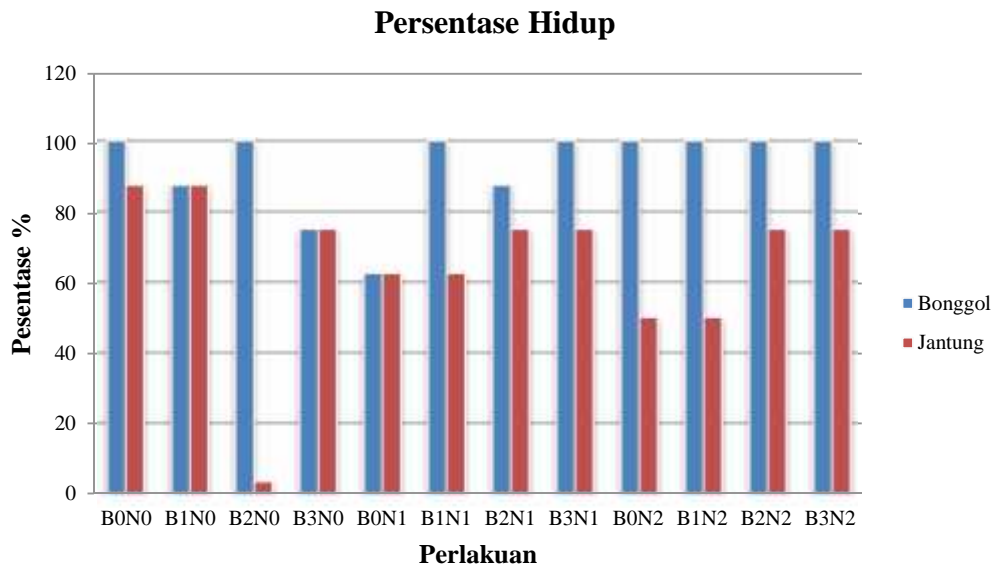


IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kondisi Umum Kultur

Eksplan pisang yang dikultur secara *in vitro* menunjukkan respon pertumbuhan setelah 1 minggu tahap perlakuan. Eksplan terus mengalami pertumbuhan sampai minggu ke 12, ditandai dengan tumbuhnya tunas, daun, akar dan nodul. Eksplan pisang Rotan menunjukkan gejala hidup dicirikan dengan warna hijau muda, tegar, dan tidak mengalami vitrifikasi, bebas kontaminasi serta pencoklatan. Persentase hidup kultur sampai dengan 8 MST dari kedua jenis eksplan dalam tahap perlakuan dengan jumlah ulangan masing-masing perlakuan berjumlah 10 botol terlihat pada Gambar 4.1.



Gambar. 4.1. Histogram persentase hidup

Gambar histogram menunjukkan, secara umum pada semua perlakuan terlihat bahwa, pada eksplan bonggol persentase hidup lebih tinggi dibandingkan

dengan eksplan jantung. Hal ini diduga oleh jaringan bonggol yang berlapis-lapis serta resisten terhadap zat kimia berat seperti Natrium Hipoklorit pada proses sterilisasi didalam enkarkas, sehingga jaringan masih dapat tumbuh dan lebih steril. Sedangkan pada eksplan jantung metode sterilisasi yang digunakan lebih sederhana, proses sterilisasinya hanya dicelupkan dengan larutan Iodin konsentrasi rendah karena jaringan meristem pada jantung mudah rusak oleh zat kimia keras serta tidak dapat dikelupas seperti pada bonggol pisang, sehingga persentase tumbuhnya rendah akibat eksplan banyak yang mati, mengalami kontaminasi, *blackening*, dan *browning*.

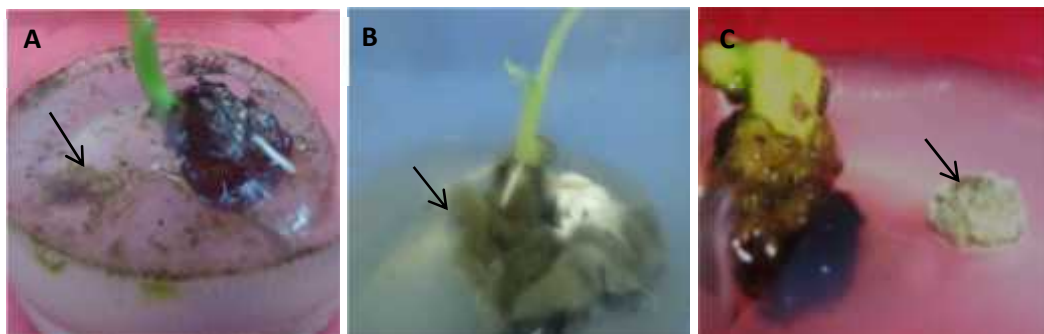
Persentase hidup tertinggi pada penelitian ini mencapai 100 % (pada perlakuan eksplan bonggol kontrol, BAP 5 ppm + NAA 0 ppm, BAP 3 ppm + NAA 1,5 ppm, BAP 7 ppm + NAA 1,5 ppm, BAP 0 ppm + NAA 2 ppm, BAP 3 ppm + NAA 2 ppm, BAP 5 ppm + NAA 2 ppm, BAP 7 ppm + NAA 2 ppm) dengan persentase hidup terendah yaitu 60 % (BAP 0 ppm + NAA 1,5 ppm). Persentase hidup eksplan jantung tertinggi adalah 87,5% dan terendah 3,5 %, angka ini lebih rendah dibandingkan dengan persentase hidup eksplan bonggol. Menurut Darmayanti (2004), nomor braktea berpengaruh terhadap fenomena *browning* dan persentase hidup eksplan serta kalus yang berasal dari jantung, nomor braktea yang semakin dalam memberikan hasil terbaik dalam persentase tumbuh maupun dalam penampakan morfologinya.

Kontaminasi kultur *in vitro* adalah tumbuhnya mikroba yang tidak dikehendaki (kontaminan) pada media maupun eksplan selama inkubasi, kultur dapat terinfeksi satu atau lebih mikroba seperti bakteri, fungi berfilamen, *yeast*, virus dan fitoplasma (Putri, 2009; Nisa dan Rodinah 2005). Kontaminasi kultur

pada penelitian ini mulai terjadi pada 2 MST sampai dengan 4 MST, persentase kontaminasi terbesar terjadi pada 2 MST yaitu sebesar 6,25 % (3 MST).

Jenis kontaminasi yang ditemukan disebabkan oleh jamur serta bakteri yang menyerang kultur bonggol maupun kultur jantung. Kontaminasi bakteri ditandai dengan terbentuknya hifa berwarna putih sampai kecoklatan terlihat jelas pada media dan eksplan diselimuti oleh spora berbentuk kapas berwarna putih sedangkan kontaminasi jamur ditandai dengan adanya lendir pada media gumpalan yang basah (Nisa dan Rodinah, 2005).

Kontaminasi dapat terjadi disebabkan oleh beberapa faktor antara lain metode sterilisasi, eksplan dan alat. Menurut Aryani (2013) kontaminan akan tumbuh dengan cepat pada media yang mengandung gula, vitamin dan mineral bila faktor kontaminasi tidak dihilangkan. Berikut Gambar 4.2. kultur yang terkontaminasi cendawan dan bakteri.

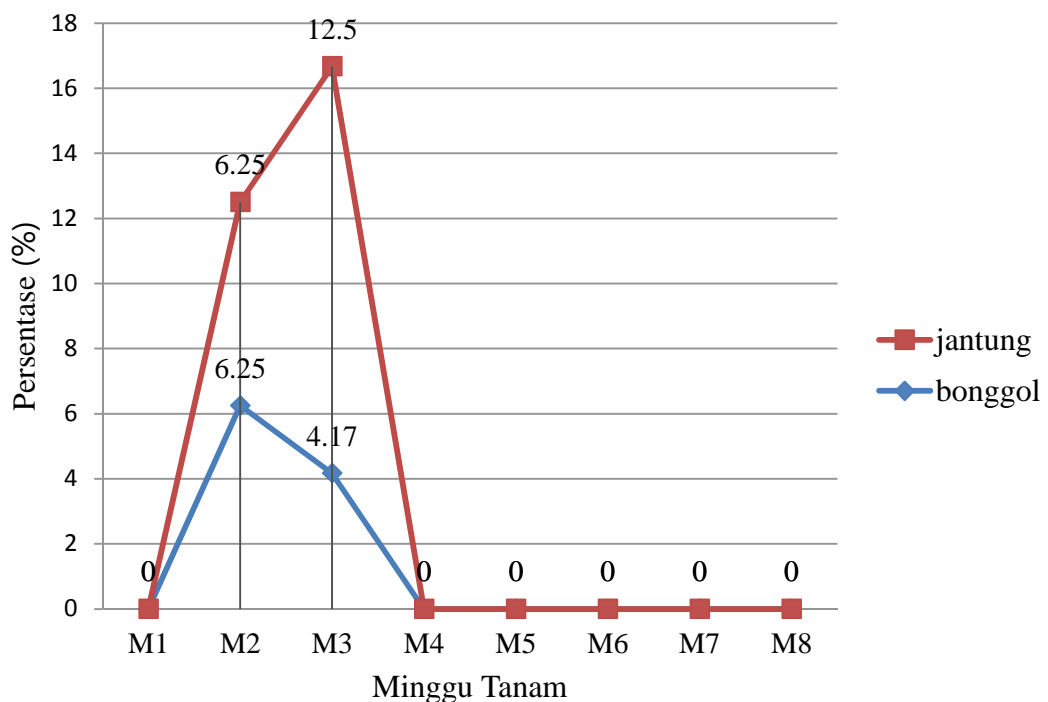


Gambar 4.2. Jenis kontaminasi pada (a) kontaminasi bakteri hijau pada eksplan bonggol, (b) cendawan pada eksplan bonggol, (c) kontaminasi cendawan pada eksplan jantung

Kontaminasi keseluruhan pada tahap perlakuan eksplan bonggol lebih rendah (10 %) dibandingkan dengan eksplan meristem jantung sebesar (18,35%) hal ini lebih baik dari yang dilaporkan oleh Nisa dan Rodinah, (2005) dalam penelitiannya terjadi kontaminasi sebesar 87 % pada penggunaan eksplan jantung

beberapa kultivar pisang. Gambar 4.2, memperlihatkan meskipun di lapangan eksplan bonggol berada di dalam tanah dan rentan terserang patogen namun persentase kontaminasinya lebih sedikit dibandingkan dengan ekplan jantung yang berada di atas.

