

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Nilam (*Pogostemon cablin*. Benth)

2.1.1 Taksonomi Tanaman Nilam

Tanaman nilam merupakan salah satu tanaman obat asli Indonesia. Berdasarkan sifat tumbuhnya, tanaman nilam termasuk kedalam tanaman tahunan. Tanaman ini merupakan tanaman semak yang tumbuh berkelompok, memiliki banyak percabangan, berbuku-buku, dan mempunyai aroma yang khas. Nilam termasuk suku *Labiatae* yang memiliki sekitar 200 genus, antara lain *Pogostemon*. menurut Rukmana (2004) taksonomi tanaman nilam diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (tumbuh-tumbuhan)
Divisi	: Spermatophyta (tumbuhan berbiji)
Subdivisi	: Angiospermae (berbiji tertutup)
Kelas	: Dicotyledonae (biji berkeping dua)
Ordo	: Labiales
Famili	: Labiatae
Genus	: Pogostemon
Spesies	: <i>Pogostemon cablin</i> Bent

Tanaman nilam merupakan tanaman perdu yang tingginya bisa mencapai lebih dari 1 meter. Perakaran tanaman nilam adalah akar serabut yang wangi dan

tumbuhnya menjalar didalam tanah. Akar-akar sekunder tanaman nilam yang sudah dewasa menyebar sekitar 20-30 cm di bawah permukaan tanah. Tanaman nilam yang berasal dari perbanyakan vegetatif (stek) biasanya memiliki akar serabut yang lebih kuat sehingga dapat berdiri tegak dan kuat. (Firmanto, 2009)



Gambar 2. a. Tanaman nilam Aceh b.(b1) daun, (b2) tangkai daun, (b3) batang.

Batang tanaman nilam yaitu berkayu yang panjangnya kira-kira 20-40 cm dengan diameter sekitar 10-20 mm. Sistem percabangan tanaman nilam bertingkat mengelilingi batang, biasanya 3-5 cabang per-tingkat dan cabang berjumlah banyak. Tinggi tanaman nilam bisa mencapai 1 meter lebih dengan radius cabang selebar kurang lebih 60 cm jika tanaman sudah berumur 6 bulan.

Daun tanaman nilam berbentuk bulat oval hingga bulat panjang (lonjong) dan menyerupai jantung. Ukuran daun ini sekitar 5-10 cm. Daun yang berwarna hijau ini tipis dan tidak kaku. Permukaan daun bagian atas terdapat bulu-bulu dan kasar. Letak duduk daun saling berhadap-hadapan, bagian ujung daun tumpul dan urat daun menonjol keluar, sebagian besar daun yang melekat pada ranting hampir selalu berpasangan satu sama lain. Daun diremas akan tercium bau harum, dan

pada jaman dahulu masyarakat menjadikan daun nilam sebagai pengganti sabun dan sekaligus untuk memberikan bau wangi. (Mangun, 2008). Tanaman nilam jarang berbunga, bahkan ketika penanamannya diharapkan tidak mencapai proses generative karena mengurangi jumlah dari minyak atsirinya. Bunga tanaman nilam tumbuh di ujung tangkai, bergerombol dan memiliki karakteristik warna ungu kemerahan. Tangkai bunga memiliki panjang antara 2 - 8 cm dengan diameter antara 1 - 15 cm dengan mahkota berbentuk pipa berukuran 8 mm dengan stilus dan dua stigma. Buah atau biji berbentuk menyerupai polong berjumlah 4 dan berukuran kecil.

2.1.2 Syarat Tumbuh

Syarat tumbuh nilam ada beberapa yaitu tanah, cahaya matahari, ketinggian, curah hujan, kelembaban. Tanaman nilam dapat tumbuh dimana saja, baik sawah, galengan, pekarangan rumah atau dihutan yang baru dibuka, namun untuk mendapatkan kualitas nilam yang baik tanaman nilam harus tumbuh pada tanah yang subur dan gembur, kaya akan humus dan tidak tergenang merupakan tanah yang sangat sesuai untuk tanaman nilam. Jenis tanah yang paling sesuai adalah tanah yang subur mempunyai tekstur halus, kaya lumut, dan dapat diolah seperti andosol atau latosol dengan kemiringan kurang dari 15 derajat (Nuryani, 2006). Keasaman tanahnya (pH) antara 6-7, memiliki daya resapan tanah yang baik, dan tidak menyebabkan genangan air pada musim hujan (Subroto, 2007).

Tanah yang terlalu asam, maka tanaman nilam akan menjadi kerdil, kekerdilan ini disebabkan oleh Al yang larut didalamnya. Peningkatan pH tanah dilakukan dengan pengapuran namun jika tanah terlalu basa maka akan

menyebabkan garam mangan (Mn) tidak dapat diserap tanaman sehingga beuk daun nilam akan kurus kering (Subroto, 2007). Tanah yang kandungan airnya tinggi perlu dilakukan drainasi yang baik. Tanaman nilam yang terlalu banyak kandungan air pada tanahnya menyebabkan mudah terserang penyakit akar busuk yang disebabkan cendawan phytopthora.

Menurut Nuryani (2005), agar tanaman nilam tumbuh dengan optimal, tanaman nilam memerlukan intensitas penyinaran cahaya matahari yang banyak berkisar 75%-100%. Daerah yang tertutupi nilam dapat tumbuh dengan baik namun kadar minyak lebih rendah dari pada tempat dengan intensitas cahaya yang maksimal. Nilam yang tumbuh pada cahaya rendah berakar lebih kecil, jumlah terbatas dan tersusun dari sel yang ber dinding tipis, hal tersebut berdampak pada laju fotosintesis yang menurun. Penyebab dari menurunnya laju fotosintesis karena adanya fotooksidasi klorofil yang berlangsung cepat, sehingga merusak klorofil. Intensitas cahaya yang optimal kelembaban udara berkurang sehingga proses tranpirasi berlangsung cepat. Intensitas cahaya yang terlalu rendah akan membatasi fotosintesis dan menyebabkan cadangan makanan cenderung lebih banyak dipakai daripada disimpan (Haryanti, 2010).

