

**ORGANOGENESIS MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) *IN VITRO*
DARI EKSPAN DAUN SEBAGAI RESPON TERHADAP
BENZILADENIN (BA) DAN ASAM NAFTALEN ASETAT (NAA),
ATAU BA DAN KINETIN**

(Tesis)

Oleh

BUDI SULISTIYAWAN



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER AGRONOMI
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

ABSTRAK

ORGANOGENESIS MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) IN VITRO DARI EKSPLAN DAUN SEBAGAI RESPON TERHADAP BENZILADENIN (BA) DAN ASAM NAFTALEN ASETAT (NAA), ATAU BA DAN KINETIN

Oleh

BUDI SULISTIYAWAN

Perbanyakan melinjo secara *in vitro* diharapkan dapat mengatasi berbagai permasalahan dalam pembiakan tanaman secara konvensional, yaitu perkecambahan benih yang memerlukan waktu lama dengan keberhasilan rendah dan daya regenerasi akar melalui cangkok dan setek batang yang rendah. Penelitian ini terdiri atas 2 percobaan. Percobaan I bertujuan untuk mempelajari pengaruh konsentrasi benziladenin (BA) dengan atau tanpa asam naftalen asetat (NAA) terhadap organogenesis melinjo *in vitro*; dan percobaan II bertujuan mempelajari pengaruh konsentrasi benziladenin (BA) dengan atau tanpa kinetin terhadap organogenesis melinjo *in vitro*. Kedua percobaan tersebut menggunakan eksplan potongan daun muda melinjo berukuran 1 cm x 1 cm dengan tulang daun di tengahnya. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung dari bulan Agustus 2015 sampai dengan Juni 2016.

Kedua percobaan dilakukan menggunakan rancangan teracak lengkap dengan tiga ulangan. Setiap unit percobaan terdiri dari empat botol kultur yang masing-masing berisi satu eksplan. Pada percobaan I, perlakuan disusun secara faktorial (5x2), dengan faktor pertama lima taraf konsentrasi benziladenin (BA) yaitu 0, 0,5, 1, 1,5 dan 2 mg/l, dan faktor kedua dua taraf konsentrasi NAA yaitu 0 dan 0,05 mg/l. Perlakuan pada percobaan II juga disusun secara faktorial (3x2), dengan faktor pertama adalah tiga taraf konsentrasi BA yaitu 2, 4, dan 6 mg/l dan faktor kedua adalah dua taraf konsentrasi kinetin, yaitu tanpa kinetin dan dengan 1 mg/l kinetin. Media dasar yang digunakan pada kedua percobaan adalah Murashige dan Skoog (MS) dengan 30 g/l sukrosa, yang diperkaya dengan 100 mg/l mio-inositol, 0,1 mg/l tiamin-HCl, 0,5 piridoksin-HCl, 0,5 mg/l asam nikotinat dan 2 mg/l glisin. Tingkat keasaman larutan media (pH) diatur menjadi 5,8 sebelum ditambah dengan 8 g/l bubuk agar-agar sebagai pematat media, lalu disterilkan dengan

autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan $1,2 \text{ kg/cm}^2$ selama 7 menit. Semua kultur diinkubasi di rak kultur dalam ruang dengan pencahayaan dari lampu fluoresens berintensitas 1000-2000 lux secara terus menerus dengan kisaran suhu $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Pada percobaan I, subkultur ke media baru dengan perlakuan sama setiap 6 minggu, sedangkan pada percobaan II subkultur dilakukan setiap 4 minggu. Variabel yang diamati pada kedua percobaan adalah persentase eksplan yang membentuk kalus/mata tunas, jumlah propagul, jumlah mata tunas, jumlah tunas adventif, dan panjang tunas adventif. Pengamatan untuk percobaan I dilakukan pada minggu ke 20 dan untuk percobaan II pada minggu ke 12.

Hasil percobaan I menunjukkan bahwa penambahan BA ke dalam media MS esensial untuk terjadinya respon organogenesis. Tanpa BA, baik tanpa NAA maupun dengan penambahan $0,05 \text{ mg/l}$ NAA, eksplan tidak menunjukkan respon organogenesis maupun pembentukan kalus. Pembentukan propagul dalam bentuk mata tunas dan/atau tunas adventif dalam percobaan ini terjadi baik secara tidak langsung didahului terbentuknya kalus, maupun secara langsung muncul dari permukaan eksplan. Pembentukan propagul didapatkan pada media dengan konsentrasi BA mulai 1 mg/l , $1,5 \text{ mg/l}$ dan 2 mg/l . Peningkatan konsentrasi BA dari $0,5 \text{ mg/l}$ menjadi 2 mg/l meningkatkan jumlah propagul dari 2,0 menjadi 5,2 buah. Penambahan $0,05 \text{ mg/l}$ NAA ke dalam media MS yang mengandung $1,5 \text{ mg/l}$ BA dan 2 mg/l BA menghasilkan jumlah propagul yang lebih banyak dibandingkan dengan pada media BA tanpa NAA. Pada perlakuan BA saja tanpa NAA, peningkatan konsentrasi BA dari 1 mg/l menjadi 2 mg/l , menyebabkan peningkatan persentase eksplan yang membentuk propagul secara langsung, sedangkan jika media ditambah dengan $0,05 \text{ mg/l}$ NAA, peningkatan konsentrasi BA menyebabkan peningkatan persentase eksplan yang membentuk kalus sebelum terbentuk propagul.

Hasil percobaan II menunjukkan bahwa pemberian 2 mg/l BA ke dalam media MS tanpa penambahan kinetin menghasilkan 7,8 propagul per eksplan. Peningkatan konsentrasi BA dari 2 mg/l menjadi 4 mg/l menyebabkan peningkatan jumlah propagul dari 7,8 menjadi 10,6 propagul per eksplan, namun peningkatan konsentrasi BA menjadi 6 mg/l menghasilkan jumlah propagul per eksplan sebanyak 8,2. Pemberian 1 mg/l kinetin bersamaan dengan BA dalam media MS menyebabkan peningkatan persentase eksplan yang membentuk kalus lebih tinggi. Di samping itu, jika dikombinasikan dengan 1 mg/l kinetin, peningkatan konsentrasi BA dari 2, menjadi 4 dan 6 mg/l menghasilkan jumlah propagule per eksplan yang cenderung menurun.

Kata Kunci : melinjo, *in vitro*, propagul, tunas adventif, organogenesis, kalus, BA, NAA, kinetin.

ABSTRACT

***IN VITRO* ORGANOGENESIS OF *Gnetum gnemon* L. FROM LEAF EXPLANTS AS AFFECTED BY BENZYLADENINE (BA) AND NAPHTHALENEACETIC ACID (NAA), OR BA AND KINETIN**

Oleh

BUDI SULISTIYAWAN

In vitro propagation of *Gnetum gnemon* L. can be used to overcome obstacles in conventional propagation such as very slow and low rate of seed germination, and difficulty-to-root in layering and cuttings. This research consisted of two consecutive experiments, that aimed to study (I) effects of benzyladenine (BA) without or with naphthaleneacetic acid (NAA) on *in vitro* organogenesis; and (II) effects of BA without or with kinetin on *in vitro* organogenesis of *Gnetum gnemon* L. Both experiments used leaf segments of 1 cm x 1 cm with main veins in the middle of the segments. This research was conducted in Plant Science Laboratory, College of Agriculture, The University of Lampung from August 2015 to June 2016.