Rainiyati *et al.*, (2005) juga mengatakan permasalahan awal yang muncul pada mikropopagasi pisang adalah mencari metoda sterilisasi eksplan yang tepat agar tidak terjadi kontaminasi pada eksplan. Mengingat eksplan pisang Rotan yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari lapang yang banyak mengandung mikroorganisme. Pada kenyataannya sangat sulit sekali untuk menghasilkan eksplan yang benar-benar steril dan bebas dari mikroorganisme. Berikut merupakan grafik persentase kontaminasi.

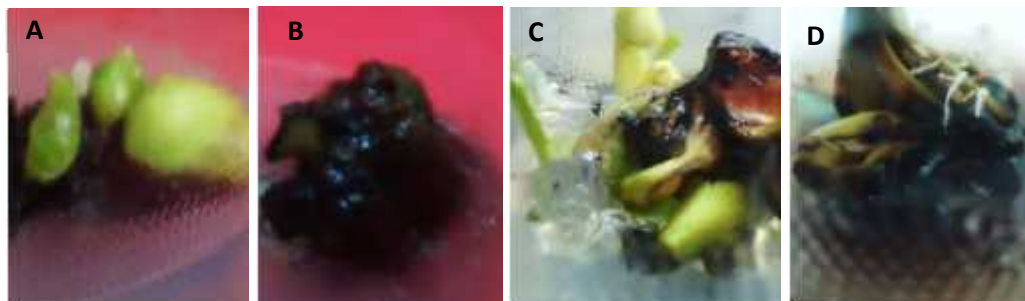


Gambar 4.3. persentase kontaminasi kultur sampai 8 MST

Grafik pada Gambar 4.3. terlihat kontaminasi pada kedua jenis eksplan terjadi mulai 2 MST hingga 4 MST sedangkan pada minggu selanjutnya eksplan sudah stabil dan tidak terjadi kontaminasi. Fenomena lain yang sering terjadi pada perbanyakan mikro (*micropopagation*) adalah terjadinya pencoklatan (*browning*) dan penghitaman (*blacking*) terutama eksplan yang digunakan berasal dari jaringan tanaman berkayu dan tanaman yang mengandung banyak zat ekstraktif berupa alkaloid.

Beberapa macam tanaman khususnya tanaman tropika mempunyai kandungan senyawa fenol yang tinggi yang teroksidasi ketika sel dilukai atau terjadi *senesens* (George & Sherrington 1984). Akibatnya jaringan yang diisolasi menjadi coklat atau kehitaman dan gagal tumbuh. Pencoklatan jaringan terjadi karena aktivitas enzim *oksidase* yang mengandung tembaga seperti *polifenol oksidase* dan *tirosinase* (Hutami, 2008).

Peristiwa *browning* ini mulai terlihat dalam 1 (satu) minggu setelah waktu inokulasi dan berlanjut pada minggu berikutnya, *browning* seperti pada Gambar 4.4. ditandai dengan perubahan warna eksplan dan media menjadi coklat di sekitar tepi jaringan eksplan yang mengalami pelukaan saat proses inokulasi.



Gambar 4.4. Proses browning pada eksplan (A) kalus kehijauan pada eksplan jantung (B) kalus *browning* pada jantung, (C) eksplan bonggol kehijauan (D) eksplan bonggol mengalami *browning*

Browning dapat terjadi sebagai akibat dari tingginya kandungan senyawa fenolik yang terbentuk serta menutupi permukaan kalus. Nisa dan Rodinah (2005) juga mendapatkan beberapa eksplan yang mati akibat pencoklatan (*browning*). Pencoklatan salah satunya disebabkan oleh sintesis metabolit sekunder.

Sintesis senyawa fenolik yang menutupi permukaan eksplan berasal dari bagian tanaman yang mengalami luka dan apabila keadaan ini berlangsung terus-menerus, maka akan terakumulasi dalam media sehingga menyebabkan terhambatnya penyerapan unsur-unsur hara oleh eksplan menghambat pertumbuhan eksplan khususnya kalus, bahkan pada kultur yang lebih lanjut dapat menyebabkan kematian eksplan. (Marlin *et al.*, 2012; Santosa & Nursandi 2002; Vickery & Vickery, 1980)

Beberapa upaya yang telah dilakukan untuk mengurangi resiko *browning* pada eksplan, pada tahap sterilisasi sebelum eksplan tersebut ditanam diliri dengan air selama 15 menit (Marlin *et al.*, 2008) dengan harapan agar senyawa fenolik yang terkandung dalam jaringan eksplan dapat tereduksi sehingga mampu mengurangi resiko terjadinya masalah *browning* pada saat pertumbuhan eksplan selama dalam botol kultur. Selain itu juga dilakukan pemindahan berulang pada media yang berbeda sebelum tanaman mengalami kematian. Hutami mengatakan (2008) untuk menghindari pembentukan fenol yang paling umum adalah dengan mentransfer eksplan ke media baru.

Browning dan *blackening* juga terjadi pada eksplan bonggol, namun persentasenya hanya sedikit, pada tahap perlakuan *browning* eksplan bonggol pisang Rotan ditemukan sebesar 5,9% dimana dari 84 botol yang ditanam 6 diantaranya mengalami pencoklatan selama kurang lebih satu minggu dan minggu

selanjutnya eksplan mengalami kematian (*blackening*). sedangkan pada tahap pemindahan peristiwa *browning* dan *blackening* tidak ditemukan.

Persentase *browning* jantung lebih tinggi dibandingkan dengan eksplan bonggol, pada tahap perlakuan eksplan mengalami *browning* sebesar 59% dimana dari 84 eksplan/botol yang ditanam 50 botol diantaranya mengalami *browning* pada 8 MST, minggu selanjutnya eksplan mengalami *blackening* sampai pada tahap pemindahan.

Browning terus terjadi hingga tahap pemindahan, kalus yang terbentuk pada eksplan yang awalnya masih berwarna putih kehijauan berubah menjadi coklat pada 9 MST, selanjutnya pada 12 MST kalus pada tahap pemindahan mengalami kematian. Peristiwa kematian kalus ini diduga karena waktu inisiasi dibiarkan terlalu lama pada tahap perlakuan, karena pada tahap perlakuan khususnya pada minggu ke 1 MST – 6 MST morfologi kalus yang terbentuk masih baik, kompak, arna kehijauan dan eksplan membengkak.

Marlin *et al.* (2012), melaporkan dalam induksi kalus bunga pisang *Curup* dengan menggunakan BAP dan 2,4-D, bahwa persentase hidup eksplan sangat tinggi (100%) ternyata tidak diikuti dengan pertumbuhan eksplan yang maksimal. Pertumbuhan eksplan selama periode kultur memerlukan waktu yang relatif lebih lama dalam membentuk kalus dan pada beberapa bagian eksplan menunjukkan gejala *browning*. Gejala pencoklatan pada kultur apabila dibiarkan terlalu lama maka menyebabkan kematian eksplan.

Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan eksplan pada beberapa media perlakuan menunjukkan respon dan tipe pertumbuhan kultur yang berbeda, pada beberapa perlakuan, misalnya pada kontrol pertumbuhan tunas terjadi melalui

morfogenesis secara langsung (Gambar 4.5a), dimana eksplan tumbuh langsung membentuk tunas disusul akar dan pertumbuhan daun, sedangkan pada perlakuan atau kombinasi lainnya tipe pertumbuhan kultur beragam seperti tumbuhnya nodul, tunas mikro tanpa akar, eksplan membengkak dan tunas mikro berakar (Gambar 4.6b)

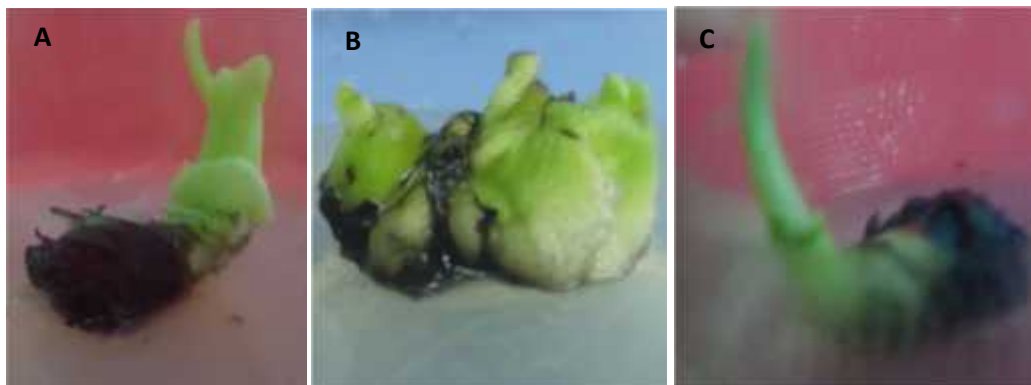
Dhaliwal *et al.*, (2003) menyatakan bahwa proses organogenesis eksplan secara *in vitro* terjadi dengan dua cara yang berbeda yaitu secara langsung dan tidak langsung. Eksplan menunjukkan respon organogenesis secara tidak langsung apabila eksplan tumbuh melalui kalus atau nodul, kemudian akan berdiferensiasi menjadi tunas dan akar. Eksplan menunjukkan respon secara organogenesis langsung apabila eksplan tumbuh langsung membentuk tunas dan akar, tanpa melalui pembentukan kalus atau nodul. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Darmayanti (2004) eksplan bunga pisang batu [*Musa balbisiana* (BB)] pada media dengan penambahan *Putresin* dapat tumbuh menjadi kalus *androgenic*, Sitohang (2005) melaporkan bahwa dalam kultur meristem pisang Baarangan (*Musa acuminata* L.) dengan mengkombinasikan BAP, IBA dan NAA juga terjadi morfogenesis secara tidak langsung dimana eksplan mampu membentuk kalus dan nodul meskipun persentasenya tidak besar.

