhadap bahan eksplan. Pada prinsipnya, sukar untuk menentukan metode baku yang berlaku untuk semua jenis tanaman dan semua bagian tanaman. Secara garis besar ada ketentuan umum, namun secara spesifik metode sterilisasi akan diperoleh dari trial and error. Cara penanganan bagian tanaman yang lunak akan sangat berbeda dengan bagian tanaman yang keras, ataupun kulit biji yang memiliki kulit keras.

Untuk menghilangkan sumber infeksi, bahan tanaman harus disterilkan sebelum ditanam pada medium tumbuh. Jaringan ataupun organ yang terinfeksi jamur atau bakteri sistemik hendaknya dibuang.

### 3. Media

Keberhasilan dalam penggunaan metode kultur jaringan sangat bergantung pada media yang digunakan. Media ini tidak hanya menyediakan unsur hara (makro dan mikro) tetapi juga karbohidrat (gula) untuk menggantikan karbon yang biasanya didapat dari atmosfer melalui fotosintesis. Hasil yang lebih baik akan diperoleh, bila ke dalam media tersebut ditambahkan vitamin, asam amino dan zat pengatur tumbuh (Gunawan, 1998).

Banyak formulasi medium yang ada, masing-masing berbeda dalam hal kuantitas maupun kualitasnya komponennya. Salah satu formulasi yang banyak digunakan adalah Murashige & Skoog (MS) yang telah ditemukan dan

dipublikasikan oleh Toshio Murashige dan Skoog pada tahun 1962. Formulasi dasar mineral dari MS ternyata dapat digunakan untuk sejumlah besar spesies tanaman dalam perbanyakan kultur jaringan.

Umumnya media kultur jaringan tersusun atas komposisi hara makro, hara mikro, vitamin, gula, asam amino dan N-organik, persenyawaan kompleks alamiah (air kelapa, ekstrak ragi, jus tomat dan sebagainya), buffer, arang aktif, zat pengatur tumbuh (terutama auksin dan sitokinin) dan bahan pemat. Faktor lain yang tidak kalah penting dalam teknik kultur jaringan adalah pengaturan pH media. Tingkat keasaman media harus diatur supaya tidak mengganggu fungsi membran sel dan pH sitoplasma. Pada umumnya, keasaman medium ditetapkan antara 5,6-5,8. Medium yang terlalu asam ( $\text{pH} < 4,5$ ) atau terlalu basa ( $\text{pH} > 7,0$ ) dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Pierik, 1997).

Hal itu mungkin disebabkan oleh tidak tersedianya sejumlah unsur hara pada kisaran pH tertentu. Pada pH tinggi, unsur-unsur seperti besi, seng, mangan, tembaga, dan boron mengalami presipitasi sebagai hidroksida sehingga tidak tersedia bagi jaringan yang dikulturkan. Sedangkan pada pH rendah, unsur-unsur seperti kalsium, magnesium, belerang, fosfor dan molibdat menjadi tidak tersedia. Akan tetapi, Winata (1987), menyatakan bahwa tanaman, seperti *Rhododendron* tumbuh dengan baik pada medium dengan pH 4,5. Medium dengan pH rendah sering kali digunakan dalam seleksi untuk mendapatkan tanaman yang toleran terhadap keasaman tinggi. Selain memengaruhi ketersediaan unsur-unsur hara, pH mempengaruhi pula proses

pemadatan medium, medium akan menjadi terlalu keras apabila  $\text{pH} > 6,0$ , sedangkan pada  $\text{pH} < 5,2$ , medium akan sulit untuk menjadi padat (Zulkarnain, 2009).

#### 4. Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh (ZPT) didefinisikan sebagai senyawa organik bukan nutrisi yang aktif dalam jumlah kecil ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$  mM) yang disintesis pada bagian tertentu tanaman dan pada umumnya diangkut ke bagian lain tanaman di mana zat tersebut menimbulkan tanggapan secara biokimia, fisiologis dan morfologis (Wattimena, 1988). Dua golongan zat pengatur tumbuh yang penting dalam kultur jaringan yaitu auksin dan sitokinin. Zat pengatur tumbuh ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel dan organ. Interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur (Guanawan, 1995).