Intensitas cahaya berpengaruh juga pada warna dan ukuran daun nilam. Kedaan lingkungan yang tanpa pelindung menyebabkan daun nilam kecil, agak tebal dan berwarna merah kekuning-kuningan, meskipun demikian kadar dari minyak daun nilam lebih tinggi. Pengaruh pencahayaan matahari sebagaimana diuraikan di atas dijelaskan sebagai berikut: (Subroto, 2007). Jenis cahaya yang dibutuhkan adalah cahaya putih. Cahaya matahari berperan sebagai sumber

energy untuk proses fotosintesis bagi setiap tanaman. Tanaman nilam untuk produksi minyak lebih cocok ditempatkan pada cahaya matahari yang langsung menyinari karena dapat meningkatkan kadar minyaknya.

Nilam dapat tumbuh dan berkembang di dataran rendah sampai pada dataran tinggi yang mempunyai ketinggian 1.200 m di atas permukaan laut. Nilam akan tumbuh dengan baik dan berproduksi tinggi pada ketinggian tempat antara 50-400 m dpl. Dataran rendah kadar minyak lebih tinggi tetapi kadar patchouli alcohol lebih rendah, sebaliknya pada dataran tinggi kadar minyak rendah, kadar patchouli alcohol (Pa) tinggi (Nuryani, 2005).

Air mempengaruhi pertumbuhan tanaman, diantaranya sebagai pelarut zat nutrisi, pembentuk gula dan pati, sarana pengangkutan hara dalam tanaman, pertumbuhan sel, pembentukan enzim, dan menjaga stabilitas suhu. Curah hujan dibutuhkan tanaman nilam relatif tinggi, yaitu sekitar 2300-3000 mm per tahun, dengan penyebaran merata sepanjang tahun (Subroto, 2007).

Reaksi setiap tanaman terhadap kelembapan tergantung pada jenis tanaman itu sendiri. Tanaman yang tumbuh di dataran yang rendah, pada umumnya membutuhkan kelembapan yang tidak terlalu tinggi untuk melangsungkan pertumbuhannya, sebaliknya jika tanaman itu tumbuh di dataran tinggi, pada umumnya membutuhkan kelembapan yang tinggi. Tanaman nilam agar dapat tumbuh dengan optimal membutuhkan kelembapan sekitar 60-70% (Subroto, 2007).

2.1.2 Jenis-jenis tanaman nilam

Jenis-jenis tanaman nilam antara lain :

a. *Pogostemon cablin* Benth

Pogostemon cablin Benth disebut juga dengan *Pogostemon patchouli* atau *Pogostemon mentha*. *Pogostemon cablin* sering juga disebut nilam Aceh. Jenis tanaman ini termasuk famili Labiate, yaitu kelompok tanaman yang mempunyai aroma yang mirip satu sama lain. Jenis nilam, yang diusahakan secara komersial adalah varietas *Pogostemon cablin* Benth yang sebenarnya berasal dari Filipina, yang kemudian berkembang ke Malaysia, Madagaskar, Paraguay, Brazilia dan Indonesia (Sudaryani, dkk, 1998).

Di Indonesia banyak ditemukan di Aceh dan Sumatera Utara. Nilam jenis ini jarang berbunga, oleh karena itu kandungan minyaknya tinggi yaitu 2,5-5%, disamping itu, minyak nilam memiliki sifat-sifat yang diinginkan dalam perdagangan (Nuryani, dkk, 2005).

b. *Pogostemon heyneanus*

Pogostemon heyneanus sering juga dinamakan nilam jawa atau nilam hutan. Jenis ini berasal dari India, banyak tumbuh liar di hutan pulau Jawa dan pada umumnya berbunga, oleh karena itu kandungan minyaknya rendah yaitu 0,5-1,5%. Ciri-ciri spesifik yang dapat membedakan nilam Jawa dan nilam Aceh secara visual yaitu pada daunnya. Permukaan daun nilam Aceh halus, sedangkan nilam Jawa kasar. Tepi daun nilam Aceh bergerigi tumpul, pada nilam Jawa bergerigi runcing, ujung daun nilam Aceh runcing, nilam Jawa meruncing. Nilam jawa lebih toleran terhadap nematoda dan penyakit layu bakteri dibandingkan nilam Aceh (Nuryani, dkk, 2005).

c. *Pogostemon hortensis*

Pogostemon hortensis disebut juga nilam sabun, karena bisa digunakan untuk mencuci pakaian. Jenis nilam ini hanya terdapat di daerah Banten. Bentuk *Pogostemon hortensis* mirip dengan nilam Jawa, tetapi tidak berbunga. Kandungan minyaknya 0,5-1,5% dan komposisi minyak yang dihasilkan jelek, sehingga untuk jenis minyak nilam ini kurang mendapatkan pasaran dalam perdagangan (Sudaryani, dkk, 1998).

2.1.3 Minyak atsiri

Minyak eteris atau minyak atsiri adalah istilah yang digunakan untuk minyak yang mudah menguap dan diperoleh dari tanaman dengan cara penyulingan uap. Defenisi ini, dimaksudkan untuk membedakan minyak atau lemak dengan minyak atsiri yang berbeda tanaman penghasilnya. Kelompok ini dicantumkan pula minyak yang mudah menguap dengan metode ekstraksi yaitu menggunakan penyulingan uap. Minyak atsiri merupakan salah satu hasil dari sisa proses metabolisme dalam tanaman yang terbentuk, karena reaksi antara berbagai persenyawaan kimia dengan adanya air. Minyak tersebut disintesis dalam sel kelenjar pada jaringan tanaman dan ada juga yang terbentuk dalam pembuluh resin, misalnya minyak terpentin dari pohon pinus (Lutony, dkk, 2002).

Umumnya minyak atsiri merupakan pemberi bau yang khas, atau disebut minyak eteris, minyak menguap atau *essential oil* yaitu bahan aromatis alam yang berasal dari tumbuhan. Ciri minyak atsiri antara lain mudah menguap pada suhu kamar tanpa mengalami dekomposisi, mempunyai rasa getir, berbau wangi sesuai tanaman penghasilnya dan bersifat larut dalam pelarut organik dan tidak larut dalam air. Minyak atsiri pada suhu kamar berbentuk cairan berwarna kuning-

kecoklatan hingga kuning muda sampai kemerahan dan mempunyai densitas lebih kecil dari air (Sumarni, 2008).