Pada pengamatan 1 MST setelah inisiasi kultur, eksplan tampak membengkak yang kemudian diikuti dengan merekahnya ujung eksplan. Selanjutnya setelah 2 minggu inisiasi kultur, calon tunas mikro pisang dapat terbentuk pada rekahan tersebut yang ditandai dengan munculnya ujung helaian daun. pertumbuhan penambahan jumlah daun terjadi 3-7 MST diikuti dengan pemanjangan batang serta pemanjangan daun. Selanjutnya pada pengamatan 8

MST, calon tunas mikro tersebut sudah berkembang menjadi tunas mikro dengan 2-3 helai daun. Bentuk normal, berwarna hijau cerah tanpa vitrifikasi.



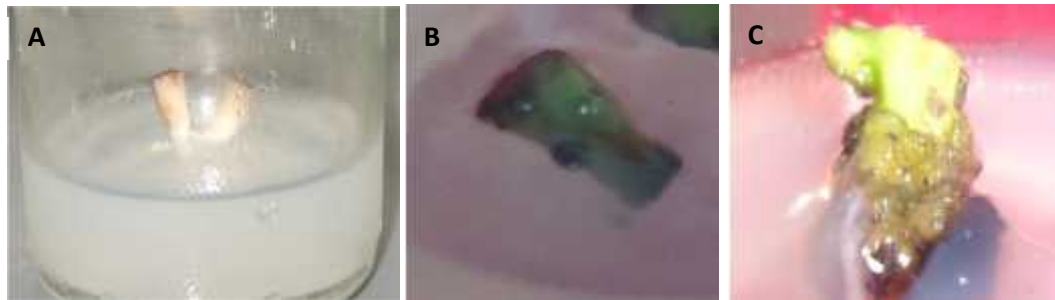
Gambar 4.5. Tahap Pertumbuhan (A) saat inokulasi pada media MS0, (B) tahap perlakuan, (C) munculnya tunas pada tahap perlakuan



Gambar. 4.6. Morfogenesis eksplan bonggol pisang Rotan pada tahap perlakuan: (A) eksplan membentuk tunas secara langsung, (B) eksplan bermorfogenesis secara tidak langsung dengan membentuk nodul, (C) eksplan dengan primordia daun

Pada tahap praperlakuan Gambar 4.6. eksplan jantung pisang yang merupakan jaringan meristem bunga yang diinokulasi menggunakan media MS0 tidak terjadi pertumbuhan yang signifikan, eksplan hanya mengalami perubahan warna dari putih menjadi kehijauan serta mengalami pembengkakan. Setelah eksplan didalam media perlakuan, eksplan baru menunjukkan respon pertumbuhan, dimana beberapa perlakuan dengan penambahan BAP dan NAA mulai mampu memunculkan kalus. Berikut adalah Gambar morfogenesis

eksplan pisang yang diinisiasi dari bagian meristematis jantung pisang Rotan (Gambar 4.7)



Gambar. 4.7. Morfogenesis eksplan jantung pisang Rotan : (A) 1 MST pada media MS eksplan berwarna putih, (B) 2 MST eksplan kehijauan pada tahap perlakuan, (C) 5 MST muncul kalus pada tahap perlakuan

Munculnya kalus pada eksplan jantung menandakan bahwa morfogenesis terjadi secara tidak langsung, secara umum eksplan jantung tidak mampu bertunas langsung, fenomena juga dilaporkan oleh Marlin *et al.* (2012) bahwa inisiasi eksplan jantung pisang *Curup* bermorfogenesis secara tidak langsung, eksplan hanya membentuk kalus dengan perlakuan penambahan sukrosa dan 2,4-D menghasilkan struktur eksplan yang remah dan hijau. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Pasaribu (2007) bahwa bunga pisang barangan dengan menggunakan 2.5 mg l^{-1} BAP dan 0.5 mg l^{-1} NAA juga menghasilkan kalus pada tahap awal inisiasi dan kultur jaringan beberapa kultivar buah pisang dengan pemberian NAA $0,8 \text{ mg l}^{-1}$ + kinetin 9 mg l^{-1} yang dilaporkan oleh Nisa dan Rodinah (2005)

4.2. Tahap Perlakuan dan Tahap Pemindahan Eksplan Bonggol

Rekapitulasi sidik ragam terhadap respon peubah yang diamati pada kultur pisang rotan eksplan bonggol ditunjukkan pada Tabel 4.1. Interaksi BAP dan

NAA berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah tunas baik pada tahap perlakuan maupun tahap pemindahan pada media MS0. BAP secara tunggal memberikan pengaruh sangat nyata terhadap jumlah tunas pada tahap perlakuan maupun pada tahap pemindahan. NAA secara tunggal berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah tunas daun jumlah daun baik tahap perlakuan maupun tahap pemindahan, serta memberikan pengaruh sangat nyata terhadap jumlah nodul pada tahap perlakuan. Sedangkan jumlah akar tidak dipengaruhi oleh BAP dan NAA serta interaksi keduanya.

Tabel 4.1 Rekapitulasi sidik ragam respon peubah yang diamati pada kultur pisang rotan eksplan bonggol pada tahap perlakuan (8 MST) dan tahap pemindahan pada media MS0 (12 MST)

| Peubah | Perlakuan | | | | | |
|--------------|------------------------|----|------------------------|----|------------------------|----|
| | BAP | | NAA | | BAP dan NAA | |
| | Perlakuan ^a | SK | Perlakuan ^a | SK | Perlakuan ^a | SK |
| Jumlah Tunas | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| Jumlah Daun | tn | tn | ** | ** | tn | tn |
| Jumlah Akar | tn | tn | tn | tn | tn | tn |
| Jumlah Nodul | tn | - | ** | - | tn | - |

tn : Tidak nyata pada uji F 5%
 ** : Sangat nyata pada uji F 5%
 a : data merupakan Hasil Transformasi (x+1)
 SK : Pemindahan
 - : parameter tidak dilakukan analisis sidik ragam

Parameter jumlah nodul pada tahap perlakuan tidak dapat dilakukan analisis sidik ragam dikarenakan pada minggu 12 MST tidak ditemukan nodul. umumnya nodul pada 12 MST sudah mampu berdeferensiasi menjadi tunas dan tidak terbentuk nodul baru.

4.2.1. Jumlah Tunas

Jumlah tunas merupakan faktor terpenting dalam multiplikasi tanaman pada kultur jaringan. Dalam kultur jaringan jumlah tunas dapat diindikasikan

sebagai keberhasilan dalam multiplikasi. Semakin banyak tunas yang terbentuk, dapat dilakukan multiplikasi kultur untuk mendapatkan tunas-tunas baru dalam jumlah yang semakin banyak pula.

a. Pengaruh Interaksi BAP dan NAA Terhadap Jumlah Tunas

Kombinasi BAP dan NAA berpengaruh nyata terhadap parameter jumlah tunas dimana jumlah tunas terbanyak dihasilkan pada perlakuan kombinasi BAP 5 ppm + NAA 1,5 ppm yaitu 7,5/eksplan selama 8 MST. (Tabel 4.2) selanjutnya pada tahap pemindahan perlakuan ini menghasilkan jumlah tunas yang lebih tinggi yaitu 10 tunas/eksplan selama 4 MST. Berbeda dengan kontrol yang hanya menghasilkan rata – rata 1,6 tunas/eksplan baik pada tahap perlakuan maupun pada tahap pemindahan. Peningkatan konsentrasi BAP 7 ppm dan NAA 2 ppm menurunkan jumlah tunas pada tahap perlakuan yaitu 3,8 tunas/eksplan. Ernawati *et al.*, (2005) menjelaskan bahwa konsentrasi BAP > 7 ppm pada planlet raja bulu jumlah tunasnya lebih sedikit dibandingkan dengan 3-6 ppm, diduga konsentrasi BAP yang supra optimal.

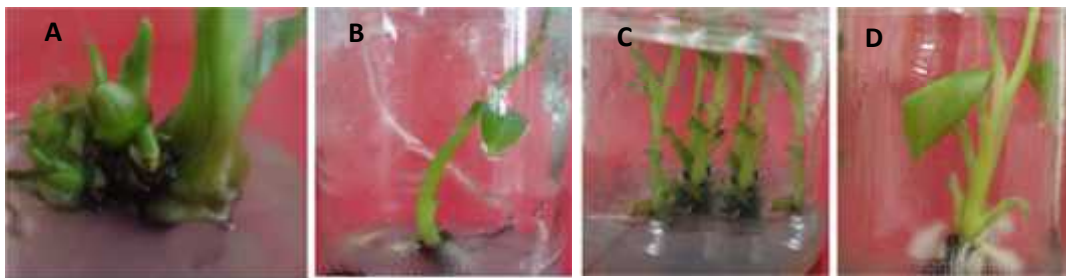
Tabel 4.2. Pengaruh pemberian kombinasi BAP dan NAA terhadap rata-rata jumlah tunas eksplan bonggol pada tahap perlakuan (8 MST) dan tahap pemindahan (12 MST)

| Tahap Perlakuan | | | | |
|------------------|-----------|---------|---------------|--------|
| NAA (ppm) | BAP (ppm) | | | |
| | 0 | 3 | 5 | 7 |
| 0 | 1,66 i | 2,33 h | 3,83 f | 2,50 g |
| 1,5 | 0,33 k | 6,33 c | 7,50 a | 3,66 d |
| 2 | 2,50 | 4,50 b | 6,16 b | 3,8 e |
| Tahap Pemindahan | | | | |
| 0 | 1,6 ef | 2,6 def | 4,5 dc | 3,7 de |
| 1,5 | 1,0 f | 8,3 ba | 10 a | 5,0 dc |
| 2 | 1,6 ef | 9,1 ba | 7,0 bc | 4,5 dc |

Keterangan: Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5% data tahap perlakuan merupakan hasil transformasi $\sqrt{x + 1}$

Sedikitnya tunas yang terbentuk pada kontrol karena tidak ada auksin dan sitokinin eksogen yang ditambahkan pada media, sehingga auksin dan sitokinin endogen hanya digunakan eksplan untuk pemanjangan batang dan pertambahan jumlah daun dan pemanjangan batang. Hal yang sama dilaporkan oleh Sitohang (2005) bahwa pertumbuhan tunas pada perlakuan kontrol (MS0) lebih sedikit dibandingkan dengan media perlakuan menggunakan kombinasi IBA, BAP dan Kinetin.