Auksin adalah sekelompok senyawa yang fungsinya merangsang pemanjangan sel-sel pucuk yang spectrum aktifitasnya menyerupai IAA (*Indole 3 Asetic Acid*). Pierik (1997) menyatakan bahwa pada umumnya auksin meningkatkan pemanjangan sel, pembelahan sel, dan pembentukan akar adventif. Auksin berpengaruh pula untuk menghambat pembentukan tunas adventif dan tunas aksilar, namun kehadirannya dalam medium kultur dibutuhkan untuk meningkatkan embriogenesis somatik pada kultur suspensi sel. Konsentrasi auksin yang rendah akan meningkatkan pembentukan akar

adventif, sedangkan auksin konsentrasi tinggi akan merangsang pembentukan kalus dan menekan morfogenesis (Smith, 1992).

Auksin banyak digunakan secara luas pada kultur jaringan dalam merangsang pertumbuhan kalus, suspensi sel dan organ (Gunawan, 1998). Bentuk-bentuk auksin yang biasa ditambahkan ke dalam media kultur adalah 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxy acetic acid*), IBA (*Indolebutyric Acid*), NAA (*Naphtalene Acetic Acid*) dan IAA (*Indole-3-Acetic Acid*). Auksin yang secara alami terdapat dalam tumbuhan adalah IAA.

Menurut Zulkarnain (2009), Sitokinin adalah senyawa yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sama halnya dengan kinetin (6-fururylaminopurine). Peranan auksin dan sitokinin sangat nyata dalam pengaturan pembelahan sel, pemanjangan sel, diferensiasi sel, dan pembentukan organ. Beberapa macam sitokinin merupakan sitokinin alami (misal kinetin dan zeatin) dan beberapa lainnya merupakan sitokinin sintetik. Sitokinin alami dihasilkan pada jaringan yang tumbuh aktif terutama pada akar, embrio dan buah. Sitokinin yang diproduksi di akar selanjutnya diangkut oleh xilem menuju sel-sel target pada batang.

## 5. Lingkungan Tumbuh

Cahaya dalam kultur jaringan berguna untuk mengatur proses-proses morfogenik tertentu seperti pembentukan pucuk dan akar, dan tidak untuk fotosintesis karena sumber energi bagi eksplan telah disediakan oleh sukrosa. Cahaya juga penting dalam pengendalian perkembangan eksplan dan unsur-

unsur cahaya yang perlu diperhatikan adalah kualitas cahaya, panjang penyinaran dan intensitas cahaya. Temperatur ruang kultur juga menentukan respon fisiologi kultur dan kecepatan pertumbuhannya. Dalam hal ini cahaya sangat penting untuk fotomorfogenesis bukan terhadap fotosintesis. Fotomorfogenesis merupakan proses menginduksi perkembangan suatu tanaman dan tidak melibatkan energi cahaya dalam jumlah besar (George dan Sherrington, 1984).

#### 6. Temperatur

Temperatur yang umum digunakan untuk kultur berbagai tanaman adalah  $\pm 20^{\circ}\text{C}$ . Suhu yang terlalu rendah dapat menghambat pertumbuhan tanaman dan suhu yang terlalu tinggi dapat mematikan tanaman. Temperatur optimum tergantung jenis tanaman, sedangkan temperatur normal berkisar antara  $22^{\circ}\text{C}$  sampai  $28^{\circ}\text{C}$  (Santoso, 2003).

#### 7. kelembaban

Kelembaban merupakan faktor penting yang sangat menentukan keberhasilan kultur jaringan berbagai spesies tanaman. Kelembaban relative di dalam ruang kultur sekitar 70 %, namun kebutuhan kelembaban di dalam wadah kultur mendekati 90 %. Kadar kelembaban di dalam wadah kultur yang terlalu tinggi sering menyebabkan terbentuknya daun-daun pucuk yang mengalami vitrifikasi (Red, 1990).

## 2.5 Bahan Sterilisasi Eksplan

Menurut Sandra (2000), sterilisasi adalah proses untuk mematikan atau menonaktifkan spora dan mikroorganisme sampai ke tingkat yang tidak memungkinkan lagi berkembang biak atau menjadi sumber kontaminan selama proses perkembangan berlangsung. Menurut Hendaryono (1994), sterilisasi eksplan dapat dilaksanakan dengan dua cara, yaitu secara mekanik dan secara kimia. Sterilisasi eksplan secara mekanik digunakan untuk eksplan yang keras (misalnya tebu, biji salak, dan sebagainya) atau berdaging (misalnya wortel, umbi, dan sebagainya), yaitu dengan membakar eksplan tersebut di atas lampu spiritus sebanyak tiga kali. Sedangkan sterilisasi eksplan secara kimia digunakan untuk eksplan yang lunak (jaringan muda) seperti daun, tangkai daun, anther, dan sebagainya.