Minyak atsiri terdiri dari berbagai campuran persenyawaan kimia yang terbentuk dari unsur karbon (C), hidrogen (H) dan oksigen (O) serta beberapa persenyawaan kimia yang mengandung unsur nitrogen (N) dan belerang (S) (Bulan, 2004). Umumnya komponen kimia dari minyak atsiri terdiri dari campuran hidrogen dan turunannya yang mudah menguap dan diperoleh dari tanamandengan cara penyulingan uap mengandung oksigen disebut dengan terpen atau terpenoid. Terpen merupakan persenyawaan hidrogen tidak jenuh dan satuan terkecil dari molekulnya disebut isoprene (Guenther, 1987).

Nilam yang sering disebut juga *Pogostemon patchouli* pellet atau dilem wangi (Jawa), merupakan tanaman yang belum begitu dikenal secara meluas oleh masyarakat. Nilam banyak ditanam orang untuk diambil minyaknya dan merupakan salah satu dari beberapa jenis minyak yang digunakan dalam industri kosmetika dan banyak dicari konsumen di luar negeri (Sudaryani, dkk, 1998).

Tanaman nilam menghasilkan minyak nilam melalui proses penyulingan dan termasuk ke dalam salah satu jenis minyak atsiri yang dibutuhkan oleh masyarakat yang memiliki sifat sebagai berikut: (Sudaryani, dkk, 1998). Sukar menguap dibandingkan dengan minyak atsiri lainnya. Larut dalam alkohol. Minyak dapat dicampur dengan minyak eteris lainnya

Minyak nilam terdiri dari campuran persenyawaan terpen dengan alkohol-alkohol, aldehyd dan ester-ester yang memberikan bau khas misalnya patchouli alkohol. Patchouli alkohol merupakan senyawa yang menentukan bau minyak

nilam dan merupakan komponen yang terbesar, yang memberikan bau pada minyak nilam adalah *norpatchoulenol* yang terdapat dalam jumlah sedikit. Patchouli alkohol merupakan seskuiterpen alkohol dapat diisolasi dari minyak nilam, tidak larut dalam air, larut dalam alkohol, eter atau pelarut organik yang lain, mempunyai titik didih 140°C pada tekanan 8 mHg. Kristal yang terbentuk mempunyai titik lebur 56°C. Patchouli alkohol mempunyai berat molekul 222,36 dengan rumus molekul $C_{12}H_{26}O$ (Bulan, 2004).

Industri minyak nilam digunakan sebagai fiksasi yang belum dapat digantikan oleh minyak lain sampai saat ini. Minyak nilam terdiri dari komponen-komponen yang bertitik didih tinggi sehingga sangat baik dipakai sebagai zat pengikat dalam industri parfum dan dapat membentuk aroma yang harmonis. Zat pengikat adalah suatu persenyawaan yang mempunyai daya menguap lebih rendah atau titik uapnya lebih tinggi daripada zat pewangi sehingga kecepatan penguapan zat pewangi dapat dikurangi atau dihambat. Penambahan zat pengikat di dalam parfum dimaksudkan untuk mengikat aroma wangi dan mencegah penguapan zat pewangi yang terlalu cepat sehingga aroma wangi tidak cepat hilang atau lebih tahan lama (Subroto, 2007).

2.2 Kultur *In vitro*

Menurut Yusnita (2004), kultur jaringan didefinisikan sebagai suatu teknik menumbuhkan bagian tanaman baik berupa sel, jaringan, atau organ dalam kondisi aseptik secara *in vitro*, yang ditandai oleh kondisi kultur yang aseptik, media kultur buatan dengan kondisi ruang kultur suhu dan pencahayaan terkontrol.

Pengetahuan yang baik tentang kebutuhan hara sel dan jaringan yang dikulturkan akan mempengaruhi keberhasilan dalam teknologi serta penggunaan metode secara *in vitro*. Unsur Hara yang terdapat dalam media terdiri atas komponen utama meliputi garam mineral, sumber karbon (gula), vitamin, dan ZPT (Wetter dan Constabel, 1991).

Aplikasi kultur jaringan pada awalnya ialah untuk propagasi tanaman, selanjutnya penggunaan kultur jaringan lebih berkembang lagi yaitu untuk menghasilkan tanaman yang bebas hama penyakit tanaman, koleksi plasma nuftah, perbaikan genetik, produksi dan ekstansi zat zat kimia yang bermanfaat dari sel-sel yang dikulturkan (George dan Sherrington, 1984).

Sifat kompeten, dediferensiasi dan determinasi sel atau jaringan eksplan sangat penting agar terjadi organogenesis atau embriogenesis pada eksplan. Suatu sel atau jaringan dikatakan kompeten jika sel atau jaringan tersebut mampu memberikan tanggapan signal lingkungan atau signal hormonal. Bentuk tanggapannya berupa pertumbuhan dan perkembangan diri mengarah ke proses organogenesis atau embriogenesis. Eksplan yang dikondisikan di lingkungan dengan penambahan ZPT yang cocok akan menjadi kompeten untuk membentuk organ atau embrio atau bisa diistilahkan dari proses tersebut yaitu induksi (*inductive event*). Contohnya sel atau jaringan yang dikulturkan terdeterminasi menjadi organ atau embrio (Yusnita, 2004).

Perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan *in vitro* menawarkan peluang besar untuk menghasilkan jumlah bibit tanaman yang banyak dalam waktu relatif singkat sehingga lebih ekonomis. Teknik perbanyakan melalui kultur jaringan

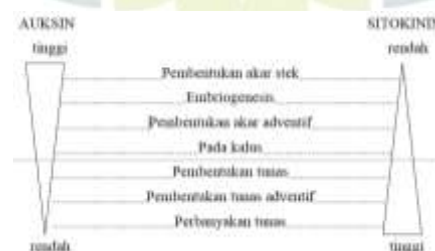
dapat dilakukan kapan saja tanpa tergantung musim. Perbanyak tanaman dengan cara *in vitro* mampu mengatasi kebutuhan bibit dalam jumlah yang besar dan bebas hama penyakit tanaman serta hasilnya pun lebih seragam dari perbanyakan secara konvensional. Oleh sebab itu, kini perbanyakan tanaman secara kultur jaringan merupakan teknik alternatif yang tidak dapat ditawar lagi bila penyediaan bibit diperlukan dalam skala besar dan dalam waktu yang relatif singkat (Hambali, 2006).

Kultur jaringan mempunyai tiga tujuan yaitu perbanyakan tanaman, produksi metabolit sekunder dan perbaikan kualitas tanaman. Produksi metabolit sekunder dapat dilakukan dengan kultur kalus dan kultur sel. Kultur kalus adalah teknik budidaya tanaman dalam suatu lingkungan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali (Gunawan, 1987).

Eksplan adalah bagian tanaman (dapat berupa sel, jaringan atau organ) yang digunakan sebagai bahan inokulum awal yang ditanam dalam media kultur *in vitro*. Bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan sebaiknya merupakan bagian yang mempunyai sel aktif membelah, berasal dari tanaman induk yang sehat dan berkualitas tinggi. Prinsipnya semua sel dapat ditumbuhkan, tetapi sebaiknya eksplan dipilih dari bagian tanaman yang masih muda, yaitu daun muda, ujung akar, ujung batang, keping biji atau tunas (Ambarwati, 1987). Menurut George dan Sherrington (1984), ukuran eksplan sangat berpengaruh terhadap keberhasilan eksplan *in vitro*. Eksplan terlalu kecil menyebabkan

ketahanan eksplan yang kurang baik dalam kultur dan apabila eksplan terlalu besar, akan mudah terkontaminasi oleh mikroorganisme.

Komposisi media kultur sangat berpengaruh terhadap proses pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang ditanam secara *in vitro*. Medium yang digunakan sebagai sumber makanan adalah senyawa organik dan anorganik yang diperlukan untuk pertumbuhan eksplan. Media kultur yang memenuhi syarat adalah media yang mengandung nutrisi makro dan nutrisi mikro dalam kadar dan perbandingan tertentu, sumber tenaga, air, asam amino, vitamin, zat pengatur tumbuh. Diperlukan penambahan zat lain seperti yeast, ekstra malt atau cairan tanaman sebagai sumber zat perangsang pertumbuhan. Selain itu perlu ditambah agar terjadi kontak antara jaringan tanaman media dengan udara (Wetherell, 1982)



Gambar 3. Pengaruh perimbangan Auksin dan Sitokinin terhadap arah pertumbuhan tanaman dalam *in vitro*
Sumber: George dan Sherrington, 1984

Faktor-faktor fisik lingkungan kultur harus dipenuhi, karena dapat mempengaruhi proses pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Faktor-faktor fisik yang dimaksud adalah:

2.2.1 Lingkungan

Faktor lingkungan yaitu suhu, cahaya, karbon dioksida, oksigen, dan kelembaban atau RH. Read (1990) menyebutkan faktor suhu berpengaruh secara

langsung terhadap perkembangan sel dan jaringan, pembentukan organ tanaman dan berkaitan erat dengan siklus perkembangan tanaman yang berada dibawah pengaruh enzim. Suhu yang baik atau optimum pada setiap tanaman untuk dapat melakukan morfogenesis tidak selalu sama. Kultur pucuk tanaman *Pseudotsuga menziesii* hanya dihasilkan sejumlah kecil planlet jika induksi perakaran dilakukan pada suhu 24⁰C. Planlet tersebut menunjukkan perkembangan pada anatominya sebagai akibat dari pengkalusan, sebaliknya planlet normal dalam jumlah besar dihasilkan pada suhu 19⁰C (George dan Sherrington, 1984).

Cahaya dibutuhkan untuk mengatur proses morfogenesis tertentu. Pengaruh cahaya yang dibutuhkan dalam kultur tergantung dari kualitas cahaya dan intensitas penyinaran (Pierik, 1987). Kualitas cahaya mempengaruhi arah diferensiasi jaringan. Katuuk (1989), mengemukakan bahwa intensitas cahaya diukur dengan foot candle (fc) atau Watt atau Lux. Menurut Yusnita (2003), secara umum intensitas cahaya yang optimum untuk tanaman pada tahap inisiasi kultur adalah 0-1000 Lux. Peranan cahaya pada fotosintesis *in vitro* tidak terlalu penting dari pada *in vivo*. Laju fotosintesis pada kebanyakan bahan tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* relatif rendah karena tergantung dari suplai hara, oleh sebab itu peranan cahaya lebih terletak pada fotomorfogenesis bukan terhadap fotosintesis (George dan Sherrington, 1984).

Efek lain dari cahaya diluar fotosintetis adalah mengendalikan bentuk tanaman, yaitu perkembangan struktur atau morfogenesisnya. Pengendalian morfogenesis oleh cahaya disebut fotomorfogenesis. Agar cahaya mampu

mengendalikan perkembangan pertumbuhan maka tumbuhan harus menyerap cahaya.

Pengaruh karbon dioksida atau CO₂ didalam kultur jaringan berkaitan erat dengan kebutuhan bagi proses fotosintesis. Secara umum, CO₂ merupakan syarat mutlak untuk kultur tanaman tingkat tinggi dibawah kondisi cahaya. Jumlah penelitian mengungkapkan bahwa tidak ada atau sedikit pengaruh konsentrasi CO₂ yang tinggi terhadap pertumbuhan eksplan yang kekurangan klorofil atau terhadap eksplan yang dikulturkan di dalam kondisi gelap (Read, 1990).