Tahap pemindahan pada media MS0 pada semua kombinasi BAP dan NAA terjadi penambahan jumlah tunas (Gambar 4.8), dikarenakan kandungan hormon endogen cukup tinggi sehingga pada medium segar tanpa hormon eksogen multiplikasi masih berlanjut.

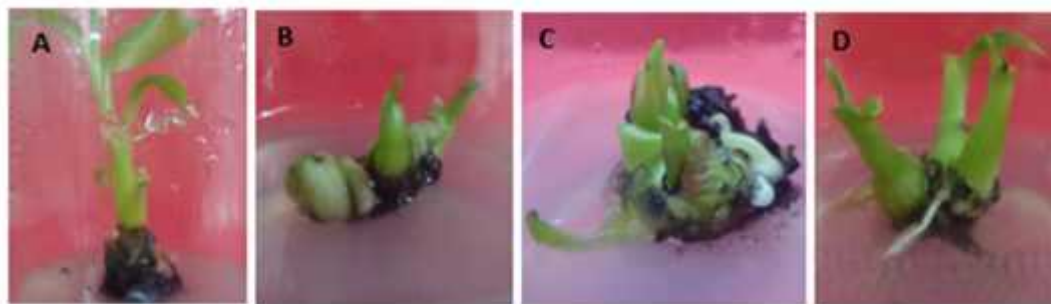


Gambar 4.8. Perbandingan Jumlah Tunas yang Dihasilkan pada tahap perlakuan Gambar (A,B) dan tahap pemindahan Gambar (C,D) : (A,C) BAP 5 ppm+ NAA 1,5 ppm dan (B,D) kontrol

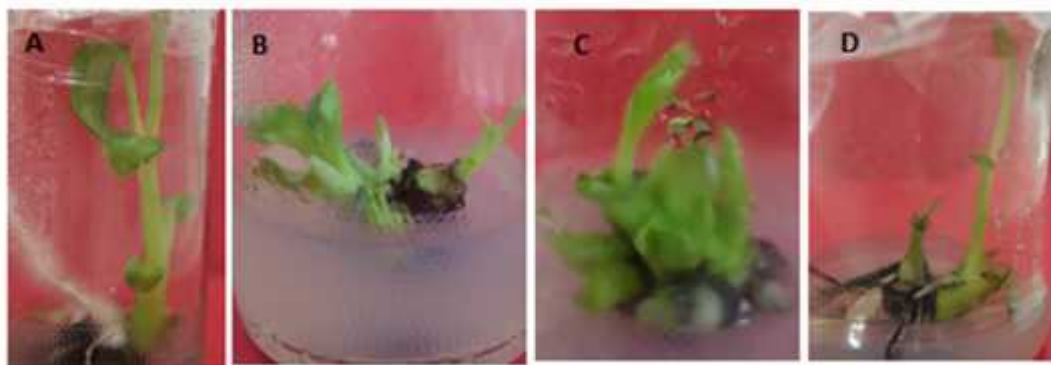
Secara umum perlakuan yang menghasilkan tunas sedikit memberikan ukuran tunas yang lebih tinggi, sedangkan perlakuan yang menghasilkan tunas terbanyak memberikan tunas yang lebih pendek. Menurut Lisan (2005), perbedaan tinggi tunas disebabkan unsur-unsur hara dan vitamin yang terdapat pada media terbagi untuk tunas-tunas yang tumbuh sehingga jumlah tunas yang banyak menyebabkan tinggi tunas terhambat.

Lakitan (1996) menyatakan bahwa pemanjangan batang tidak membutuhkan sitokinin dalam konsentrasi yang tinggi atau membutuhkan sitokinin eksogen dalam konsentrasi yang rendah, karena kandungan sitokinin endogen sudah mencukupi. Akibatnya penambahan sitokinin eksogen tidak lagi berpengaruh bahkan dapat menghambat pertumbuhan karena konsentrasi sitokinin menjadi eksekif (supra optimal). Setelah mencapai kadar optimal, peningkatan konsentrasi sitokinin dan auksin menghambat pertumbuhan (Aryani, 2013).

Tunas pada BAP 5 ppm + NAA 1,5 ppm mencapai 5,8 tunas/eksplan pada tahap perlakuan dan 7,3 tunas/eksplan pada tahap pemindahan seperti pada Gambar 4.6



Gambar. 4.9. Jumlah tunas pada BAP tunggal pada tahap perlakuan. (A). 0 ppm BAP (B). 3 ppm BAP (C) 5 ppm BAP (D) 7 ppm BAP

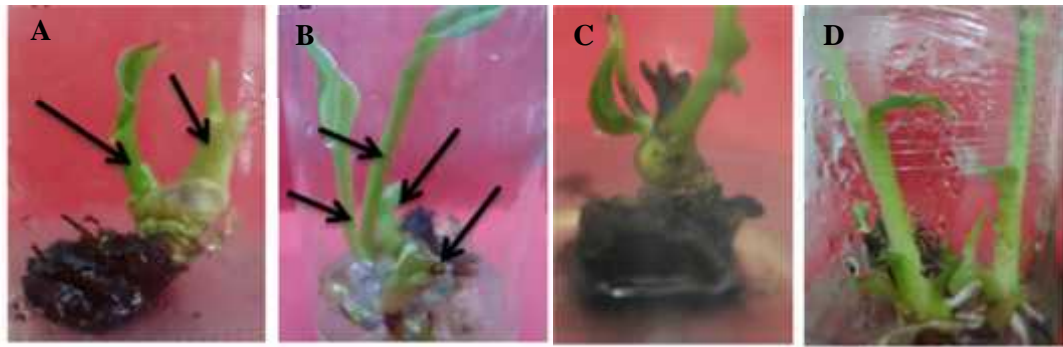


Gambar. 4.10. Jumlah tunas pada BAP tunggal pada tahap pemindahan. (A). 0 ppm BAP (B). 3 ppm BAP (C) 5 ppm BAP (D) 7 ppm BAP

Pemberian BAP 5 ppm + NAA 1,5 ppm menghasilkan jumlah tunas terbanyak (Tabel 4.2) sedangkan BAP 7 ppm menunjukkan penurunan jumlah tunas. Hal ini diduga karena adanya kandungan sitokinin endogen yang cukup tinggi pada eksplan, sehingga dengan penambahan BAP berkonsentrasi rendah sudah mampu merangsang tanaman untuk meregenerasikan tunas. Konsentrasi BAP 5 ppm juga merupakan konsentrasi terbaik untuk multipikasi tunas pisang Raja Nangka yang dilaporkan oleh Rainiyati *et al.*, (2009) .

Penurunan jumlah tunas pada BAP konsentrasi 7 ppm juga dilaporkan oleh Isnaeni (2008) pada perbanyakan mikro pisang Raja Bulu, bahwa penampakan planlet cenderung kurang normal, daun menggulung dan jumlah tunas lebih sedikit. Foncelle (1988) cit Meldia *et al.*, (1992) mengatakan bahwa konsentrasi BAP yang terlalu tinggi dapat merusak jaringan sehingga jaringan berwarna kecoklatan. Sebaliknya konsentrasi BAP yang terlalu rendah tidak dapat mendukung pertumbuhan eksplan. Konsentrasi BAP 5 ppm merupakan konsentrasi yang optimal untuk menghasilkan tunas terbanyak pada multipikasi pisang rotan

Pemberian NAA konsentrasi 2 ppm menghasilkan rata – rata 4,45 tunas/eksplan pada tahap perlakuan (8 MST) dan bertambah 6,28 tunas/eksplan pada tahap pemindahan pada media MS0 (12 MST). Jumlah tunas untuk perlakuan NAA tunggal pada perlakuan konsentrasi NAA 1,5 ppm rata-rata menghasilkan 4.45/eksplan sedangkan pada kontrol hanya tunas 2,58/eksplan pada tahap perlakuan dan menjadi 3,12 tunas/eksplan pada tahap pemindahan medium MS0.



Gambar 4.11. Perbandingan jumlah tunas yang dihasilkan pada tahap perlakuan (A,B) dan tahap Pemindahan (C,D) : (A,C) NAA 0 ppm dan (B,D) perlakuan NAA 2 ppm

Penambahan auksin atau sitokinin ke dalam media kultur dapat meningkatkan konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen di dalam sel, sehingga menjadi “faktor pemicu” dalam proses tumbuh dan perkembangan jaringan. Untuk memacu pembentukan tunas dapat dilakukan dengan memanipulasi dosis auksin dan sitokinin eksogen (Poonsapaya *et al.*, 1989).

4.2.2. Jumlah Daun

Interaksi BAP dan NAA tidak berpengaruh nyata terhadap jumlah daun pada tahap perlakuan maupun pada tahap pemindahan. Pemberian BAP tunggal juga tidak berpengaruh nyata terhadap jumlah daun baik pada tahap perlakuan maupun pada tahap pemindahan.

a. Pengaruh NAA Terhadap Jumlah Daun

Berdasarkan analisis sidik ragam (Tabel 4.2.), terlihat bahwa jumlah daun hanya dipengaruhi oleh Pemberian NAA baik pada tahap perlakuan maupun pada tahap pemindahan. Pemberian NAA secara tunggal mendapatkan pengaruh yang sangat nyata terhadap jumlah daun/eksplan dengan perlakuan terbaik pada taraf

1,5 ppm menghasilkan 2,4 daun/eksplan selama 8 MST pada tahap perlakuan dan bertambah menjadi 7,3 helai/eksplan pada tahap pemindahan.