Both experiments were done in a completely randomized design with three replicates. Each experimental unit consisted of 4 culture vessels each of which contained one explant. In experiment 1, treatments were arranged in factorial (5x2), the first was five levels of BA concentrations (0, 0,5, 1, 1,5 dan 2 mg/l) and the second was two levels of NAA concentrations (0 dan 0,05 mg/l). In experiment 2, treatments were arranged in factorial (3x2), the first was 3 levels of BA (2, 4 and 6 mg/l) and the second was two levels of kinetin (0 dan 1 mg/l). The basal media used for both experiments, was Murashige and Skoog (MS) macro and micro salts enriched with 30 g/l sucrose, 100 mg/l myo-inositol, 0,1 mg/l thiamine-HCl, 0,5 pyridoksin HCl, 0,5 mg/l nicotinic acid dan 2 mg/l glisin. The pH of media solution was adjusted to 5,8 prior to being added with 8 g/l agar powder as solidifying agent, then autoclaved at 121⁰C and 1.2 kg/cm² for 7 minutes. All cultures were incubated on shelves in a room at 26 ±2 ⁰C under continuous light from cool white fluorescent lamps at 1000-2000 lux. Subcultures onto fresh media with the same treatments were done in 6 weeks or 4 weeks intervals for experiment I and II, respectively. Percentage of responding explants

(explants forming callus/shoot or shoot buds), number of propagules per explant, number of shoot buds per explant, number of shoots per explant and length of shoots were recorded after 20 weeks in experiment I and after 12 weeks of cultures in experiment II.

Results of experiment I showed that addition of BA in the media was essential for organogenic responses on *Gnetum gnemon* leaf explants. MS basal medium without BA, regardless of addition of NAA did not form callus, buds nor shoots. The formation of propagules in the form of adventitious buds or shoots occurred both directly from the surface of explants, or indirectly by the formation callus before organogenesis. Adventitious buds or shoot formation was found in media with addition of BA starting from 1 mg/l, 1,5 mg/l and 2 mg/l. Increasing concentration of BA from 0,5 mg/l to 2 mg/l resulted in the increase of number of propagules per explant from 2,0 to 5,2. Furthermore, addition of 0,05 mg/l NAA into BA containing media (i.e., 1,5 mg/l or 2 mg/l BA) resulted in more number of propagules than those in media without NAA. In media with BA alone, increasing concentration of BA from 1 to 2 mg/l resulted in the increase of percentage of eksplant forming propagules directly from explant surface. However, if BA-containing media was added with NAA, increasing BA concentration ended up with the increase of explant forming callus before organogenesis occurred.

Results of experiment II showed that addition of 2 mg/l BA in MS medium without kinetin produced 7,8 propagules per explant, and increasing BA concentraion from 2 mg/l to 4 mg/l resulted in the increase of number of propagules per explant from 7,8 to 10,6. However, addition of 6 mg/l BA in the medium did not produced further increase of propagules per explant. Addition of 1 mg/l kinetin into BA-containing media resulted in higher percentage of explant forming callus, and if kinetin was added in combination with BA, increasing BA concentrations from 2 to 4 and 6 mg/l produced less number of propagules per eksplant.

Key Words : *Gnetum gnemon* L., *in vitro*, organogenesis, propagules, adventitious shoots, callus, BA, NAA, kinetin.

**ORGANOGENESIS MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) *IN VITRO*
DARI EKSPAN DAUN SEBAGAI RESPON TERHADAP
BENZILADENIN (BA) DAN ASAM NAFTALEN ASETAT (NAA),
ATAU BA DAN KINETIN**

Oleh

BUDI SULISTIYAWAN

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
MAGISTER SAINS

Pada

Program Studi Pascasarjana Magister Agronomi
Fakultas Pertanian Universitas Lampung



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER AGRONOMI
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

Judul Tesis

: ORGANOGENESIS MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) *IN VITRO* DARI EKSPLAN DAUN SEBAGAI RESPON TERHADAP BENZILADENIN (BA) DAN ASAM NAFTALEN ASETAT (NAA), ATAU BA DAN KINETIN

Nama Mahasiswa

: Budi Sulistiyawan

Nomor Pokok Mahasiswa

: 1424011001

Program Studi

: Magister Agronomi

Jurusan

: Agroteknologi

Fakultas

: Pertanian

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

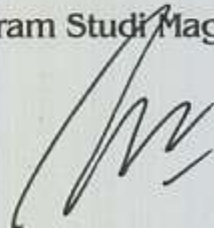


Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.
NIP 19610803 198603 2 002



Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc.
NIP 19610402 198603 1 003

2. Ketua Program Studi Magister Agronomi



Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.
NIP 19610803 198603 2 002

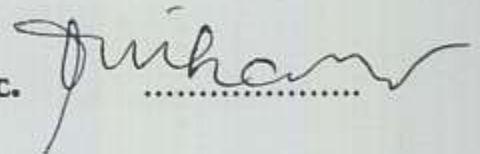
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

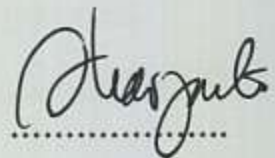
Ketua : **Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.**



Anggota : **Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Dr. Ir. Agus Karyanto, M.Sc.**




2. Dekan Fakultas Pertanian




Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.
NIP 19611020 198603 1 002

3. Direktur Program Pascasarjana




Prof. Dr. Sudjarwo, M.S.
NIP. 19530528 198103 1 002

Tanggal Lulus Ujian Tesis : **6 September 2016**

LEMBAR PERNYATAAN

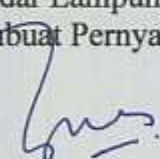
Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Tesis dengan judul “ORGANOGENESIS MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)
IN VITRO DARI EKSPLAN DAUN SEBAGAI RESPON TERHADAP
BENZILADENIN (BA) DAN ASAM NAFTALEN ASETAT (NAA), ATAU
BA DAN KINETIN” adalah karya saya sendiri dan saya tidak melakukan
penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara yang tidak
sesuai dengan tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau
yang disebut plagiarisme.
2. Pembimbing penulisan tesis ini berhak mempublikasikan sebagian atau
seluruh ini tesis ini pada jurnal ilmiah dengan mencantumkan nama saya
sebagai salah satu penulisnya.
3. Hak intelektual karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Unila.

Apabila dikemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya
bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya, dan saya
bersedia dan sanggup dituntut sesuai dengan hukum yang berlaku.



Bandar Lampung, 6 September 2016
Pembuat Pernyataan,


Budi Sulistiyawan
NPM 1424011001

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Tanjung Karang, pada tanggal 9 September 1973 yang merupakan anak keenam dari tujuh bersaudara dari bapak Sutiyo (Almarhum) dan ibu Surni.

Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri 2 Surabaya pada tahun 1985, Sekolah Menengah Pertama PGRI 4 Bandar Lampung tahun 1988, dan Sekolah Menengah Atas Wijaya Bandar Lampung tahun 1991. Tahun 1994, penulis menyelesaikan pendidikan Diploma III di Politeknik Pertanian Universitas Lampung, Jurusan Budidaya Tanaman Perkebunan. Tahun 1999, penulis melanjutkan pendidikan Strata I di Sekolah Tinggi Pertanian Surya Dharma Bandar Lampung dan diselesaikan tahun 2005. Penulis melanjutkan pendidikan di Pascasarjana Universitas Lampung pada Program Studi Magister Agronomi pada tahun 2014.

Sejak tahun 1999 penulis bekerja di Universitas Lampung hingga sekarang. Penulis telah menikah pada tahun 2004 dengan Sri Bina Ratnaningsih dan telah dikaruniai dua orang anak yang bernama Fabio Banyu Cyto dan Quinsa Adiena Voda.

PERSEMBAHAN

Tesis ini kupersembahkan kepada orang-orang yang kucintai dan kusayangi :

Bapak Sutiyo (Almarhum), ibu Surni, Bapak Karsito dan Ibu Sriyatmi

Teristimewa istriku Sri Bina Ratnaningsih, S.Pd.