Oksigen diperlukan oleh jaringan yang dikulturkan secara *in vitro* sebagaimana halnya kultur *in vivo*. Menurut Read (1990) oksigen merupakan salah satu faktor pembatas bagi pembelahan dan pertumbuhan sel-sel pada jaringan yang dikulturkan secara *in vitro*. Sedikit sekali ditemukan laporan yang menjelaskan keterlibatan oksigen didalam sistem kultur *in vitro*. Kelembaban merupakan faktor penting yang akan menentukan keberhasilan kultur *in vitro* berbagai jenis tanaman. Kelembaban relatif di dalam ruang kultur sekitar 70 %.

Keasaman (pH) suatu larutan menyatakan kadar dari ion H⁺ dalam larutan (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Menurut Katuuk (1989), pH medium merupakan faktor lingkungan eksplan yang sangat menentukan. Pengaturan pH yang paling baik untuk pertumbuhan sel yaitu antara 5-6. Menurut Rahardja (1995), pH yang paling baik untuk pertumbuhan sel eksplan secara *in vitro* adalah antara 4,8-5,6. George dan Sherrington (1984), mengatakan bahwa manfaat pH dalam medium adalah untuk menjaga kestabilan membran sel, mengatur garam-garam mineral agar tetap dalam bentuk terlarut dan untuk membantu penyerapan

hara. Wetherell (1982) menyatakan bahwa keasaman (pH) menentukan kelarutan ketersediaan dari ion-ion mineral dan juga menentukan sifat gel dari agar. Yusnita (2003), menyebutkan bahwa dalam larutan media dengan pH rendah (kurang dari 4,5), gel yang terbentuk oleh agar sangat encer, sedangkan larutan dengan pH tinggi (lebih dari atau sama dengan 5,5) akan berbentuk padat. pH diatur sebelum di autoklaf. pH diatur menjadi 5,8 dengan menggunakan pH meter dan biasanya dalam medium ditambahkan NaOH atau HCl sebagai buffer. Keasaman pH mula-mula lebih tinggi dari 5,8 larutan ditetesi dengan HCl, sedangkan jika lebih rendah ditetesi dengan NaOH.

Temperatur pada beberapa penelitian *in vitro* menyebutkan bahwa suhu konstan yang baik adalah antara 20-28⁰C. Suhu optimum dapat dicapai bila digunakan lampu fluoresensi secara efisien dan ruangan yang menggunakan “*air conditioner*” (Wetherell, 1982). Menurut George dan Sherrington (1984), kelembaban relatif di ruang kultur sekitar 70%. Wetherell (1982), mengemukakan bahwa kelembaban ruangan yang rendah akan menyebabkan penguapan air dari media kultur akan terlalu besar, Sebaliknya kelembaban ruang kultur yang tinggi akan menaikkan derajat kontaminasi.

2.2.2 Media

Media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyakan tanaman secara kultur jaringan. Berbagai komposisi media kultur telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang dikulturkan (Yusnita, 2003). Umumnya, media dalam kultur jaringan merupakan campuran air dan hara yang mengandung garam-garam anorganik, dan

zat pengatur tumbuh. Garam-garam anorganik menyediakan unsur-unsur hara makro (N, P, K, Ca, Mg, dan Na) dan unsur-unsur hara mikro (B, Co, Mn, I, Fe, Zn, dan Cu). Kecocokan media akan menentukan keberhasilan eksplan merespon, tumbuh dan berkembang (Dodds dan Robert, 1982).

Menurut Wetherell (1982), komponen pokok medium meliputi makronutrien, mikronutrien, sumber karbon, hormon, vitamin, asam amino dan asam-asam organik (Wetter dan Constabel, 1991), air dan agar (Pierik, 1987). Medium MS sebagai medium universal yang paling banyak dimanfaatkan. Hal ini sejalan dengan pendapat Mardin, (2002) yang mengatakan bahwa media MS merupakan media yang sangat luas pemakaiannya karena mengandung unsur hara makro dan mikro yang lengkap sehingga dapat digunakan untuk berbagai jenis tanaman. Marlina (2004) menerangkan media MS sering digunakan karena cukup memenuhi unsur hara mikro, makro dan vitamin untuk pertumbuhan tanaman.

Media kultur jaringan sering ditambahkan senyawa organik untuk menghemat bahan kimia, fungsi lainnya penambahan senyawa yaitu mendorong pertumbuhan eksplan (Gamborg dan Shyuk, 1981). Pertumbuhan eksplan lainnya tergantung pada interaksi antara Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) eksogen yang ditambahkan ke media. ZPT pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara, yang dalam jumlah sedikit mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan.

Menurut Gunawan (1992) media kultur jaringan dibedakan menjadi 2 yaitu media dasar dan media perlakuan. Media dasar yang sering digunakan untuk teknik kultur jaringan adalah media dasar *Murashige dan Skoog* atau MS(1962).

Media *Murashige dan Skoog* yang sering digunakan mengandung unsur-unsur hara makro dan mikro yang diperlukan tanaman untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Media untuk kultur jaringan selain memerlukan unsur hara juga memerlukan bahan organik lain seperti gula, vitamin, asam amino, myo-inositol, zat pengatur tumbuh, dan bahan organik kompleks alami.

Media MS adalah yang paling luas penggunaannya dibandingkan dengan media dasar lainnya, terutama pada mikropropagasi tanaman dikotil dengan hasil yang memuaskan. Media MS memiliki kandungan garam-garam yang lebih tinggi daripada media lain, disamping kandungan nitratnya juga tinggi (Zulkarnain, 2009).

Tiga jenis media dalam kultur jaringan, yaitu media padat, semi padat dan media cair. Unsur-unsur hara yang terkandung dalam ketiga media tersebut sama, yang membedakan adalah penggunaan pematid agar pada media padat dan semi padat. Pemilihan media kultur jaringan tergantung pada spesies tanaman, jaringan atau organ yang akan digunakan dan tujuan dilakukannya kultur jaringan tanaman. Proses perakaran lebih baik dilakukan pada media padat sampai terbentuk tanaman lengkap. Pembentukan bagian tanaman (morfogenesis) langsung maupun tidak langsung tergantung pada jenis dan konsentrasi yang tepat dari senyawa organik, anorganik dan zat pengatur tumbuh dalam suatu media kultur, sedangkan media cair umumnya digunakan untuk keperluan suspensi sel, keperluan isolasi dan fusi protoplas (Gunawan, 1992).