Tabel 4.3. Pengaruh pemberian NAA terhadap rata-rata jumlah daun eksplan bonggol pada tahap perlakuan (8 MST) dan Tahap Pemindahan (12 MST)

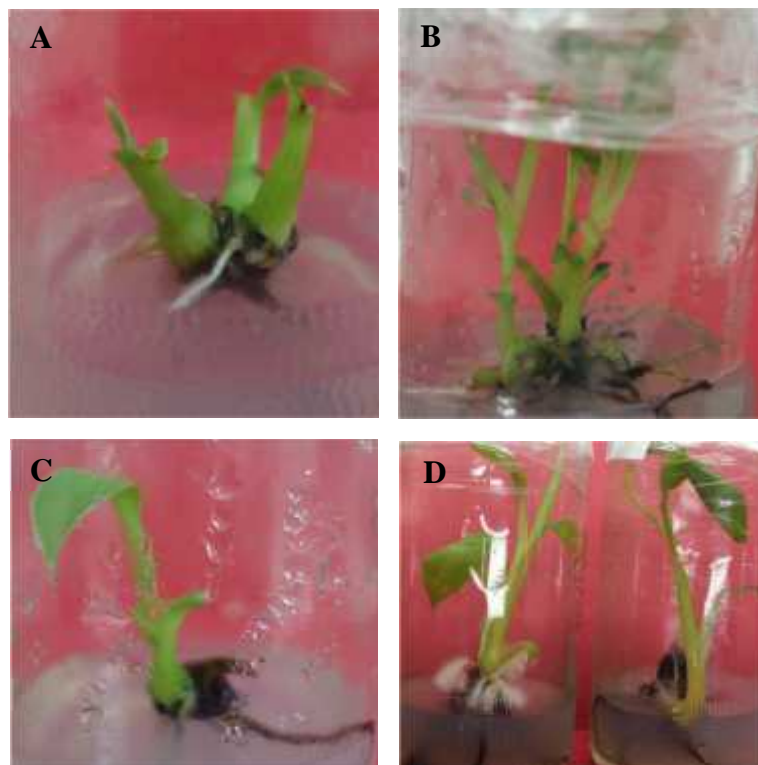
| NAA | Jumlah Daun | |
|---------|-------------|------------|
| | Perlakuan | Pemindahan |
| 0 ppm | 2,03 a | 1,4 c |
| 1,5 ppm | 2,40 a | 7,3 a |
| 2 ppm | 1,74 b | 6,7 a |

Keterangan: Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%, data tahap perlakuan merupakan hasil transformasi $\sqrt{x + 1}$

Banyaknya jumlah daun berbanding lurus dengan jumlah tunas, dimana semakin banyak tunas maka jumlah daun semakin banyak. Suyadi *et al.*, (2003) mengemukakan bahwa Peningkatan jumlah daun pada perbanyak Pisang Abaca (*Musa textilis* Nee.) lebih dikarenakan oleh peningkatan jumlah tunas, bahwa semakin banyak tunas akan diikuti oleh meningkatnya jumlah daun, pada penelitian ini NAA hanya menghasilkan rata-rata 1,6 tuna/eksplan. Menurut Salisbury & Ross (1992), primordia daun tidak berkembang secara acak di sekitar apeks tajuk, tetapi memiliki susunan yang khas yang disebut filotaksis. Tanda arah pembentukan daun adalah pembelokan sel di salah satu dari ketiga lapisan terluar dari permukaan luar apeks tajuk.

Jumlah daun pada seluruh perlakuan umumnya ditahap pemindahan menggunakan MS0 dan Skoog menunjukkan pertumbuhan yang normal, bernas dan tidak mengalami vitrifikasi. Media MS0 tanpa penambahan BAP dan NAA sudah mampu menghasilkan pertambahan, perbesaran dan pemanjangan daun.

Meldia *et al.*, (1992) mengatakan bahwa pemindahan planlet pisang ke medium MS sudah mampu berkembang dengan baik, karena media MS mengandung unsur-unsur hara makro dan mikro yang diperlukan tanaman untuk pertumbuhan dan perkembangannya. selain itu media MS mengandung karbohidrat yang cukup banyak, unsur hara juga bahan organik lain seperti gula, vitamin, asam amino, myoinositol, zat pengatur tumbuh, dan bahan organik kompleks alami



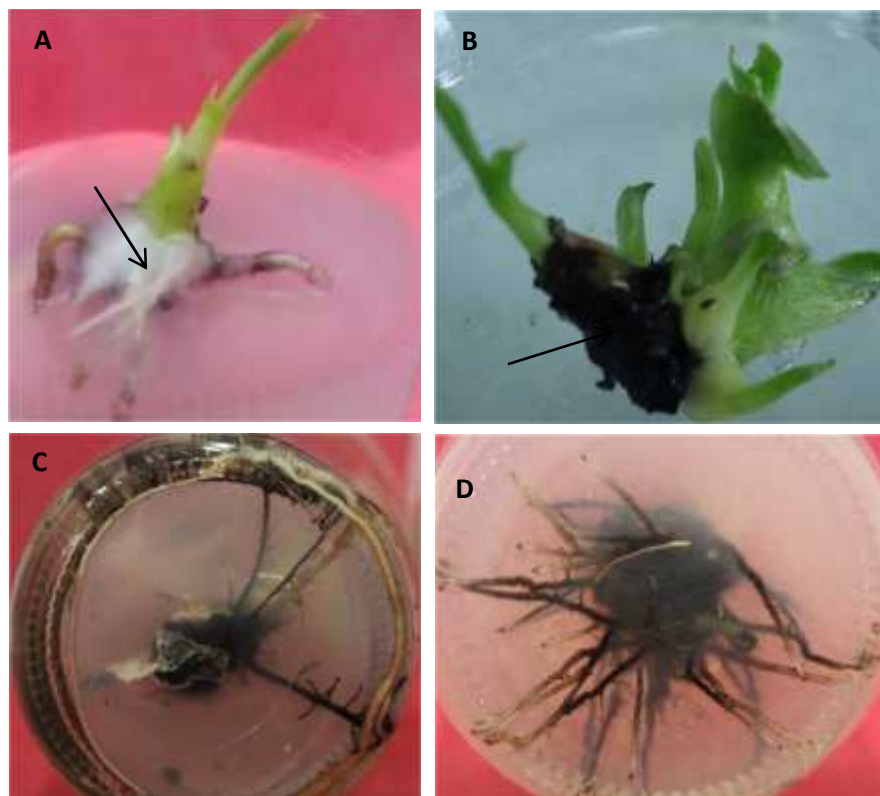
Gambar 4.12. Perbandingan jumlah daun yang dihasilkan pada tahap perlakuan (A,C) dan tahap pemindahan (C,D): NAA 1,5 ppm (Gambar A,B) dan Kontrol (C,D)

BAP sebagai salah satu jenis sitokinin lebih berfungsi untuk mendorong pembentukan tunas, menghambat pertambahan tinggi, sehingga menekan jumlah daun. Eksplan pisang berbagai kultivar yang ditanam pada media dengan

konsentrasi BAP yang tinggi (7 ppm) cenderung kurang normal, dimana daun sebagian menggulung dan sempit (Ernawati,2005).

4.2.3. Jumlah Akar

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa BAP, NAA dan interaksi keduanya tidak mempengaruhi jumlah akar yang terbentuk, sedangkan pada perlakuan lainnya ditemukan akar hampir tidak terbentuk, eksplan hanya mampu bertunas atau membentuk nodul tanpa munculnya akar (Gambar 4.10.b) berikut merupakan Gambar tipe regenerasi planlet yang berasal dari eksplan bonggol anakan pisang rotan, yang berbeda dalam jumlah akarnya.



Gambar 4.13. perbandingan munculnya akar (A,B) Ekplan pada tahap perlakuan. (C,D) eksplan pada tahap pemindahan.

Dominasi tidak terbentuknya akar pada beberapa perlakuan diduga karena eksplan hanya berkembang menjadi nodul dan tunas tanpa akar sehingga akar

tidak terbentuk, jika dibandingkan dengan kontrol eksplan mampu bermorfogenesis secara sempurna membentuk daun dan akar yang lebih panjang. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilaporkan (Sitohang, 2005; Isnaeni 2008) pada kultur meristem pisang barangan tanpa penambahan ZPT mampu membentuk akar yang lebih banyak dan panjang dibandingkan dengan media yang ditambahkan zat pengatur tumbuh seperti NAA, BAP, TDZ dan IAA.

Pada tahap pemindahan di media MS0 akar mulai terbentuk pada seluruh eksplan bonggol. Perlakuan BAP 0 ppm + NAA 2 ppm menghasilkan rata-rata jumlah akar 6,16 akar/eksplan dan bertambah menjadi 11,7 akar/eksplan pada tahap pemindahan pada medium MS dipicu oleh konsentrasi auksin yang tinggi sehingga mampu menginduksi perakaran. Menurut Lakitan (1996) akar akan terbentuk apabila ada auksin yang dikombinasikan dengan sitokinin pada konsentrasi yang rendah atau tanpa sitokinin. Namun dalam penelitian ini tanpa pemberian BAP atau sitokinin dalam konsentrasi yang rendah pun akar dapat tumbuh dengan baik.

Morfologi akar yang terbentuk pada tahap awal inisiasi berwarna putih kecoklatan dan ditumbuhi bulu-bulu akar halus yang berwarna putih, akar terus memanjang dan bertambah jumlahnya. Selain itu terbentuk pula eksudat akar berwarna hitam juga terbentuk dan menjadikan akar berwarna kehitaman.

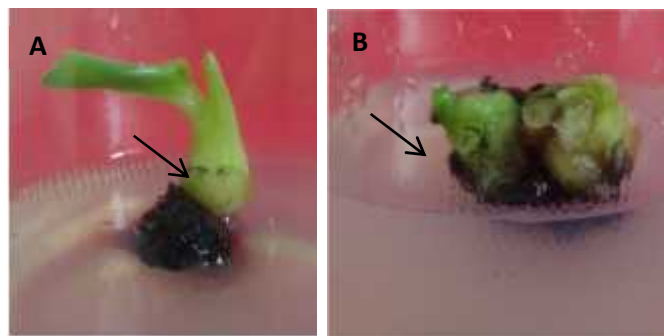
Menurut Alitalia (2008) *cit* Marlin (2005), beberapa sel tanaman dapat tumbuh, berkembang dan beregenerasi menjadi tanaman baru dalam media tanpa penambahan hormon. Dengan demikian, tanpa suplai auksin dan sitokinin eksogen, akar akan tetap tumbuh dan memanjang. Hal ini terjadi pada perlakuan kontrol bahwa walaupun jumlah akar sedikit namun akar terus memanjang signifikan dibandingkan dengan perlakuan, eksplan yang dikulturkan tanpa

penambahan BAP dan NAA memperlihatkan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan perlakuan yang lain (Alitalia 2008).