Kedua motivasi hidupku Fabio Banyu Cyto dan Quinsa Adiena Voda

Kakaku, Purnomo, Supri Handayani, Ngadiyo (Alm), Supri Handayati, Agus Supriyono, Nirmawati, Kelik Supriadi, Titin, Heri Supriyanto, Tika, serta adikku Dedy Hariadi, Resi Jumesti, Muhidin, Kinteki, Kintoko, Dwi, Maskadi, dan Kartika

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan,
sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila
engkau telah selesai dari sesuatu urusan, tetaplah bekerja keras
(untuk urusan yang lain), dan hanya kepada
Tuhanmulah engkau berharap
(QS. Asy-Syarh 5—8)

SANWACANA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, atas segala limpahan rahmat, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian, dan penyusunan tesis ini. Penulis banyak mendapatkan bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak, untuk itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc., selaku pembimbing pertama dan Ketua Program Studi Magister Agronomi yang telah memberikan ide penelitian, gagasan, bimbingan, bantuan, perhatian, saran, dan masukan serta motivasinya, sehingga penulis dapat melakukan penelitian dan menyelesaikan penulisan tesis ini.
2. Bapak Dr.Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc., selaku pembimbing kedua dan pembimbing akademik, yang telah memberikan bimbingan, masukan, saran, motivasi, dan bantuannya selama penelitian dan penyelesaian penulisan tesis ini.
3. Bapak Dr. Ir. Agus Karyanto, M.Sc., selaku pembahas dan penguji atas saran, arahan, bantuan, dan motivasi untuk penulisan tesis ini.
4. Ibu Dr. Ir. Tumiar K. Manik, M.Sc., selaku Sekretaris Program Studi Magister Agronomi.
5. Ibu Dr. Melya Riniarti, S.P., M. Si., dan Duryat, S. Hut., M. Si., selaku Ketua Jurusan dan Sekretaris Jurusan Kehutanan, atas arahan dan motivasinya dalam menyelesaikan pendidikan.

6. Bapak Ir. Indriyanto, M.P., selaku Kepala Laboratorium Silvikultur dan Perlindungan Hutan, serta seluruh Dosen Jurusan Kehutanan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
7. Hayane A. Warganegara, S.P., M.Si., Devika, Vivi, Wiwik, Resti, Yenni, Yanti, Rezlinda, Ria, Syanda, Vanny, Rifky, dan Mbak Leni, sebagai anggota keluarga besar Laboratorium Kultur Jaringan yang telah memberi bantuan dan semangat juang.
8. Desi Maulida, atas persahabatan, bantuan, dan kerjasamanya dalam melaksanakan penelitian dan penulisan tesis. Jamal, Henni, Edo, Nyang, Kresna, Eko, Ovy, Novi, Dini, David, Lucky, Pak Kusmanto, Merry, Novisha, Mustika, Ida, Sri, Yeni, dan teman-teman Magister Agronomi atas bantuan tenaga dan dukungan moril selama penelitian ini.
9. Ibu Sopian, Widyaningrum, Kuswati, Nuraini, Sisdiarto, Heru, dan Mas Tri, yang memotivasi dan mendoakan penulis untuk menyelesaikan pendidikan.
10. Nani Kusri, Rara, Siti Ayuni, dan Yuniar Aviati terimakasih doanya.
11. PLP Fakultas Pertanian Unila, terimakasih bantuannya.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penulisan tesis ini.

Penulis berharap semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi yang membacanya, Amin.

Bandar Lampung, September 2016

Penulis

Budi Sulistiyawan

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang dan Masalah	1
1.2 Tujuan Penelitian	5
1.3 Kerangka Pemikiran	5
1.4 Hipotesis	8
II. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman Melinjo	9
2.2 Perbanyak Tanaman Melinjo secara Konvensional	10
2.3 Perbanyak Tanaman Melinjo secara Teknik Kultur Jaringan	11
2.4 Media Kultur	14
2.5 Zat Pengatur Pertumbuhan	17
III. BAHAN DAN METODE	21
3.1 Percobaan I. Organogenesis melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) <i>in vitro</i> dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan asam naftalen asetat (NAA)	21
3.1.1 <i>Bahan Tanaman</i>	21
3.1.2 <i>Disain Percobaan, Pengamatan, dan Analisis Data</i>	22
3.1.3 <i>Pelaksanaan Percobaan</i>	23

3.1.3.1	<u>Tahap Persiapan Alat dan Bahan</u>	24
3.1.3.2	<u>Pembuatan Media Kultur</u>	24
3.1.3.3	<u>Penanaman Eksplan dan Kondisi Ruang Kultur</u>	25
3.2	Percobaan II. Organogenesis melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) <i>in vitro</i> dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan kinetin	26
3.2.1	<i>Bahan Tanaman</i>	26
3.2.2	<i>Disain Percobaan, Pengamatan, dan Analisis Data</i>	26
3.2.3	<i>Pelaksanaan Percobaan</i>	27
3.2.3.1	<u>Tahap Persiapan Alat dan Bahan</u>	27
3.2.3.2	<u>Pembuatan Media Kultur</u>	28
3.2.3.3	<u>Penanaman Eksplan dan Kondisi Ruang Kultur</u>	29
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1	Hasil Pengamatan	30
4.1.1	<i>Percobaan I. Organogenesis melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) <i>in vitro</i> dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan asam naftalen asetat (NAA)</i>	30
4.1.1.1	<u>Perkembangan kultur secara umum</u>	30
4.1.1.2	<u>Pengaruh berbagai konsentrasi BA dengan atau tanpa NAA terhadap eksplan yang responsif membentuk propagul</u>	34
4.1.1.3	<u>Jumlah Propagul</u>	35
4.1.1.4	<u>Jumlah Mata Tunas</u>	37
4.1.1.5	<u>Jumlah Tunas</u>	40
4.1.1.6	<u>Panjang Tunas Adventif</u>	41
4.1.2	<i>Percobaan II. Organogenesis melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) <i>in vitro</i> dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan kinetin</i>	44
4.1.2.1	<u>Perkembangan kultur secara umum</u>	44
4.1.2.2	<u>Pengaruh berbagai konsentrasi BA dengan atau tanpa kinetin terhadap eksplan yang responsif membentuk propagul</u>	47
4.1.2.3	<u>Jumlah Propagul</u>	49
4.1.2.4	<u>Jumlah Mata Tunas</u>	51
4.1.2.5	<u>Jumlah Tunas</u>	53
4.1.2.6	<u>Panjang Tunas Adventif</u>	55
4.2	Pembahasan	57

4.2.1	<i>Percobaan I. Organogenesis melinjo (Gnetum gnemon L.) in vitro dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan asam naftalen asetat (NAA)</i>	58
4.2.2	<i>Percobaan II. Organogenesis melinjo (Gnetum gnemon L.) in vitro dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan kinetin</i>	62
V.	SIMPULAN DAN SARAN	66
4.1	Simpulan	66
4.2	Saran	67