Pemakaian agar merupakan hal yang terpenting mengingat jaringan eksplan harus kontak dengan media tanpa harus tenggelam di dalamnya. Penggunaan agar

sebagai pematat dilakukan agar aerasi lebih mudah. Media pematat yang sering dipakai dan berhasil dengan baik adalah agar, gelatin, dan gel yang merupakan turunan dari pati dan silica gel (Wetherell, 1982). Adapun komposisi medium kultur jaringan tanaman adalah sebagai berikut:

Air merupakan komponen yang penting di dalam pengkulturan eksplan karena 95% dari medium mengandung air. Tujuan penelitian, digunakan air destilasi, dan untuk penelitian dengan materi eksplan dari protoplas, meristem dan sel sebaiknya digunakan aquabides (Welsh 1991). Air destilasi (air suling) tersebut telah steril dari kontaminasi mikroorganisme atau substansi yang dapat merusak proses perkembangan eksplan (Katuuk, 1989).

Tiap tanaman memerlukan setidaknya 6 elemen makronutrien, yaitu unsur yang diperlukan dalam jumlah besar meliputi N, K, Mg, Ca, S, P dan 7 elemen mikronutrien, yaitu unsur yang diperlukan dalam jumlah kecil meliputi Fe, Mn, B, Mo, Cl (Wetherell, 1976). Unsur makro biasanya diberikan dalam bentuk NH_4NO_3 , KNO_3 , CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ dan KH_2PO_4 , sedangkan unsur mikro biasanya diberikan dalam bentuk $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , $4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI, Na_2MoO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$, $5\text{H}_2\text{O}$ dan CoCl_2 , $6\text{H}_2\text{O}$ (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Senyawa kimia organik yang biasa dipakai sebagai sumber energi dalam kultur *in vitro* adalah karbohidrat. Karbohidrat tersusun atas unsur-unsur C, H, O sebagai elemen penyusun utama. Bahan-bahan organik yang termasuk karbohidrat meliputi gula, pati dan selulosa. Karbohidrat mempunyai dua fungsi utama yaitu sebagai sumber energi untuk jaringan dan untuk keseimbangan tekanan osmotik

dalam medium. Karbohidrat yang sering digunakan adalah sukrosa meskipun kadang-kadang diganti dengan glukosa (Wetherell, 1982). Menurut Yusnita (2003), glukosa dan fruktosa dapat digunakan tetapi harganya lebih mahal hasilnya tidak selalu lebih baik daripada sukrosa. Konsentrasi sukrosa yang digunakan berkisar 1-5% (10-15 g l⁻¹), tetapi untuk kebanyakan pengkulturan konsentrasi optimum sukrosa adalah 2-3%. Menurut Wetherell (1982), kadar sukrosa untuk keperluan pengkulturan berkisar antara 2-4%. Menurut Suryowinoto (1996), kadar sukrosa yang digunakan sebagai sumber energi untuk menginduksi pertumbuhan eksplan dalam medium adalah 2-7%. Katuuk (1989), menyatakan bahwa sukrosa bersifat labil terhadap suhu tinggi sehingga apabila disterilkan dalam autoklaf bersama-sama zat lain akan mengakibatkan penguraian sukrosa menjadi kombinasi antara sukrosa, D-glukosa, dan D-fruktosa. Keuntungan dari penguraian ini adalah terbentuknya aldosa (D-glukosa) dan ketosa (D-fruktosa) yang melimpah ruah, sehingga gula pereduksi yang berfungsi mereduksi indikator-indikator seperti ion kupri (Cu²⁺) menjadi bentuk kupro (Cu⁺) yang bermanfaat pada perkembangan dan perbaikan (Stryer, 1996).

Vitamin adalah bahan yang perlu ditambahkan dalam medium kultur *in vitro*, sebab sel bagian tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* belum mampu membuat vitamin sendiri untuk kehidupannya (Katuuk, 1989). Vitamin yang sering ditambahkan ke dalam medium adalah tiamin (vitamin B1), asam nikotinat (niasin), piridoksin (vitamin B6), riboflavin (vitamin B2), biotin, vitamin C (asam askorbat), vitamin E dan *myo-inositol* sebagai zat suplemen karena bermanfaat mendorong pertumbuhan dan morfogenesis (George dan Sherrington, 1984).

Menurut Wetherell (1982), vitamin berfungsi sebagai katalisator, stimulator pertumbuhan dan meminimalkan stress eksplan dalam kultur. Hendaryono dan Wijayani (1994), menambahkan bahwa tiamin adalah vitamin essensial untuk hampir semua kultur jaringan tumbuhan.

Fungsi tiamin adalah untuk mempercepat pembelahan sel pada meristem akar dan juga berperan sebagai koenzim dalam reaksi yang menghasilkan energi dari karbohidrat. Vitamin C berlaku sebagai antioksidan atau mencegah terjadinya pencoklatan (*browning*) yang disebabkan adanya oksidasi senyawa fenol (Wetherell, 1982). *Myo-inositol* merupakan heksitol (gula alkohol berkarbon enam) yang sering digunakan sebagai salah satu komponen media yang penting, karena terbukti merangsang pertumbuhan jaringan yang dikulturkan. *Myo-inositol* dapat digunakan pada konsentrasi 100-5.000 mg L⁻¹, tetapi paling efektif pada konsentrasi 100 mg L⁻¹ (Yusnita, 2003). Asam amino merupakan sumber nitrogen organik yang diperlukan untuk pertumbuhan eksplan. Asam amino yang sering digunakan adalah L-glutamin, asam aspartat, L-arginin, dan glisin (Yusnita, 2003). Jenis asam amino memberikan pengaruh yang berbeda untuk setiap jenis kultur. Asam amino memang membuktikan mempunyai pengaruh positif terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan (George dan Sherrington, 1984). Misalnya, L- sistein dapat mengurangi *browning* pada kultur jaringan tebu, seperti yang ditemukan oleh Liu (1981) dalam Gunawan (1987). Asam amino glisin merupakan komposisi tetap pada beberapa formulasi medium dengan konsentrasi 2 mg L⁻¹ (White, 1939 dalam Gunawan, 1987). Asam amino tirosin digunakan untuk menstimulasi morfogenesis kultur sel, tetapi harus digunakan pada medium

agar sedangkan adenin sulfat dapat menstimulasi pertumbuhan sel (Tores, 1989).