4.2.4. Jumlah Nodul

Menurut Wattimena *et al.*, (1992) nodul merupakan kelompok sel pada tempat tertentu dalam kalus yang menyerupai kambium yang juga sering disebut *meristemoid*. Hal ini memungkinkan sel aktif membelah. Multipikasi diduga berasal dari sel meristematis yang membelah membentuk nodul baru, namun secara pasti belum dipelajari lebih jauh asal multipikasi.

Nodul merupakan bentuk dari salah satu morfogenesis secara tidak langsung, dalam penelitian ini terjadi morfogenesis langsung dan tidak langsung, eksplan dari inisiasi awal ada yang dapat bertunas secara langsung dan ada yang terlebih dahulu membentuk nodul (Gambar 4.9)



Gambar 4.14. Tipe morfogenesis pada 4 MST (A) secara langsung dan (B) membentuk nodul

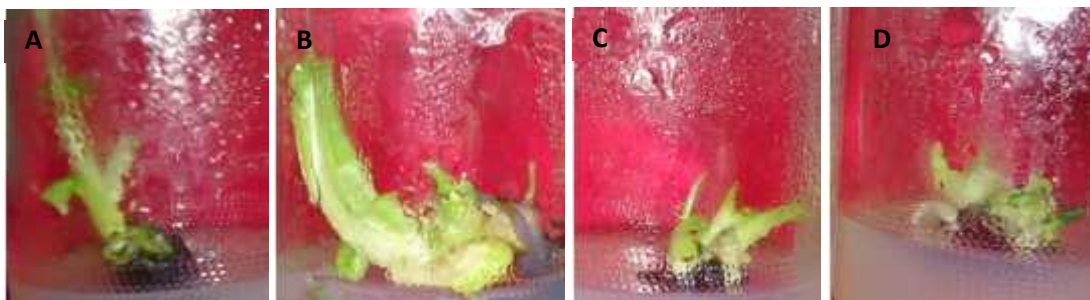
Pemberiaan NAA secara tunggal memberikan pengaruh sangat nyata terhadap jumlah nodul dengan rata-rata tertinggi 1,4 nodul/eksplan pada perlakuan NAA 1,5 ppm selama 8 MST dan yang terendah yaitu 0 nodul/eksplan pada perlakuan 0 ppm NAA (Tabel 4.4.).

Tabel 4.4. Pengaruh pemberian NAA tunggal terhadap rata-rata jumlah nodul pada eksplan bonggol pada tahap perlakuan (8 MST)

| NAA | Jumlah Nodul |
|------------------|--------------|
| NAA 0 ppm (N0) | 0 c |
| NAA 1,5 ppm (N1) | 1,4 a |
| NAA 5 ppm (N2) | 1,2 b |

Keterangan: Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%

Hasil serupa juga terjadi pada tanaman kantong semar oleh Aryani (2013) bahwa Pembentukan nodul ditandai dengan munculnya gumpalan sel yang berwarna putih kehijauan. Selanjutnya gumpalan tersebut berkembang membentuk nodul (Gambar 4.15). Auksin dengan kisaran 1 -3,5 ppm termasuk dalam “kisaran konsentrasi” yang dapat menstimulasi pembentukan kalus/nodul, karena pada konsentrasi tersebut, auksin eksogen (NAA yang ditambahkan ke dalam media) dapat berinteraksi dengan auksin endogen yang terdapat dalam eksplan.



Gambar 4.15. Perbandingan Jumlah nodul yang Dihasilkan pada : (A) Kontrol (B) Perlakuan NAA 1,5 ppm (C) perlakuan NAA 2 ppm (D) Perlakuan Bap 5 ppm + NAA 2 ppm

Menurut hasil sidik ragam kombinasi antara auksin dan sitokinin tidak memberikan pengaruh nyata, namun hanya berbeda dengan perlakuan lainnya, jumlah rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian NAA maupun pemberian BAP.

Eksplan nodul pisang yang dikultur secara *in vitro* menunjukkan respon perubahan setelah 1 minggu inisiasi. Pada pengamatan 1 minggu setelah inisiasi kultur, eksplan tampak membengkak yang kemudian diikuti dengan merekahnya ujung eksplan. Selanjutnya setelah 2 minggu inisiasi kultur, calon tunas mikro pisang dapat terbentuk pada rekahan tersebut yang ditandai dengan unculnya ujung helaian daun. Hal tersebut juga didukung oleh hasil penelitian Avivi dan Ikrarwati (2004) yang menggunakan tunas nodul abaka dari kultur steril, dimana pada awal pengkulturan tunas memberikan respon berupa pembengkakan dan perekahan.

Kalus atau nodul muncul pada bagian yang terluka diduga karena adanya rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi lukanya. Eksplan yang digunakan berasal dari eksplan bonggol dipotong, sehingga pada bekas luka inilah terbentuk nodul. Hal ini sesuai pendapat dari Thomas & Davey (1975) *cit* George & Sherington (1993), mengemukakan bahwa pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi dari adanya respon terhadap luka dan suplai hormon alamiah atau buatan dari luar ke dalam eksplan.

Sebagai alternatif untuk pemecahan nodul pisang agar segera bertunas maka salah satu solusi yang ditawarkan adalah dengan melakukan pemindahan pada media MS atau media dengan penambahan BAP. Menurut Rainiyani *et al.*, (2009) eksplan pisang Raja nangka (*Musa* AAB Group) menunjukkan tanggapan positif dalam pembentukan tunas mikro, dengan dipengaruhi oleh penambahan BAP namun belum mampu memacu pertumbuhan akar.

Pada tahap pemindahan (9 MST) respon nodul mampu berdeferensiasi menjadi tunas dengan primordia daun, sehingga jumlah tunas pada tahap

pemindahan terbentuk lebih banyak dibandingkan dengan tahap perlakuan. Tingginya jumlah nodul yang terbentuk pada penambahan 2 ppm NAA diduga karena adanya auksin yang diberikan pada eksplan. Nodul pada perlakuan ini terus membesar dan bertambah jumlahnya namun hanya sedikit yang pecah menjadi tunas. Hal ini diduga karena sel-sel penyusun nodul terus membesar dan bertambah jumlahnya seiring dengan suplai auksin dan sitokinin yang ditambahkan dalam media maupun hormon endogen dari eksplan itu sendiri.

Hormon endogen tersebut juga mampu memacu sel untuk berkembang dan memperbanyak diri tetapi waktu yang dibutuhkan cenderung lama karena jumlah hormon yang tidak tersedia secara pasti. Hal ini membuktikan bahwa terbentuknya nodul sangat dipengaruhi oleh peran jenis zat pengatur tumbuh. Menurut Zulfiqar *et al.*, (2009) kondisi tersebut membuktikan bahwa pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara *in vitro* dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi dari ZPT yang ada dalam eksplan baik endogen maupun eksogen yang diserap dari media.

4.3. Tahap Perlakuan Meristem Bunga (Jantung)

Pada penelitian ini eksplan jantung pisang selama 8 MST tidak mampu membentuk tunas, daun, akar, maupun nodul, sehingga parameter tidak dapat di analisis secara statistik. Menurut Watimena (1992) kemampuan induksi dan regenerasi eksplan pada beberapa jenis tanaman membutuhkan waktu yang cukup lama untuk dapat beregenerasi. Eksplan meristem bunga jantung pisang rotan menunjukkan respon terbentuknya kalus pada beberapa perlakuan. Tumbuhnya kalus pada eksplan meristem bunga pisang telah dilaporkan oleh

Marlin *et al.*, (2012) dengan penambahan auksin dari golongan 2,4, D dan BAP hanya mampu menginduksi kalus, sedangkan Darvari *et al.*, (2010) melaporkan eksplan bunga jantan pisang dari beberapa kultivar lokal Malaysia sudah mampu menginduksi tunas secara langsung dengan menggunakan Zat pengatur tumbuh TDZ, BAP, Kinetin, 2-ip and Zeatin yang dikombinasikan.

Navarro *et al.*, (1992) menambahkan bahwa dalam kultur *in vitro* kalus embriogenik pada pisang Cavendish yang dipindahkan pada media baru akan menghasilkan kalus dengan warna dan struktur yang berbeda, dalam penelitiannya juga dijelaskan bahwa kalus yang diperoleh dari berbagai jenis tanaman atau dari berbagai jenis eksplan sering kali gagal beregenerasi membentuk tunas atau hanya membentuk akar.

Eksplan Pisang Rotan yang berasal dari meristem bunga hanya mampu memunculkan kalus pada beberapa perlakuan selama 8 MST. Minggu selanjutnya (9 MST) tidak mampu *survive* dikarenakan browning dan gagal beregenerasi. Parameter yang diamati pada eksplan meristem bunga pisang rotan adalah deferensiasi morfologi eksplan, waktu munculnya kalus, warna dan struktur kalus pada 8 MST>

4.3.1. Deferensiasi Morfologi Eksplan

Respon yang ditunjukkan bahwa perlakuan campuran zat pengatur tumbuh BAP dan NAA kedua tidak perbengaruh nyata terhadap diferensiasi Morfologi eksplan pada umur 4,6, dan 8 minggu setelah inokulasi pada tahap perlakuan disajikan dalam Tabel berikut:

Tabel, 4.5. Skoring perkembangan morfologi eksplan

| Perlakuan (ppm) | 1 MST | 2 MST | 3 MST | 4 MST | 5 MST | 6 MST | 7 MST | 8 MST |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| BAP 0 + NAA 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| BAP 3 + NAA 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| BAP 5 + NAA 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| BAP 7 + NAA 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| BAP 0 + NAA 1,5 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| BAP 3 + NAA 1,5 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| BAP 5 + NAA 1,5 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| BAP 7 + NAA 1,5 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| BAP 0 + NAA 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| BAP 3 + NAA 2 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| BAP 5 + NAA 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| BAP 7 + NAA 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Keterangan Skoring

1 : Eksplan tetap segar, namun tidak berkembang.