Menurut Gunawan (1987) ada sekitar sepuluh jenis bahan yang digunakan dalam sterilisasi permukaan, yaitu kalsium hipoklorit, natrium hipoklorit, hidrogen peroksida, gas klorin, perak nitrat, merkuri klorid, betadin, fungisida, antibiotik, dan alkohol.

Bahan-bahan kimia yang sering digunakan untuk sterilisasi permukaan eksplan antara lain:

1. Natrium hipoklorit (NaOCl)

Bahan-bahan sterilisasi yang dapat digunakan untuk sterilisasi bahan tanaman sudah banyak tersedia. Larutan hipoklorit (natrium atau kalsium) telah terbukti efektif pada kebanyakan bahan tanaman. Misalnya, perlakuan Na-hipoklorit 0,3-0,6 % selama 15-30 menit terbukti efektif

untuk sterilisasi sebagian besar bahan tanaman. Perlu di ingat, bahan sterilisasi pun bersifat meracuni jaringan. Oleh karena itu, tingkat konsentrasi dan lamanya perlakuan harus benar-benar diperhatikan untuk mengurangi resiko kematian jaringan (Bhojwani, 1983).

NaOCl merupakan satu dari beberapa senyawa disinfektan. The International Agency Research on Cancer (IARC) menyatakan bahwa NaOCl aman bagi manusia dan lingkungan, senyawa ini tidak menyebabkan mutagen, carsinogenic dan teratogenik. NaOCl adalah hasil reaksi antara molekul Chlorine, Sodium Hydroksida dan air. Hipoklorit adalah persenyawaan klorin yang pertama digunakan untuk proses delignifikasi (biasanya disebut hypro). Natrium hipoklorit dibuat dari klorin dan natrium hidroksida. Senyawa ini merupakan larutan yang sangat tidak stabil dan cenderung terurai yang meningkat dengan kenaikan konsentrasi dan temperatur serta berkurangnya sifat alkali. Larutan hipoklorit dapat terurai menjadi klorida dan oksigen dengan adanya ion-ion logam berat (Rismayani, 2007).

Nama dagangnya adalah clorox dan bayclin. Konsentrasi untuk sterilisasi tergantung dari kelunakan eksplan, dapat 5%-20% dan waktunya antara 5-10 menit. Pengaruh pemberian Clorox (NaOCl) terhadap sterilisasi permukaan yaitu karena Chlorox NaOCl) terdiri dari Natrium hipoklorit yang mana mampu membersihkan mikroorganisme yang terikut alam bahan tanam, menghilangkan partikel-partikel tanah, debu dan lain-lain (Santoso, 2003).

## 2. Merkuri

Penggunaan merkuri Clorida ( $\text{HgCl}_2$ ) telah terbukti efektif untuk sterilisasi bahan tanaman yang berasal dari lapangan. Roy (1990) menggunakan 0,5 % ( $\text{HgCl}_2$ ) sebagai bahan sterilisasi eksplan nodus tanaman nangka dengan hasil yang memuaskan, sedangkan Hadiyono dan Zulkarnain (1991) menggunakan 0,05 % ( $\text{HgCl}_2$ ) untuk sterilisasi nodus tanaman lada dengan hasil baik. Meskipun demikian, penggunaan ( $\text{HgCl}_2$ ) merupakan pilihan terakhir jika bahan-bahan lain ternyata tidak mampu untuk memusnakan mikroorganisme yang menginfeksi bahan tanaman. Hal itu dikarenakan sifat senyawa tersebut yang sangat beracun sehingga memerlukan penanganan yang sangat hati-hati. Jika menggunakan ( $\text{HgCl}_2$ ), sisa larutannya harus dikumpulkan dalam satu wadah kemudian dibuang di suatu tempat yang tidak akan mencemarkan sumber air minum (Zurkarnain, 2009).

Merkuri dapat digolongkan sebagai merkuri organik (senyawa alkil merkuri ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ); senyawa aril merkuri ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgCl}$ ); senyawa alkoksiaril merkuri ( $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{HgCl}$ ), dan anorganik (logam ( $\text{Hg}^0$ ); garam merkurous ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ); garam merkuri ( $\text{HgCl}_2$ ). Bentuk kimia merkuri mempunyai pengaruh terhadap pengendapannya (Alfian, 2006).