2.2.3 Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara, dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tanaman (Abidin, 1985). Zat pengatur tumbuh sangat diperlukan sebagai komponen medium bagi pertumbuhan dan diferensiasi sel eksplan. Tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dalam medium, pertumbuhan sangat terhambat, bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali. Setiap eksplan yang berasal dari organ dan spesies yang berbeda akan membutuhkan zat pengatur tumbuh yang berbeda pula (Narayanaswamy, 1994). Dijelaskan pula oleh Gunawan (1987) bahwa zat pengatur tumbuh mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan atau organ secara *in vitro*.

Perkembangan kultur ditentukan oleh interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diproduksi oleh sel tanaman secara endogen. Eksplan pada dasarnya terdapat zat pengatur tumbuh endogen tetapi sering kali pada medium ditambahkan zat pengatur tumbuh eksogen untuk pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang ditanam secara *in vitro*. Zat pengatur tumbuh (ZPT) adalah senyawa organik bukan nutrisi yang dalam konsentrasi rendah ($<1 \mu\text{M}$) mampu mendorong, menghambat atau secara kualitatif mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Zat Pengatur Tumbuh banyak digunakan di dalam praktek kultur jaringan. Semua hormon tanaman sintetik atau senyawa sintetik yang mempunyai sifat fisiologis dan biokimia yang serupa dengan hormon tanaman adalah ZPT. Pada saat ini dikenal 6 kelompok ZPT, yaitu: auksin,

giberelin (GA), sitokinin, asam absisit (ABA), etilen, dan retardan (Armini, 1991). Zat Pengatur Tumbuh mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan, dan organ. Interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan yang diproduksi secara endogen oleh sel dapat menentukan arah perkembangan suatu kultur.

Zat Pengatur Tumbuh yang sering dipakai dalam kultur jaringan yaitu auksin dan sitokinin. Salah satu ZPT yang digolongkan auksin yaitu 2,4-D. Peran auksin adalah merangsang pembelahan dan pembesaran sel yang terdapat pada pucuk tanaman dan menyebabkan pertumbuhan pucuk baru. Penambahan auksin pada jumlah yang lebih besar, atau penambahan auksin yang lebih stabil, seperti asam 2,4-D cenderung menyebabkan terjadinya pteumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi pusuk tanaman (Wetherell, 1987). Pemakaian zat pengatur tumbuh asam 2,4-D biasanya digunakan dalam jumlah yang kecil dan dalam waktu singkat, antara 2-4 minggu karena pemakaian auksin kuat artinya auksin ini dapat diuraikan di dalam tubuh tanaman (Hendrayono dan Wijayani, 1994). Sebab pada dosis tertentu asam 2,4-D sanggup membuat mutasi-mutasi (Suryowinito, 1996).

Sitokinin adalah senyawa yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sama halnya dengan kinetin (Zulkarnain, 2009). Sitokinin berperan merangsang pertumbuhan sel dalam jaringan yang disebut eksplan dan merangsang pertumbuhan tunas daun (Wetherell, 1987).

Penentuan ZPT yang akan digunakan memerlukan pengetahuan tentang cara menghitung dosis. Hal ini sangat penting karena apabila perhitungannya keliru dapat berakibat fatal bagi pertumbuhan tanaman. BAP adalah salah satu sitokinin yang banyak dipakai dalam kultur jaringan. Zat pengatur tumbuh ini menunjukkan pengaruh yang beragam terhadap pembentukan tunas. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan Nofiyanti (2007) bahwa perlakuan IBA dan BA mampu menumbuhkan tunas dan daun *Jatropha curcas* L tetapi tidak mampu menumbuhkan akar, demikian halnya dengan kalus juga tidak berkembang. Pada penelitian Hanifah (2007) mengungkapkan bahwa induksi kalus tercepat terdapat pada media dengan penambahan NAA 0,5 ppm dan BAP 1 ppm (N2B2) dan penambahan NAA 0,5 ppm dan BAP 2 ppm (N2B3).

2.2.4 2,4 Dikloro fenoksiasetat (2,4-D)

Auksin sangat dikenal sebagai hormon yang mampu berperan menginduksi terjadinya kalus, mendorong proses morfogenesis kalus membentuk akar atau tunas, mendorong proses embryogenesis, dan dapat mempengaruhi kestabilan genetik sel tanaman (Santoso dan Nursandi, 2003). Menurut Wattimena (1998), auksin alamiah yang sering terdapat pada tumbuhan adalah IAA (Asam 3-indol Asetat). Unsur IAA disintesis dari triptopan pada bagian tanaman tertentu yaitu primordial daun, daun muda dan biji yang sedang berkembang. Sedangkan auksin sintetik yang sering digunakan adalah asam 2,4-D, NAA (Asam α -Naftalen Asetat), dan IBA (Asam 3-Indol Butirat).

Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D merupakan senyawa berbentuk kristal putih dan tidak berbau dengan titik leburnya 140,5⁰C dan mendidih pada suhu 160⁰C.

2,4 Dikloro fenoksiasetat sukar larut dalam air, dengan mereaksikan 2,4-D dengan garam dapat dibuat menjadi sangat larut, bersifat cepat larut dan menyebar merata di dalam air tanpa memerlukan pengadukan terus-menerus. 2,4 Dikloro fenoksiasetat merupakan golongan fenoksi, memiliki rantai yang mempunyai gugus karboksil dipisahkan oleh karbon atau karbon dan oksigen sehingga memberikan aktivitas yang optimal. 2,4-D datang dalam berbagai bentuk kimia, termasuk garam, ester, dan bentuk asam. Nama bahan aktifnya antara lain : asam 2,4-D butil sihalofop; 2,4-D amina; 2,4-D butil ester; 2,4-D dimeti amina; 2,4-D IBE; 2,4-D iso propil amina dan 2,4-D natrium. Struktur Kimia 2,4-D (Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat) :

Asam 2,4-D adalah salah satu auksin (hormon tumbuhan) yang berperan dalam pertumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi pucuk tanaman. 2,4-D adalah auksin jenis sintesis yang sering digunakan di laboratorium untuk berbagai penelitian tanaman dan biasanya digunakan sebagai suplemen di pabrik kultur sel media seperti media MS.