2 : Eksplan tetap segar dan berkembang membengkak tapi tidak membentuk kalus

3 : Eksplan tetap segar dan terbentuk kalus.

Kalus merupakan sekumpulan sel yang belum berdeferensiasi, Marlin *et al.*, menyatakan kalus merupakan sumber bahan tanam yang sangat penting dalam meregenerasi tanaman yang baru. Berdasarkan Tabel 4.6. perkembangan morfologi kalus pada eksplan jantung memberikan respon yang berbeda-beda.

Berdasarkan penelitian terdahulu penggunaan eksplan jantung pada perbanyakan pisang umumnya awal iduksi dapat memunculkan kalus, karena sangat sulit untuk langsung meregenerasikan eksplan bunga pisang menjadi tunas, hal ini telah dilaporkan oleh Sultan *et al.*,(2011) penelitiannya mengenai pisang pisang kultivar lokal di Bangladesh (*Musa* sp. Cv. Sabri) dengan menggunakan ZPT 2,4-D, NAA dan IAA hanya dapat menginduksi kalus saja, sedangkan untuk memunculkan tunas harus dipindahkan pada media baru yang dapat menginisiasi tunas yang mengandung BA, IAA dan *Caesin hydrolysate* (CH), selain itu Marlin

et al., (2012) menambahkan eksplan jantung pisang Curup diinisiasi dengan menghasilkan kalus dengan struktur kalus yang remah.

Rainiyati *ert al.*, juga melaporkan (2005) eksplan yang berasal dari bunga tidak langsung meregenerasikan tunas tetapi membentuk nodul morfogenik sehingga perlu dilakukan pemindahan pada media pertunasan. Darmayanti (2004) mendapatkan kalus androgenik pada eksplan bunga pisang dengan penambahan Putresin 2 mM. Berdasarkan Tabel 4.6. eksplan yang mampu membentuk kalus gambar (4.16) adalah pada perlakuan penambahan 5 ppm BAP + 1,5 ppm NAA, 7 ppm BAP + 1,5 ppm NAA, dan pada 3 ppm BAP + 2 ppm NAA, 5 ppm BAP + 2 ppm NAA, 7 ppm BAP + 2 ppm NAA sedangkan pada perlakuan lainnya belum mampu memunculkan kalus, eksplan hanya mampu membengkak dan membesar selain itu persentase *browning* dan kontaminasi internal sangat tinggi.



Gambar 4.16. Deferensiasi eksplan : (A) eksplan muncul kalus (B) eksplan hanya membengkak (C) eksplan mati akibat browning

Dua belas kombinasi perlakuan yang dicobakan lima diantaranya mampu membentuk kalus, hal ini menunjukkan media sangat berpengaruh terhadap munculnya kalus. Menurut George & Sherrington (1984) menjelaskan bahwa untuk pembentukan kalus diperlukan auksin dan sitokinin dalam jumlah yang

relatif tinggi. Sejalan dengan penelitian ini perlakuan yang mampu memunculkan kalus adalah media yang ditambahkan sitokinin dan auksin.

Penambahan 5 ppm BAP + 1,5 ppm NAA, 7 ppm BAP + 1,5 ppm NAA , dan pada 3 ppm BAP + 2 ppm, 5 ppm BAP + 2 ppm NAA, 7 ppm BAP + 2 ppm NAA mampu memunculkan kalus, namun dari kelima perlakuan tersebut morfologi kalus yang terbentuk berbeda-beda. Berdasarkan pengamatan secara visual kalus pada perlakuan B3N2 mampu membentuk kalus yang lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan lainnya, hal ini diduga karena kalus mampu terinduksi lebih banyak sesuai dengan ZPT sitokinin-auksin yang ditambahkan dalam media semakin tinggi.

4.3.2. Waktu Munculnya Kalus

Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan eksplan pada beberapa perlakuan menunjukkan saat terbentuknya kalus berbeda-beda pertumbuhan kalus tercepat (3 MST) terjadi pada media dengan pemberian BAP 5 ppm + NAA 2 ppm dan pemberian BAP 7 ppm + NAA 2 ppm. disusul dengan 5 ppm BAP + 1,5 ppm NAA, 7 ppm BAP + 1,5 ppm NAA , dan pada 3 ppm BAP + 2 ppm pada 4 MST.

Tiga minggu setelah kultur umumnya eksplan mulai mengalami inisiasi, yang ditandai dengan perubahan permukaan eksplan yang mengembang, sedikit membesar dan terbentuk kalus pada beberapa perlakuan. Menurut Marlin *et al.*, (2012) kecepatan pertumbuhan jaringan eksplan pisang dalam membentuk kalus dipengaruhi oleh adanya suplai sukrosa dalam media tanam.

Lestari (2011) melaporkan untuk produksi kalus embriogenik digunakan auksin kuat seperti 2,4-D, dicamba atau picloram. Begitu juga Marlin *et al.*, (2012) menambahkan ZPT yang sering digunakan untuk menstimulasi pembentukan kalus dari golongan auksin adalah 2,4-D. karena umumnya auksin mampu meningkatkan pemanjangan sel, pembelahan sel, dan pembentukan akar adventif. Berikut merupakan grafik pertumbuhan kalus dari 1 MST – 8 MST.

Waktu munculnya kalus pada penelitian ini tergolong lambat, mengingat penelitian terdahulu, kalus dapat muncul pada 11 hari pada pembentukan kalus tercepat pada kultivar kepok, mauli dan raja dengan menggunakan kinetin dan NAA (Nisa, 2005). Marlin *et al.*,(2007) melaporkan pembentukan kalus tercepat (9 hari) pada kultivar curup. Munculnya kalus yang tergolong lama diduga karena penggunaan ZPT yang kurang tepat, konsentrasi Auksin terlalu rendah sementara menurut Pierik (1987) embriogenik dan struktur embrio somatik seringkali auksin diperlukan dalam konsentrasi yang relatif tinggi.

Dalam penelitian ini tunas pada eksplan jantung tidak terbentuk. Menurut Mante & Tepper (1983) *cit* Nisa & Rodinah (2005) saat tumbuh tunas dipengaruhi oleh tiga faktor yaitu faktor eksplan, Media dan lingkungan. Menurutnya eksplan Bakal buah pisang kemungkinan memang sulit untuk pembentukan tunas. Kultur jaringan buah pisang juga telah dilaporkan oleh Ram *et al.*(1964) eksplan memang hanya mampu membentuk kalus dan tidak berkembang menjadi organ. Martino (1997) menambahkan bahwa hormon yang dihasilkan oleh eksplan belum cukup untuk menginduksi tunas sehingga sel-sel hanya mampu aktif membelah tanpa terjadi deferensiasi dan organogenesis.

4.3.3. Bentuk Kalus

Berdasarkan pengamatan secara visual morfologi kalus dapat dilihat salah satunya dengan melihat penampakan perbesaran kalus itu sendiri. Penggunaan jenis tanaman, eksplan dan ZPT yang berbeda menghasilkan kalus yang berbeda pula. Berikut merupakan Tabel pengamatan visual terhadap bentuk kalus bunga pisang Rotan 1-8 MST.

Rahayu *et al.*, (2003) menyatakan bahwa berat atau besarnya segar kalus disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus. Selain itu, Pierik (1987) menambahkan bahwa pertumbuhan kalus dalam satu spesies tanaman dapat berbeda tergantung faktor seperti posisi eksplan semula dalam tanaman dan kondisi pertumbuhan.

Metode skoring kalus pisang dilakukan menurut metode Khatri *et al.*, (2005) dengan empat kategori pembesaran kalus pisang. Kalus yang muncul diamati secara manual tanpa bantuan mikroskop selama 8 MST.

Tabel 4.6. menunjukkan bahwa kalus yang mengalami visual terbesar adalah kalus pada perlakuan dengan penambahan BAP 3, 5, 7 ppm, yang dikombinasikan NAA dalam konsentrasi 2 ppm. Sementara perlakuan lain yang dapat membentuk kalus dengan penambahan konsentrasi NAA lebih rendah menghasilkan struktur kalus yang lebih kecil dan tipis. Tabel berikut merupakan Tabel skoring bentuk kalus pisang Rotan yang terbentuk pada tiap minggunya.

Tabel. 4.6. Bentuk kalus pisang rotan

| Perlakuan | 2 MST | 3 MST | 4 MST | 5 MST | 6 MST | 7 MST | 8 MST |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Kontrol | * | * | * | * | * | * | * |
| BAP 1 + NAA 0 | * | * | * | * | * | * | * |
| BAP 3 + NAA 0 | * | * | * | * | * | * | * |
| BAP 7 + NAA 0 | * | * | * | * | * | * | * |
| BAP 0 + NAA 1,5 | * | * | * | * | * | * | * |
| BAP 3 + NAA 1,5 | * | * | * | * | * | * | * |
| BAP 5 + NAA 1,5 | * | * | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| BAP 7 + NAA 1,5 | * | * | * | ++ | ++ | ++ | ++ |
| BAP 0 + NAA 2 | * | * | * | * | * | * | * |
| BAP 3 + NAA 2 | * | * | + | ++ | ++ | +++ | +++ |
| BAP 5 + NAA 2 | * | + | + | ++ | ++ | +++ | +++ |
| BAP 7 + NAA 2 | * | + | + | ++ | ++ | +++ | +++ |