Secara umum ada tiga bentuk merkuri yaitu, Alfian (2006): Unsur merkuri, Merkuri anorganik, dan merkuri organik. Diantara dua tahapan pengoksian ( $\text{Hg}^{2+}$  dan  $\text{Hg}_2^{2+}$ ),  $\text{Hg}^{2+}$  adalah lebih reaktif, ia dapat membentuk kompleks dengan ligan organik, terutama golongan

sulfurhidril. Contohnya  $\text{HgCl}_2$  sangat larut dalam air dan sangat toksik, sebaliknya  $\text{HgCl}$  tidak larut dan tidak toksik. Hal ini disebabkan karena bentuk divalen lebih mudah larut dari pada bentuk monovalen. Disamping itu, bentuk  $\text{HgCl}_2$  juga cepat dan mudah diabsorpsi sehingga daya toksitasnya lebih tinggi.

### 3. Alkohol 70%

Alkohol lebih banyak diperdagangkan dalam bentuk alkohol 95%. Jamur biasanya mati dengan alkohol 70%, sedangkan dengan alkohol 95% masih tetap hidup.

Dari ketiga bahan kimia tersebut, perlakuan sterilisasinya biasanya dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*. Untuk perlakuan sterilisasi di luar *laminar air flow cabinet* biasanya menggunakan fungisida dan bakterisida.

#### 1. Fungisida

Fungisida adalah bahan yang mengandung senyawa kimia beracun dan bisa digunakan untuk memberantas dan mencegah fungi/cendawan/jamur. Fungisida yang digunakan untuk sterilisasi merupakan fungisida sistemik. Fungisida sistemik adalah senyawa kimia yang bila diaplikasikan pada tanaman akan bertranslokasi ke bagian lain. Merek dagang fungisida sistemik yang biasa digunakan antara lain benlet, previcur N, derosal 500 EC.

#### 2. Bakterisida

Bakterisida adalah bahan yang mengandung senyawa kimia beracun dan bisa digunakan untuk memberantas dan mencegah bakteri.

Merek dagang bakterisida sistemik yang bisa digunakan antara lain streptomycine (Wudianto, 2002).

### 3. Deterjen

Detergen digunakan untuk mencuci eksplan sekaligus menghilangkan mikroba-mikroba yang menempel pada permukaan eksplan. Pencucian biasanya menggunakan deterjen secukupnya selama 3-7 menit. Pencucian yang terlalu lama atau buih deterjen yang terlalu kental dapat merusak jaringan (Hendaryono, 1994).

Menurut Sandra (2003), prinsip dasar sterilisasi eksplan adalah mensterilkan eksplan dari berbagai mikroorganisme, tetapi eksplannya tidak ikut mati. Setiap tanaman memerlukan perlakuan khusus sehingga sebelum mengkulturkan tanaman baru perlu melakukan percobaan sterilisasi. Sebagai patokan, konsentrasi bahan dan waktu yang diperlukan untuk sterilisasi eksplan sebagai berikut :

#### 1. Sterilisasi Ringan

Eksplan direndam dalam cairan pemutih pakaian 20% selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril. Setelah itu, eksplan direndam dalam cairan pemutih pakaian 15% selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril. Terakhir, eksplan direndam dalam cairan pemutih pakaian 10% selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril tiga kali.

#### 2. Sterilisasi Sedang

Eksplan direndam dalam  $\text{HgCl}_2$  0.1-0.5 mg/l selama 7 menit, lalu bilas dengan air steril. Setelah itu, eksplan direndam dalam cairan pemutih

pakaian 15% selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril. Terakhir, eksplan direndam dalam cairan pemutih pakaian 10% selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril tiga kali.

### 3. Sterilisasi Keras

Eksplan direndam dalam  $\text{HgCl}_2$  0.1-0.5 mg/l selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril. Setelah itu, eksplan direndam dalam alkohol 90% selama 15 menit, lalu bilas dengan air steril. Terakhir, eksplan direndam dalam cairan pemutih pakaian 20% selama 10 menit, lalu bilas dengan air steril tiga kali.

Masalah yang sering mengganggu dalam pekerjaan *in vitro* adalah membuat dan menjaga kondisi aseptik, baik kondisi lingkungan maupun kondisi eksplannya. Oleh karena itu bila memindah-tanamkan bagian tanaman dari satu wadah ke wadah yang lain, jangan menyentuh permukaan bagian dalam dari wadah dengan tangan atau bagian alat yang tidak steril (Wetherell 1982).