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Konsentrasi benziladenin (BA) dan asam naftalen asetat (NAA) yang digunakan pada percobaan	22
2. Konsentrasi benziladenin (BA) dan kinetin yang digunakan pada percobaan	26
3. Rekapitulasi hasil penelitian organogenesis melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) <i>in vitro</i> dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan asam naftalen asetat (NAA) pada kultur berumur 20 MSP.....	33
4. Rekapitulasi hasil penelitian organogenesis melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) <i>in vitro</i> dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan kinetin pada kultur berumur 12 MSP.....	46
5. Hasil perhitungan rata-rata jumlah propagul \pm SE (percobaan 1)	71
6. Hasil perhitungan rata-rata jumlah mata tunas \pm SE (percobaan 1)	74
7. Hasil perhitungan rata-rata jumlah tunas \pm SE (percobaan 1)	77
8. Hasil perhitungan rata-rata panjang tunas \pm SE (percobaan 1)	80
9. Hasil perhitungan rata-rata jumlah propagul \pm SE (percobaan 2)	83
10. Hasil perhitungan rata-rata jumlah mata tunas \pm SE (percobaan 2)	85
11. Hasil perhitungan rata-rata jumlah tunas \pm SE (percobaan 2)	87
12. Hasil perhitungan rata-rata panjang tunas \pm SE (percobaan 2)	89
13. Formulasi media Murashige dan Skoog (1962)	91

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Potongan daun melinjo yang digunakan sebagai eksplan berukuran lebih kurang 1 cm x 1 cm dengan tulang daun dibagian tengah.....	22
2. Eksplan melinjo dalam media tanam	25
3. Penampakan kultur berumur 10 MSP (a) kalus, (b) struktur seperti rambut, (c) tonjolan kecil berwarna hijau, dan (d) eksplan hanya mengalami pembengkakan	31
4. Penampakan visual kultur berumur 16 MSP berupa (a) kalus yang mengalami morfogenesis membentuk mata tunas, (b) struktur yang tetap seperti rambut namun pada tulang daun membentuk kalus, (c) tonjolan kecil berwarna hijau (mata tunas) yang terus membesar menjadi tunas, dan (d) eksplan hanya mengalami pembengkakan.....	32
5. Eksplan daun melinjo yang membentuk propagul berupa (a) mata tunas dan (b) tunas pada perlakuan 1,5 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA	35
6. Pengaruh taraf konsentrasi BA dengan atau tanpa NAA terhadap jumlah propagul dari eksplan potongan daun melinjo berumur 20 MSP. Bar menunjukkan SE	36
7. Pengaruh taraf konsentrasi BA dengan atau tanpa NAA terhadap jumlah mata tunas melinjo dari eksplan potongan daun berumur 20 MSP. Bar menunjukkan SE	38
8. Penampakan visual kultur yang membentuk mata tunas pada eksplan berumur 20 MSP pada perlakuan (a) 0 mg/l BA + 0 mg/l NAA, (b) 0 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA, (c) 0,5 mg/l BA + 0 mg/l NAA, (d) 0,5 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA, (e) 1 mg/l BA + 0 mg/l NAA, (f) 1 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA, (g) 1,5 mg/l BA + 0 mg/l NAA, (h) 1,5 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA, (i) 2 mg/l BA + 0 mg/l NAA, dan (j) 2 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA.	39

9.	Pengaruh taraf konsentrasi BA dengan atau tanpa penambahan NAA terhadap jumlah tunas melinjo dari eksplan potongan daun berumur 20 MSP. Bar menunjukkan SE	40
10.	Pengaruh taraf konsentrasi BA dengan atau tanpa NAA terhadap panjang tunas melinjo dari eksplan potongan daun berumur 20 MSP. Bar menunjukkan SE	42
11.	Penampakan visual kultur yang membentuk tunas pada minggu ke 20 MSP pada perlakuan (a) 1,5 mg/l BA + 0 mg/l NAA, (b) 1,5 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA, (c) 2 mg/l BA + 0 mg/l NAA, dan (d) 2 mg/l BA+ 0,05 mg/l NAA	42
12.	Penampakan visual kultur yang membentuk tunas pada minggu ke 28 MSP pada perlakuan (a) 1,5 mg/l BA + 0 mg/l NAA, (b) 1,5 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA, (c) 2 mg/l BA + 0 mg/l NAA, dan (d) 2 mg/l BA+ 0,05 mg/l NAA	43
13.	Penampakan kultur pada minggu ke 4 setelah perlakuan berupa (a) kalus, (b) struktur seperti rambut, (c) respon berupa tonjolan hijau (mata tunas).	44
14.	Penampakan kultur pada minggu ke 6 berupa (a) kalus yang mengalami morfogenesis membentuk mata tunas, (b) struktur yang tetap seperti rambut namun pada tulang daun membentuk kalus, (c) tonjolan kecil berwarna hijau (mata tunas) yang terus membesar.....	45
15.	Propagul yang terbentuk secara tidak langsung diawali dengan (a) terbentuknya kalus berwarna putih, (b) kemudian mengalami morfogenesis membentuk mata tunas, dan (c) berkembang menjadi tunas.....	48
16.	Eksplan daun melinjo yang membentuk propagul berupa (a) mata tunas dan (b) tunas pada perlakuan 4 mg/l BA + 1 mg/l kinetin	50
17.	Pengaruh taraf konsentrasi BA dengan atau tanpa penambahan kinetin terhadap jumlah propagul dari eksplan potongan daun melinjo berumur 12 MSP. Bar menunjukkan SE	51
18.	Pengaruh taraf konsentrasi BA dengan atau tanpa penambahan kinetin terhadap jumlah mata tunas melinjo dari eksplan potongan daun melinjo berumur 12 MSP. Bar menunjukkan SE	52
19.	Penampakan visual kultur yang membentuk mata tunas pada kultur berumur 12 MSP, pada perlakuan (a) 2 mg/l BA, (b) 2 mg/l BA + 1 mg/l kinetin, (c) 4 mg/l BA, (d) 4 mg/l BA + 1 mg/l kinetin, (e) 6 mg/l BA, dan (f) 6 mg/l BA + 1 mg/l kinetin	53

20.	Pengaruh taraf konsentrasi BA dengan atau tanpa penambahan kinetin terhadap jumlah tunas melinjo dari eksplan potongan daun berumur 12 MSP. Bar menunjukkan SE	54
21.	Pengaruh taraf konsentrasi BA dengan atau tanpa penambahan kinetin terhadap panjang tunas melinjo dari eksplan potongan daun berumur 12 MSP. Bar menunjukkan SE	55
22.	Penampakan visual kultur berumur 12 MSP pada perlakuan (a) 2 mg/l BA, (b) 2 mg/l BA + 1 mg/l kinetin, (c) 4 mg/l BA, (d) 4 mg/l BA + 1 mg/l kinetin, (e) 6 mg/l BA, dan (f) 6 mg/l BA + 1 mg/l kinetin	56

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang dan Masalah

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan salah satu tanaman tahunan anggota famili Gnetaceae yang berpotensi cukup besar untuk dikembangkan. Produk kayunya dapat digunakan sebagai bahan papan dan alat rumah tangga sederhana. Daun-daun muda, bunga dan buahnya dapat dimanfaatkan sebagai bahan makanan. Pohon melinjo dapat dimanfaatkan sebagai tanaman agroforestri, karena memiliki perakaran yang kuat dan dapat digunakan untuk pemulihan kembali areal kritis, sehingga direkomendasikan sebagai tanaman penghijauan. Melinjo banyak ditanam di pekarangan sebagai peneduh atau pembatas pekarangan dan terutama dimanfaatkan buah dan daunnya (Tampubolon, 2013).

Tanaman melinjo merupakan tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman agroforestri. Beberapa hal yang menguatkan dalam pengembangan agroforestri melinjo adalah a. kondisi agroekologi dan kelembagaan usahatani masyarakat, b. sifat unggul komoditi perkebunan melinjo dan pohon industrinya, c. tersedianya sumberdaya lahan yang sesuai bagi tanaman melinjo, d. sarana/prasarana dan kelembagaan penunjang yang memiliki komitmen tinggi terhadap perkebunan dan industri pengolahannya, e. potensi pasar domestik, regional dan nasional yang sangat besar, f. peluang memperbaiki kesejahteraan petani dan masyarakat

jika dikelola secara profesional dan berkeadilan, dan g. keberlanjutannya sangat terjamin karena masyarakat ikut memiliki (Hasyim dan Sulastri, 2009).