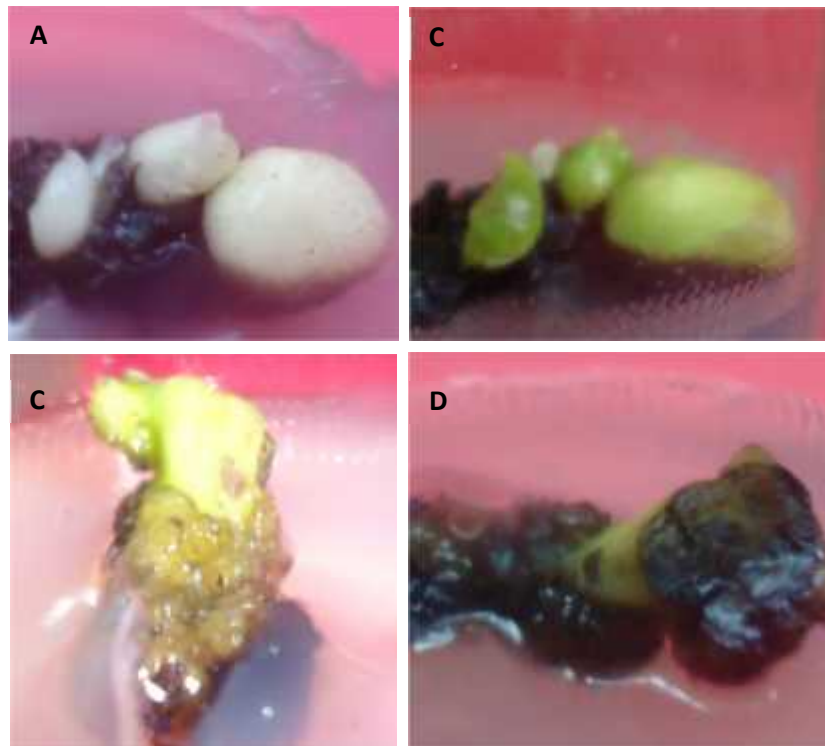
Ket: * eksplan membesar, + kalus bertumbuh, ++ intensitas kalus sedang, +++ intensitas kalus besar

Zat pengatur tumbuh BAP dan NAA kurang cocok digunakan untuk menginduksi kalus bunga pisang Rotan karena propagul kalus yang dihasilkan tidak banyak. Disarankan untuk menggunakan 2,4-D sebagai pengganti auksin karena menurut penelitian terdahulu 2,4-D + dan penambahan sukrosa merupakan media terbaik dalam induksi kalus embriogenik pisang curup (Marlin *et al.*, 2012), selain itu 2,4-D paling baik untuk pertambahan berat segar kalus dan lebih menguntungkan karena memberikan pengaruh sangat nyata (Andaryani, 2010).

4.3.4. Warna dan Struktur Kalus

Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan kalus dalam 8 minggu kultur, menunjukkan warna kalus kuning kehijauan, putih kehijauan dan coklat karena *browning* seperti Gambar 4.17. Flower (1983) mengatakan bahwa terbentuknya kalus dapat disebabkan oleh rangsangan luka, rangsangan tersebutlah yang menyebabkan kesetimbangan pada dinding sel berubah arah, sebgayaan protoplas mengalir keluar sehingga mulai terbentuk kalus.

Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai kualitas suatu kalus. Kalus yang baik diasumsikan memiliki tekstur remah (*friable*). Tekstur kalus yang remah dianggap baik karena memudahkan dalam pemisahan menjadi sel-sel tunggal pada kultur suspensi, di samping itu akan meningkatkan aerasi oksigen antar sel. Dengan demikian, dengan tekstur tersebut upaya untuk perbanyakkan dalam hal jumlah kalus yaitu melalui kultur suspensi lebih mudah. Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam, yaitu : kompak (*non friable*), intermediet dan remah (*friable*) (Turhan, 2004).



Gambar . 4.17. Warna Kalus. (A) Putih (B) hijau kekuningan (C) hijau kecoklatan dan (D) coklat

Secara visual, kalus remah yang terbentuk pada eksplan pisang Rotan ikatan antar selnya tampak renggang, mudah dipisahkan dan jika diambil dengan pinset, kalus mudah pecah dan ada yang menempel pada pinset. Namun pada

perlakuan BAP 5 ppm + NAA 2 ppm kalus yang terbentuk mempunyai struktur yang lebih padat dan kompak (*non friabele*), berbeda dengan perlakuan lainnya yang dapat menghasilkan kalus yang remah.

Pada 3 MST saat munculnya kalus, warna kalus putih kemudian berubah menjadi kuning kehijauan sampai 7 MST sedangkan pada 8 MST kalus pada perlakuan berubah warna lebih gelap. Menurut Salisbury & Ross (1995) perubahan warna menjadi lebih gelap diduga adanya senyawa fenol sehingga pembentukan klorofil dan perkembangan kloroplas terhambat. Pada 8 MST kalus menunjukkan gejala *browning*. *Browning* berlangsung sangat cepat dalam interval 3 hari warna kalus mulai pucat dan menjadi coklat pada 8 MST. berikut merupakan deskripsi warna kalus .

Gambar 4.15. menunjukkan bahwa warna yang terlihat pada kalus pisang Rotan memiliki rentang mulai dari putih hingga hijau kecoklatan. Berdasarkan Tabel 4.9. warna kalus yang terlihat berkisar antara hijau keputihan, hijau kekuningan dan hijau kecoklatan. Perbedaan warna kalus menunjukkan bahwa tingkat perkembangan kalus berbeda-beda.

Hampir semua perlakuan menunjukkan warna hijau kekuningan pada kalus yang terbentuk pada 7 MST. Menurut Hanifah (2007), pada penambahan sitokinin dengan konsentrasi yang semakin meningkat cenderung menunjukkan warna hijau (cerah) pada kalus lebih tahan lama. Warna hijau pada kalus adalah akibat efek sitokinin dalam pembentukan klorofil.

Tabel. 4.7. Deskripsi Warna Kalus Pisang Rotan

| | B2N1 | B3N1 | B1N2 | B2N2 | B3N2 |
|-------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 3 MST | Belum muncul | Belum muncul | Belum muncul | Putih | Putih |
| 4 MST | Putih | Belum muncul | Putih kehijauan | Putih kehijauan | Putih kehijauan |
| 5 MST | Putih | Putih kehijauan | Putih kehijauan | Putih kehijauan | Putih kehijauan |
| 6 MST | Putih kehijauan | Putih kehijauan | Putih kehijauan | Kuning kehijauan | Kuning kehijauan |
| 7 MST | Kuning kehijauan | Kuning kehijauan | Kuning kehijauan | Kuning kehijauan | Kuning kehijauan |
| 8 MST | Coklat | Coklat | Coklat | Coklat | Coklat |

Keterangan:

B2N1 : BAP 5 ppm + NAA 1,5 ppm

B3N1 : BAP 7 ppm + NAA 1,5 ppm

B1N2 : BAP 3 ppm + NAA 2 ppm

B2N2 : BAP 5 ppm + NAA 2 ppm

B3N2 : BAP 7 ppm + NAA 2 ppm

Warna kalus hijau kecoklatan terdapat pada terjadi pada 8 MST. Warna kalus yang semakin gelap (menjadi coklat) berarti pertumbuhan kalus semakin menurun. Andaryani (2010) mengatakan, kalus yang berwarna hijau kecoklatan dihasilkan pada media yang mengandung auksin dengan konsentrasi yang terbilang tinggi. Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian Dwiyono, (2009) bahwa penambahan auksin yang semakin meningkat dapat menyebabkan peningkatan terbentuknya kalus dengan warna coklat tanaman mahkota dewa.

Warna kecoklatan pada kalus (*browning*) ini akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat toksik, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan, yang menghambat pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kematian jaringan (Yusnita, 2004). Santoso dan Nursandi (2004) menyatakan bahwa

peristiwa pencoklatan tersebut sesungguhnya merupakan suatu peristiwa alamiah dan proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik seperti pengupasan, dan pemotongan. Gejala pencoklatan merupakan tanda-tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan. Selain menandakan terjadinya sintesis senyawa fenol, warna coklat disebabkan oleh semakin bertambahnya umur sel atau jaringan kalus. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Palupi *et al.*, (2004), bahwa kalus yang berwarna coklat merupakan kalus yang mengalami proses penuaan (*senescence*) sel, hal ini disebabkan karena tidak adanya BA dalam media. sehingga mempercepat terjadinya proses penuaan (*senescence*) sel.

Dalam penelitian ini kalus mengalami browning pada minggu 8 MST, *browning* yang terjadi semakin parah pada hari berikutnya. Usaha yang sudah dilakukan untuk menekan *browning* pada kalus adalah dengan mengpindahkan pada media baru (MS0) dengan harapan kalus dapat berdeferensiasi, namun pada 9 MST kalus tidak menunjukkan gejala hidup. Warna coklat makin berubah menjadi kehitaman dan menyebabkan kematian kalus.

Kematian dini pada kalus diduga karena kalus kekurangan suplai karbohidrat dalam media. Marlin *et al.*, (2012) mengatakan kematian kalus umum terjadi pada kultur jaringan salah satu penyebabnya adalah suplai sukrosa yang kurang memadai bagi kehidupan kalus, dalam penelitian ini media tidak ditambahkan sukrosa, media hanya diberi gula pasir biasa. Data penelitian Sransam *et al.*, (2003) pada pisang kultivar “*Gros Michel*” juga mengalami *browning* yang tinggi pada 4 MST sehingga perlu dipindahkan sedini mungkin setelah muncul kalus.

Pada penelitian ini tidak disajikan data pemindahan kalus bunga pisang Rotan, karena kalus mengalami kematian pada minggu ke 9, yang disebabkan oleh browning, sehingga penulis menyarankan untuk penelitian selanjutnya mengani induksi kalus bunga pisang hendaknya melakukan pemindahan yang lebih dini untuk menghindari kematian eksplan yang disebabkan oleh browning.

Mengingat bahwa fenol merupakan zat yang dapat menyebabkan pencoklatan dan kematian eksplan. Perlu dicari metode yang tepat seperti dengan mentransfer eksplan ke media baru (pemindahan) sedini mungkin, penambahan arang aktif dan perlakuan. Selain itu, pengurangan senyawa fenolat yang dapat menyebabkan *browning* juga dapat dilakukan dengan penambahan *polivinilpirolidon* (PVP) 0,5 % (Aryani, 2013), penambahan anti oksidan atau pencelupan eksplan ke dalam antioksidan dan pencelupan eksplan dalam larutan *glutation* 0,1 mM sebelum dilakukan penanaman eksplan ke media kultur .