Menurut Gunawan (1987), setiap bahan tanaman mempunyai tingkat kontaminasi permukaan yang berbeda, tergantung dari :

1. Jenis tanamannya.
2. Bagian tanaman yang dipergunakan.
3. Morfologi permukaan (misalnya berbulu atau tidak).
4. Lingkungan tumbuhnya (*Green house* atau lapang).
5. Musim waktu mengambil (musim hujan atau kemarau).
6. Umur tanaman (*seedling* atau tanaman dewasa).
7. Kondisi tanamannya (sehat atau sakit).

## 2.6 Sterilisasi Eksplan

Proses sterilisasi merupakan kegiatan mengeliminasi dan mematikan mikroorganisme sampai ke tingkat yang tidak memungkinkan lagi berkembang biak dan menjadi sumber kontaminan. Eksplan yang didapat tidak dari perlakuan steril, misalnya dari rumah kaca, sangat besar kemungkinannya terkontaminasi debu dan mikroorganisme.

Proses sterilisasi yang tidak sempurna akan menimbulkan adanya kontaminasi. Kontaminasi yang umum terjadi adalah kontaminasi oleh cendawan dan bakteri. Komposisi medium kultur jaringan yang mengandung gula, vitamin, asam amino, garam-garam anorganik, air, zat pengatur tumbuh, dan bahan pematat sangat menguntungkan untuk pertumbuhan cendawan dan bakteri. Bila diberi kesempatan maka organisme tersebut akan tumbuh dengan cepat, dan dalam waktu singkat akan menutupi permukaan medium dan eksplan yang ditanam. Selanjutnya organisme ini menyerang eksplan melalui bekas luka pemotongan pada saat perlakuan sterilisasi. Beberapa jenis mikroorganisme melepaskan senyawa beracun ke dalam medium kultur yang dapat menyebabkan kematian eksplan (Zulkarnain 2009).

Beberapa sumber kontaminasi mikroorganisme pada sistem kultur jaringan, adalah: (1) media, (2) lingkungan kerja yang kurang steril dan pelaksana penanaman yang kurang hati-hati dan kurang teliti, (3) eksplan, secara internal (kontaminan terbawa di dalam jaringan tanaman), (4) eksplan, secara eksternal (kontaminan berada di permukaan eksplan akibat prosedur sterilisasi yang kurang sempurna, (5) serangga atau hewan kecil yang masuk ke botol kultur setelah

diletakkan pada ruang kultur. Dari semua sumber kontaminasi, yang paling sulit diatasi ialah yang berasal dari eksplan. Oleh karena itu, dalam memilih suatu metode sterilisasi dan bahan sterilisasi haruslah selektif, dengan prinsip semaksimal mungkin menghilangkan mikroorganisme kontaminan yang tidak diinginkan dengan gangguan sekecil mungkin pada jaringan eksplan (Zulkarnain, 2009).

### **2.7 Manfaat Kultur Jaringan**

Menurut Darmono (2003); Hendaryono dan Wijayani (1994); serta Sandra dan Medi (2000) manfaat yang bisa didapatkan dari kultur jaringan adalah sebagai berikut :

1. Bibit dapat diperbanyak dalam jumlah besar dan relatif cepat.
2. Bibit unggul, cepat berbuah serta tahan hama dan penyakit.
3. Seragam atau sama dengan induknya, tetapi dapat juga menimbulkan keberagaman.
4. Efisiensi tempat dan waktu. Tidak tergantung musim, dapat diperbanyak secara kontinyu.
5. Untuk skala besar biaya lebih murah.
6. Cocok untuk tanaman yang sulit beregenerasi.
7. Menghasilkan tanaman bebas virus.
8. Menghasilkan bahan bioaktif/metabolit sekunder tanpa menanam di luar atau di lapang.

9. Kultur jaringan sesuai dengan program pemuliaan konvensional seperti penyelamatan embrio.
10. Produksi bahan-bahan sekunder dapat melalui kultur sel, jaringan, dan organ, misalnya produksi papain dari pepaya.
11. Proses tukar-menukar plasma nutfah menjadi lebih mudah.
12. Plasma nutfah bisa disimpan dalam bentuk sel-sel yang kompeten dalam regenerasi.