Saat ini budidaya melinjo masih menggunakan perkembangbiakan generatif dan vegetatif konvensional. Perkembangbiakan generatif dengan menggunakan biji sedangkan secara vegetatif konvensional seperti pencangkokan, stek batang, grafting, dan okulasi juga belum memberikan solusi bagi petani. Secara generatif, perbanyakan tanaman melinjo menghadapi dua masalah, yaitu perkecambahan biji lambat dan ketidakpastian kelamin tanaman. Biji melinjo memiliki kulit atau cangkang yang keras, sehingga membutuhkan waktu yang lama dalam proses perkecambahan hingga mencapai 12 bulan dengan persentase perkecambahan yang sangat rendah yaitu 1—2 % (Sunanto dalam Yunita, 2004). Bibit yang dihasilkan dari proses semai biji melinjo tidak diketahui secara jelas jenis kelaminnya, apakah bibit berkelamin jantan atau betina. Masalah jenis kelamin tanaman dapat diatasi dengan teknik perbanyakan vegetatif seperti pencangkokan, stek batang, grafting, dan okulasi. Namun, menemui kendala seperti jumlah bibit yang dihasilkan relatif sedikit dan sulit tersedia dalam jumlah besar, tidak seragam, waktu yang lama, serta merusak pohon induk (Yunita, 2004).

Pembiakan secara *in vitro* adalah alternatif untuk mengatasi masalah tersebut, kultur jaringan merupakan teknik menumbuh-kembangkan bagian tanaman, baik berupa sel, jaringan, atau organ dalam kondisi aseptik secara *in vitro*. Teknik ini dicirikan oleh kondisi kultur yang aseptik, penggunaan media kultur buatan

dengan kandungan nutrisi lengkap dan zat pengatur tumbuh serta kondisi ruang kultur yang suhu dan pencahayaannya terkontrol (Yusnita, 2003).

Media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyakan tanaman secara kultur jaringan. Berbagai komposisi kultur telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Komponen media kultur lengkap terdiri dari: aquades, hara makro dan mikro, gula, vitamin dan bahan organik, bahan suplemen alami, zat pengatur tumbuh, dan bahan pematat (Yusnita, 2003).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan salah satu komponen penting yang menentukan keberhasilan kultur jaringan. Jenis dan konsentrasi ZPT tergantung pada tujuan dan tahap pengulturan. ZPT yang umumnya digunakan adalah dari golongan sitokinin derivat adenine, seperti benziladenin (BA), *furfurylaminopurine* (kinetin) dan *isopentenyladenine* (2-iP). Sedangkan dari golongan auksin, seperti *indoleacetic acid* (IAA), *indolebutyric acid* (IBA), dan *asam naftalenasetat* (NAA) (Yusnita, 2015).

Skoog dan Miller (1957) dalam Hapsoro dan Yusnita (2015), menyatakan bahwa regenerasi tunas dan akar *in vitro* dikontrol secara hormonal oleh ZPT sitokinin dan auksin. Rasio yang tinggi antara sitokinin dengan auksin dalam sistem kultur *in vitro* akan mengarahkan eksplan untuk pembentukan tunas dan menghambat pembentukan akar. Sebaliknya, ratio yang tinggi antara auksin dengan sitokinin akan mengarahkan eksplan untuk pembentukan akar dan menghambat pembentukan tunas. Sedangkan jika, auksin dan sitokinin berada dalam jumlah berimbang, maka eksplan akan membentuk kalus.

Penggunaan zat pengatur tumbuh dalam kultur jaringan tergantung pada jenis tanaman yang digunakan serta tujuan kegiatan. Untuk pembentukan tunas umumnya menggunakan zat pengatur tumbuh sitokinin (BA atau kinetin), untuk pembentukan kalus menggunakan auksin 2,4-D dan untuk pembentukan akar menggunakan auksin (IAA, IBA, atau NAA). Pada tanaman tertentu sering pula digunakan kombinasi sitokinin dan auksin tergantung tujuan pembentukan tunas, akar, atau kalus. Perimbangan sitokinin terhadap auksin atau sebaliknya dapat mengarahkan proses morfogenesis (Lestari, 2011).

Menurut Hartmann *et al.* (2011), sitokinin diperlukan untuk menginduksi tunas dari eksplan, namun konsentrasi efektif dari suatu jenis sitokinin tergantung pada genotip tanaman. BA merupakan sitokinin yang banyak digunakan untuk merangsang perbanyakan tunas adventif atau tunas aksilar *in vitro* pada berbagai tanaman. Namun demikian, karena interaksi yang nyata antara ZPT dengan faktor genetik tanaman yang dikulturkan, maka kebutuhan akan jenis dan konsentrasi auksin dengan atau tanpa sitokinin sebagai stimuli dalam regenerasi organ (tunas/akar) pun bersifat *species-specific*. Kekhususan akan kebutuhan jenis dan konsentrasi ZPT yang diperlukan untuk regenerasi kalus, tunas, atau akar *in vitro* ini teramati pada beragam tanaman yang berbeda (Yusnita, 2015).

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab masalah yang dirumuskan dalam pertanyaan sebagai berikut:

1. Bagaimanakah pengaruh konsentrasi benziladenin (BA) dengan atau tanpa asam naftalen asetat (NAA) terhadap organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang berasal dari eksplan daun secara *in vitro*.

2. Bagaimanakan pengaruh konsentrasi benziladenin (BA) dengan atau tanpa kinetin terhadap organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang berasal dari eksplan daun secara *in vitro*.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mempelajari pengaruh konsentrasi benziladenin (BA) dengan atau tanpa asam naftalen asetat (NAA) terhadap organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang berasal dari eksplan daun secara *in vitro*.
2. Mempelajari pengaruh konsentrasi benziladenin (BA) dengan atau tanpa kinetin terhadap organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang berasal dari eksplan daun secara *in vitro*.

1.3 Kerangka Pemikiran

Kultur jaringan adalah suatu teknik untuk mengisolasi, sel, protoplast, jaringan, dan organ dan menumbuhkan bagian tersebut pada nutrisi yang mengandung zat pengatur tumbuh tanaman pada kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman sempurna kembali.

Kultur organ merupakan pembiakan yang bahan tanamnya menggunakan organ, seperti ujung akar, pucuk aksilar, tangkai daun, helaian daun, bunga, buah muda, akar dan organ lainnya. Organogenesis adalah pembentukan organ berupa tunas atau akar dari sel-sel eksplan. Pada pola regenerasi ini, tunas adventif terbentuk dari bagian eksplan yang sebelumnya bukan berupa mata tunas (Yusnita, 2015).

Pelaksanaan kultur jaringan didasarkan pada teori sel oleh Schleiden dan Schwann, bahwa sel mempunyai kemampuan autonom, bahkan mempunyai kemampuan totipotensi. Totipotensi yaitu kemampuan setiap sel, dari mana saja sel tersebut diambil, bila diletakkan dalam lingkungan yang sesuai akan dapat tumbuh menjadi tanaman yang sempurna (Yusnita, 2003).