2.2.5 Benzil Amino Purin (BAP)

Umumnya di dalam suatu percobaan kultur jaringan dipergunakan BAP dan kinetin yang jauh lebih murah dan tahan terhadap degradasi (Armini, 1991). Menurut Wattimena (1988) BAP merupakan ZPT yang tergolong sitokinin sintetik yang memiliki berat molekul sebesar 225,26 dengan rumus molekul $C_{12}H_{11}N_5$, yang dalam penggunaannya dipengaruhi oleh ZPT lainnya. Kosmiatin dkk (2005) melaporkan bahwa media kultur yang berisi 1 mg L^{-1} BAP

menghasilkan induksi dan multiplikasi tunas terbaik pada perbanyakan dan perkecambahan gaharu secara *in vitro*.

2.2.6 Interaksi Sitokinin (BAP) dan Auksin (2,4-D)

Skoog dan Miller (1957), mengemukakan bahwa regenerasi tunas dan akar *in vitro* dikontrol secara hormonal oleh sitokinin dan auksin. Organogenesis adalah proses terbentuknya organ seperti tunas dan akar, baik secara langsung dari permukaan eksplan atau secara tidak langsung melalui pembentukan kalus terlebih dahulu.

Zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan dalam kultur jaringan adalah auksin dan sitokinin. Perbandingan auksin dan sitokinin yang seimbang pada eksplan dapat menghasilkan pertumbuhan kalus (Davies, 1990). Zat pengatur tumbuh yang digolongkan auksin adalah asam 2,4-D. Wetherell (1982) menyebutkan bahwa peran auksin adalah merangsang pembelahan dan perbesaran sel yang terdapat pada pucuk tanaman menyebabkan pertumbuhan pucuk-pucuk baru. Penambahan auksin dalam jumlah yang lebih besar, atau penambahan auksin yang lebih stabil, seperti asam 2,4-D cenderung menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi pucuk tanaman.

2.3 Perkembangan Kalus

Induksi kalus merupakan metode kultur jaringan yang dilakukan dengan memacu pembelahan sel secara terus menerus dari bagian tanaman tertentu seperti tunas, daun, akar, batang. Tahap induksi kalus ini akan terbentuk massa sel (kalus) dengan menggunakan zat pengatur tumbuh (ZPT). Tahap ini kalus pertama akan

muncul. Munculnya kalus akan terlihat dari bagian yang terluka, yaitu pada bagian bekas irisan dan akan menyebar pada permukaan luar eksplan. Munculnya kalus ditandai dengan adanya gumpalan-gumpalan sel yang berwarna putih kehijauan yang akan berkembang membentuk massa sel yang disebut kalus (Bustami, 2011)

Tahap proliferasi merupakan tahap sel-sel terus membelah dengan cepat, hal ini dimungkinkan karena sel-sel tumbuhan yang secara alamiahnya bersifat autotrof dikondisikan menjadi heterotrof oleh adanya nutrisi yang cukup kompleks dan zat pengatur tumbuh didalam medium kultur. Kalus selain dapat muncul akibat luka bekas irisan, namun dapat berasal dari pembelahan sel-sel kambium yang terus membelah dan berproliferasi. Kalus pada tahap induksi dapat di pindahkan ke dalam media proliferasi pada 7-14 HSI. Pada tahap ini akan terlihat lebih jelas bentuk dari kalus, tekstur kalus, ukuran kalus, dan warna kalus.

Tahap regenerasi kalus, Tahap ini merupakan langkah awal bagi perbanyakan *vegetative* dengan teknik kultur *in vitro* karena merupakan dasar terjadinya primordia tunas dan akar. Biasanya struktur kalus menggambarkan daya regenerasinya membentuk tunas dan akar. Kalus yang berbentuk globular (nodul-nodul) dan berwarna bening biasanya mempunyai kemampuan lebih tinggi untuk membentuk tunas daripada kalus yang bersifat kompak dan berwarna coklat-kehitaman. Media yang digunakan untuk memacu regenerasi kalus akan sangat menentukan. Keseimbangan nutrisi dalam media tumbuh sangat mempengaruhi pertumbuhan kalus maupun diferensiasinya membentuk tunas (Wattimena, 1992). Pemilihan zat pengatur tumbuh merupakan salah satu faktor

yang sangat menentukan diferensiasi jaringan tanaman yang dikulturkan. Meningkatkan keberhasilan regenerasi dan laju pertunasan, selain sitokinin ada beberapa komponen senyawa organik lainnya yang mempunyai pengaruh fisiologis yang sama terhadap proses pertunasan, salah satunya yaitu thidiazuron (Purnamaningsih, 2006).

Cara regenerasi kalus menjadi tunas ada dua yaitu beregenerasi melalui jalur organogenesis yang membuat kalus dapat langsung membentuk tunas dan akar. Sedangkan regenerasi melalui jalur *embryogenesis* akan melewati 2 tahapan yaitu tahap pendewasaan dan tahap perkecambahan sebelum terbentuk tunas dan akar. Hal ini akan membuat kalus mempunyai 2 calon meristem yaitu meristem tunas dan meristem akar. Apabila setelah 4 hari kalus tidak dipindahkan pada media regenerasi maka daya regenerasinya akan menurun atau hilang (Purnamaningsih, 2006).

Tahap perakaran kalus, Tunas yang dihasilkan selanjutnya dipindahkan ke dalam media perakaran kalus. Pembentukan akar ditandai dengan terbentuknya tonjolan sel-sel berwarna putih pada permukaan kalus dan selanjutnya membentuk organ berbentuk silinder (Bustomi, 2011).