Skoog dan Miller (1957) dalam Yusnita (2003), mengemukakan bahwa regenerasi tunas dan akar *in vitro* dikontrol secara hormonal oleh ZPT sitokinin dan auksin. Namun demikian, karena interaksi yang nyata antara ZPT dengan faktor genetik tanaman yang dikulturkan, maka kebutuhan akan jenis dan konsentrasi auksin dengan atau tanpa sitokinin sebagai stimuli dalam regenerasi organ (tunas/akar) pun bersifat *species-specific*. Kekhususan akan kebutuhan jenis dan konsentrasi ZPT yang diperlukan untuk regenerasi kalus, tunas, atau akar *in vitro* ini teramati pada beragam tanaman yang berbeda (Yusnita, 2015). Keberhasilan perbanyak tanaman secara *in vitro* baik melalui organogenesis maupun embriogenesis somatik sangat dipengaruhi oleh genotip dan eksplan, jenis media dasar, serta jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan (Yusnita, 2003).

Saronto (1996), melaporkan bahwa eksplan potongan daun melinjo berukuran 1 x 1,5 cm pada media MS dengan konsentrasi BA 7,5 μM menghasilkan mata tunas sebanyak 17,05. Sedangkan pada media WPM dengan konsentrasi BA 7,5 μM menghasilkan jumlah mata tunas sebanyak 9,71. Jumlah tunas terbanyak terdapat pada perlakuan BA 4 dan 5 μM , yaitu 4,35—5,39 pada media MS. Sedangkan pada media WPM dengan penambahan BA 7,5 μM menghasilkan 2,85 tunas.

Hasil penelitian Deny (1997) yang menggunakan eksplan daun melinjo berukuran 1 x 1,5 cm dengan perlakuan *thidiazuron* 0,001—10 μ M menghasilkan jumlah mata tunas antara 12,60—21,60 mata tunas dan 4,33—8,66 tunas. Sementara Astuti (1998), melaporkan bahwa kultur daun melinjo berukuran 1 x 1,5 cm menggunakan media MS dengan penambahan TDZ 0,005 μ M dengan perlakuan ukuran botol menghasilkan jumlah tunas terbanyak pada ukuran botol 200 ml dengan jumlah tunas mencapai 3,33 tunas/eksplan.

Dokumentasi literatur untuk prosedur perbanyak tanaman secara kultur jaringan menunjukkan bahwa komposisi media dan ZPT untuk masing-masing spesies, antar klon, atau varietas dalam satu spesies sering berbeda satu dengan lainnya. Formulasi media yang digunakan diharapkan dapat memberikan hasil yang baik terhadap tanaman yang dihasilkan.

Menurut Liberman *et al.* (2010), konsentrasi 4,44 μ M BA dan 2,85 μ M IAA mampu menghasilkan jumlah tunas 1,2 tunas pada eksplan daun muda *Brunfelsia calycina* yang diinkubasi pada media MS usia 6 minggu dan 2,5 tunas pada usia 9 minggu.

Pada tanaman buah naga, waktu muncul tunas dari eksplan yang terbaik didapat pada umur 25,5 hari, yaitu perlakuan BAP 4 ppm dan NAA 1 ppm, sedangkan jumlah tunas terbanyak (1,7) didapat pada perlakuan BAP 6 ppm dan NAA 1 ppm (Suparaini *et al.*, 2013).

Perbanyak tanaman melinjo secara generatif mempunyai masalah dalam perkecambahan yang lambat dan keberhasilan yang rendah. Upaya pembiakan

secara kultur jaringan merupakan alternatif untuk mengatasi masalah tersebut. Namun, kebutuhan akan jenis dan konsentrasi sitokinin dengan atau tanpa auksin sebagai stimuli dalam regenerasi organ tunas bersifat *species-specific* tergantung genotip tanaman yang dikulturkan (Yusnita, 2015). Oleh karena itu, konsentrasi dan jenis ZPT yang tepat untuk memperbanyak tunas *in vitro* tanaman melinjo masih sangat diperlukan untuk memberikan keefektifitasan perlakuan terhadap hasil yang diperoleh.

1.4 Hipotesis

Percobaan I. Organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) *in vitro* dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan asam naftalenasetat (NAA).

1. BA merangsang/menginduksi pembentukan mata tunas/tunas adventif pada eksplan potongan daun melinjo *in vitro*.
2. Penambahan NAA ke dalam media MS + BA meningkatkan jumlah propagul melinjo yang dihasilkan.

Percobaan II. Organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) *in vitro* dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan kinetin.

1. Peningkatan konsentrasi BA dari 2 menjadi 4 atau 6 mg/l dalam media MS meningkatkan pembentukan mata tunas/tunas adventif pada eksplan potongan daun melinjo *in vitro*.
2. Penambahan kombinasi BA dengan kinetin dalam media MS menghasilkan propagul yang lebih banyak dibandingkan pada media BA tanpa kinetin.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman Melinjo

A. Klasifikasi

- Divisio : Spermatophyta
- Subdivisio : Gymnospermae
- Classis : Gnetinae
- Ordo : Gnetales
- Familia` : Gnetaceae
- Genus : Gnetum
- Spesies : *Gnetum gnemon* L.

B. Deskripsi

Habitus tanaman melinjo adalah berupa pohon dengan ketinggian mencapai ± 15 meter. Sistem perakarannya adalah akar tunggang (*radix primaria*). Batangnya berkayu, berbentuk bulat (*teres*) dengan permukaan rata (*laevis*) dan sistem percabangan *simpodial*. Daun melinjo merupakan daun tunggal yang terdiri dari tangkai daun (*petiolus*) dan helaian daun (*lamina*). Bentuk helaian daunnya *oblongus*, ujung daun *acuminatus*, tepi daun *integer* dan tulang daun menyirip (*penninervis*). Duduk daunnya berhadapan (*folia opposita*) tanpa *stipula*. Daun yang dipatahkan atau disobek memperlihatkan serabut daun yang menonjol. Bunganya *unisexualis dioecus*, terdapat pada bulir dalam percabangan

dichasium. Pada ketiak daun (*axillaris*) melinjo, terdapat *brachtea* pada tiap karangan. Bunga jantan melinjo terdiri dari benang sari yang di atasnya terdapat sebaris ovulum yang steril. Bunga betinanya dalam karangan bulir dengan ovulum yang sebagian *fertile* yang dibungkus oleh *perigonium* yang berdaging. Biji melinjo diselubungi oleh selaput luar yang keras yang disebut integumen luar dan selaput dalam yang disebut integumen dalam dan juga diselubungi oleh tenda bunga (*perigonium*) yang berdaging dan akhirnya berwarna merah jika bijinya telah masak.

2.2 Perbanyak Tanaman Melinjo secara Konvensional

Tanaman melinjo dapat dibudidayakan secara konvensional, yaitu secara generatif (biji) atau vegetatif (cangkokan, okulasi, penyambungan dan stek). Untuk memperoleh bibit secara generatif, menggunakan buah-buah matang yang telah berjatuhan dari pohonnya. Kulit buahnya dibuang dan bijinya dikering-anginkan serta disimpan. Benih yang akan ditumbuhkan diprasemaikan (*pre-germinated*) dalam wadah yang diisi dengan beberapa lapis pasir yang letaknya berselang-seling dengan lapisan benih. Setelah kecambah sudah mulai tumbuh, benih dapat dipindah ke persemaian. Semai-semai dipelihara lebih lanjut, mula-mula dibawah naungan selama 6 bulan atau lebih, kemudian dipindah ke areal tanam pada awal musim hujan. Secara vegetatif tanaman melinjo dapat diperbanyak dengan teknik cangkok. Teknik cangkok memiliki keuntungan, diantaranya dapat dipilih pohon induk terbaik dan bibit yang dihasilkan cepat berbuah. Keberhasilan pencangkokan bergantung kepada letak tempat pengirisan, bagian atas dari cincin kulit luar yang akan dibuang harus berada di ujung buku yang membengkak. Tumbuhnya perakaran berlangsung 2 bulan atau

lebih. Hasil cangkokan dipelihara selama beberapa waktu setelah dipisahkan dari pohon induknya sebelum ditanam di lapangan. Cangkokan hendaknya dipangkas untuk menjadikan seimbang antara bagian atas dan perakarannya, dan ditanam dalam pot besar, serta disimpan di bawah naungan (Tampubolon, 2013).

2.3 Perbanyak Tanaman Melinjo secara Teknik Kultur Jaringan

Kultur jaringan tanaman merupakan teknik menumbuh kembangkan bagian tanaman, baik berupa sel, jaringan, atau organ dalam kondisi aseptik secara *in vitro*. Teknik ini dicirikan oleh kondisi kultur yang aseptik, penggunaan media kultur buatan dengan kandungan nutrisi lengkap dan ZPT (zat pengatur tumbuh), serta kondisi ruang kultur yang suhu dan pencahayaannya terkontrol (Yusnita, 2003).

Tahap pembiakan tanaman secara kultur jaringan menurut Yusnita (2003), dapat dibagi menjadi beberapa tahap.

1. Tahap 0, yaitu memilih dan menyiapkan tanaman induk untuk eksplan.
2. Tahap 1, yaitu inisiasi kultur (*culture establishment*).
3. Tahap 2, yaitu multiplikasi atau perbanyak propagul (bahan tanaman yang diperbanyak seperti tunas atau embrio).
4. Tahap 3, yaitu mempersiapkan untuk transfer propagul ke lingkungan eksternal yaitu pemanjangan tunas, induksi, dan perkembangan akar.
5. Tahap 4, yaitu aklimatisasi planlet ke lingkungan eksternal.

Eksplan adalah bagian tanaman yang diambil dari tanaman induk yang digunakan sebagai bahan tanam dan dipindahkan ke dalam medium buatan untuk pertumbuhan atau pemeliharaan. Eksplan yang digunakan merupakan salah satu faktor penting yang menentukan keberhasilan perbanyakan *in vitro*. Beberapa aspek penting yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan eksplan adalah dari bagian tanaman mana eksplan diambil, umur jaringan, kesehatan tanaman atau kebersihannya dari infestasi mikroorganisme, ukuran eksplan, dan cara sterilisasi eksplan (Yusnita, 2003).

Menurut Yusnita (2003), bagian jaringan tanaman yang digunakan adalah jaringan muda yang sedang tumbuh aktif, karena mempunyai daya regenerasi lebih tinggi, sel-selnya masih aktif membelah diri, dan relatif lebih bersih dari sumber kontaminan. Sementara itu, jaringan tanaman yang sudah tua lebih sulit beregenerasi, dan biasanya mengandung lebih banyak kontaminan.

Sumber eksplan sebagai tanaman harus jelas jenis dan varietasnya, serta harus sehat dan bebas dari hama penyakit. Eksplan untuk inisiasi kultur melinjo menggunakan daun-daun muda. Tahap inisiasi bertujuan untuk mendapatkan kultur yang aseptik dan aksenik. Tahap selanjutnya adalah tahap multiplikasi. Pada prinsipnya tahapan ini ditujukan untuk menggandakan tunas dan memeliharanya pada keadaan tertentu, yang sewaktu-waktu bisa dilanjutkan untuk tahap berikutnya. Pada tahap ini biasanya dibutuhkan zat pengatur tumbuh (ZPT). Tunas-tunas dari tahap multipikasi selanjutnya menuju tahap pengakaran dan aklimatisasi. Selanjutnya, aklimatisasi planlet ke lingkungan eksternal, agar planlet mampu beradaptasi dan tumbuh dengan baik pada lingkungan *ex vitro*.

Perbanyak tanaman secara *in vitro* untuk tanaman berkayu relatif lebih sulit. Hal ini terjadi karena spesies tanaman berkayu memiliki kemampuan regenerasi dan laju multiplikasi yang relatif rendah, mengekskresi senyawa toksik yang dapat merusak media, dan induksi rejuvenilitas serta sterilisasi eksplan yang relatif lebih sulit.

Kultur *in vitro* tanaman melinjo telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Yusnita *et al.* (1994), melaporkan bahwa kultur cabang satu buku dalam medium *woody plant medium* (WPM) yang mengandung BA 10 μM didapatkan rata-rata 8,33 mata tunas adventif dan pada medium $\frac{1}{2}$ MS yang mengandung BA 10 μM dengan eksplan potongan daun diperoleh rata-rata 15 mata tunas adventif.

Saronto (1996), melaporkan bahwa eksplan potongan daun melinjo berukuran 1 x 1,5 cm pada media MS dengan konsentrasi BA 7,5 μM menghasilkan mata tunas sebanyak 17,05. Sedangkan pada media WPM dengan konsentrasi BA 7,5 μM menghasilkan jumlah mata tunas sebanyak 9,71. Jumlah tunas terbanyak terdapat pada perlakuan BA 4 dan 5 μM , yaitu 4,35—5,39 pada media MS. Sedangkan pada media WPM dengan penambahan BA 7,5 μM menghasilkan 2,85 tunas.

Hasil penelitian Deny (1997) yang menggunakan eksplan daun melinjo berukuran 1 x 1,5 cm dengan perlakuan *thidiazuron* 0,001—10 μM menghasilkan jumlah mata tunas antara 12,60—21,60 mata tunas dan 4,33—8,66 tunas. Sementara Astuti (1998), melaporkan bahwa kultur daun melinjo berukuran 1 x 1,5 cm menggunakan media MS dengan penambahan TDZ 0,005 μM dengan perlakuan

ukuran botol menghasilkan jumlah tunas terbanyak pada ukuran botol 200 ml dengan jumlah tunas mencapai 3,33 tunas/eksplan.

Rusyadi *et al.* (2000), melaporkan bahwa tunas *in vitro* melinjo dikulturkan pada media dasar WPM atau Anderson dan dikombinasikan dengan TDZ (0,1, 0,3, dan 0,5 mg/l) serta BA (0,5 dan 1,0 mg/l) menunjukkan bahwa media dasar Anderson dengan BA 0,5 mg/l kombinasi dengan TDZ 0,1 mg/l menghasilkan jumlah tunas terbanyak 5,50 tunas. Sementara pada media WPM dengan perlakuan yang sama menghasilkan jumlah tunas 3,20 tunas. Yunita (2004), melaporkan bahwa eksplan tunas melinjo sepanjang 10—20 mm yang berasal dari lapang dikulturkan pada media MS dengan penambahan 0,3 mg/l TDZ menghasilkan tunas sebanyak 5,78 tunas, diikuti dengan konsentrasi 0,1 mg/l TDZ yang menghasilkan 5,4 tunas.

2.4 Media Kultur

Media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan kultur. Beberapa karakteristik dari kultur jaringan antara lain pengulturan dilakukan secara *in vitro*, dalam kondisi aseptik, lingkungan yang terkontrol, menggunakan media berisi hara lengkap, dan sering kali menggunakan zat pengatur tumbuh.

Formulasi media yang digunakan adalah media Murashige dan Skoog (1962) yang mengandung komponen garam-garam mineral, gula, dan vitamin, dengan penambahan zat pengatur tumbuh dan media pematik berupa agar.

Yusnita (2003) menyebutkan, komponen media kultur jaringan tanaman adalah sebagai berikut.

1. Air destilata atau aquades

Merupakan air hasil penyulingan yang tidak mengandung mineral atau senyawa inorganik. Karena akan mempengaruhi pertumbuhan tanaman yang dikulturkan.

2. Hara makro dan mikro

Hara makro adalah hara yang dibutuhkan tanaman dalam jumlah yang banyak, seperti N, P, K, Ca, Mg, dan S. Hara mikro dibutuhkan tanaman dalam jumlah yang sedikit, seperti Fe, Cu, Mn, Zn, B, Mo, dan Co. Untuk melarutkannya dalam air, unsur-unsur hara tersebut harus dalam bentuk garam. Khusus Fe, diberikan dalam bentuk FeSO_4 dengan agen pengelat berupa Na_2EDTA .

3. Gula (umumnya sukrosa) sebagai sumber energi

Gula digunakan sebagai sumber energi dalam media kultur, karena umumnya bagian tanaman atau eksplan yang dikulturkan tidak autotrof dan mempunyai laju fotosintesis yang rendah. Gula yang paling sering digunakan adalah sukrosa. Glukosa dan fruktosa dapat digunakan, tetapi harganya lebih mahal dan hasilnya tidak lebih baik daripada sukrosa. Konsentrasi sukrosa yang digunakan berkisar antara 1—5% (10—50 g/l), tetapi untuk kebanyakan pengulturan 2—3% sukrosa umumnya merupakan konsentrasi yang optimum.

4. Vitamin, asam amino, dan bahan organik lain

Vitamin, asam amino, dan bahan organik lain seperti mio-inositol merupakan komponen media yang berpengaruh baik terhadap pertumbuhan kultur.

- o Vitamin yang sering digunakan dari kelompok vitamin B, yaitu tiamin-HCl (vitamin B1), piridoksin-HCl (vitamin B6), asam nikotinat, dan riboflavin (vitamin B2). Dari ketiga vitamin ini, yang terpenting adalah tiamin.

Vitamin C, seperti asam sitrat dan asam askorbat, digunakan sebagai antioksidan untuk mencegah atau mengurangi pencokelatan atau penghitaman eksplan.

- Asam amino yang sering digunakan adalah L-glutamin, asam aspartat, L-arginin, dan glisin.
- Mio-inositol merupakan heksitol (gula alkohol berkarbon enam) sering digunakan sebagai salah satu komponen media yang penting karena merangsang pertumbuhan jaringan yang dikulturkan.

5. Zat pengatur tumbuh

Merupakan salah satu komponen penting yang menentukan keberhasilan kultur jaringan. Jenis dan konsentrasi ZPT tergantung pada tujuan dan tahap pengkulturan. ZPT yang umumnya digunakan adalah dari golongan sitokinin seperti benziladenin (BA), kinetin (furfural-aminopurin) dan 2-iP. Sedangkan dari golongan auksin, seperti IBA dan NAA.

6. Suplemen berupa bahan-bahan alami, jika diperlukan

Bahan alami digunakan sebagai penambah media, terutama jika zat-zat yang sudah teridentifikasi belum dirasa cukup untuk pertumbuhan kultur. Bahan alami merupakan sumber berbagai asam amino, peptide, vitamin dan zat pengatur tumbuh. Bahan-bahan alami merupakan ekstrak suplemen alami seperti jus tomat, jus jeruk, air kelapa, ekstrak ragi, ekstrak malt, kentang, dan bubur pisang.

7. Agar-agar atau gelrite sebagai pematat media

Merupakan campuran berbagai polisakarida dari galaktosa yang diekstrak dari ganggang laut. Jenis agar yang sering digunakan dalam kultur jaringan adalah

Difco-bacto agar, Difco-purified agar, dan Taiyo agar. Agar untuk kue dapat digunakan tanpa efek merugikan. Konsentrasi agar dalam media berkisar 6—10 g/l.

2.5 Zat Pengatur Pertumbuhan

Zat pengatur tumbuh (ZPT) adalah senyawa organik bukan hara yang dalam konsentrasi rendah ($< 1\text{mM}$) dapat mendorong, menghambat atau secara kualitatif mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman. ZPT merupakan komponen penting dalam memberi arah pertumbuhan dan perkembangan sel atau jaringan tanaman.

Dua golongan ZPT yang paling berperan dalam proses morfogenesis adalah sitokinin dan auksin. Skoog dan Miller (1957) dalam Yusnita (2003), mengemukakan bahwa regenerasi tunas dan akar *in vitro* dikontrol secara hormonal oleh ZPT sitokinin dan auksin. Sitokinin dan auksin merupakan dua kelompok ZPT yang merupakan komponen media yang penting dalam kultur jaringan.

Armini *et al.* (1991) menyatakan bahwa untuk pertumbuhan dan perkembangan kultur *in vitro* diperlukan komposisi dan atau konsentrasi ZPT yang berbeda untuk satu varietas dengan varietas lain dari suatu tanaman. Penentuan taraf konsentrasi juga disesuaikan dengan tipe organ atau eksplan, metode kultur jaringan dan tingkat kultur jaringan (pembuatan kalus, induksi tunas, induksi akar, dan lain-lain).

Auksin berperan penting dalam merangsang pemanjangan batang, mencegah gugur daun dan buah, merangsang pembungaan, merangsang pembentukan buah partenokarpi, mengatur dominasi apikal, merangsang pembentukan akar adventif, merangsang pembentukan kalus, dan mengatur embryogenesis somatic (Taiz and Zeiger, 2010).

Pada kultur jaringan tanaman, auksin konsentrasi relatif rendah bila dikombinasikan dengan sitokinin konsentrasi tinggi dapat merangsang pembentukan tunas adventif atau merangsang perbanyakan tunas samping. Jika auksin digunakan tanpa sitokinin, maka akan merangsang pembentukan akar, dan pada konsentrasi tinggi akan merangsang pembentukan kalus dan embrio. NAA merupakan salah satu auksin yang secara fisiologi lebih aktif dan pada umumnya digunakan dengan konsentrasi 0,01—10 mg/l, atau 50—100 mg/l jika digunakan bersama-sama dengan arang aktif (Hapsoro dan Yusnita, 2015).

Sitokinin merupakan ZPT yang mengatur pembelahan sel dan berpengaruh terhadap sejumlah proses fisiologi dan perkembangan, diantaranya penundaan senesen daun, mendorong mobilisasi zat makanan dalam tanaman, dan pengaturan sistesis pigmen fotosintesis dan sistesis protein. Bersama dengan auksin, sitokinin mengatur siklus sel dan dibutuhkan untuk pembelahan sel (Taiz and Zeiger, 2010). Penambahan sitokinin dalam media kultur umumnya menginduksi pembentukan tunas samping dan tunas adventif dari eksplan (Hapsoro dan Yusnita, 2015). Contoh sitokinin adalah benziladenin (BA), kinetin (furfuril-aminopurin), 2-iP, thidiazuron.

Benziladenin merupakan satu jenis sitokinin sintetik yang banyak digunakan dalam kultur jaringan untuk membentuk tunas majemuk. BA merupakan sitokinin tipe adenin yang dicirikan oleh basa adenin pada struktur molekulnya.

Pada kebanyakan tanaman secara *in vitro*, seringkali penggunaan sitokinin dikombinasikan dengan auksin dengan harapan mendapatkan hasil yang lebih baik. Penggunaan BA yang dikombinasikan dengan NAA pada kultur jaringan dilaporkan oleh beberapa peneliti. Hasil penelitian yang dilakukan Unda *et al.* (2007), yang menggunakan mediakultur yang diberi perlakuan NAA 0,54 μM dengan kombinasi BA 4,44 μM mampu menghasilkan 30,7 tunas pada *Exacum* genotype 01-37-67. Pada tanaman *Sclerocarya birrea* supsp. Caffra yang dikulturkan hingga berumur 30 hari pada media MS dengan perlakuan BA 4,0 μM dengan kombinasi perlakuan NAA 1,0 μM menghasilkan persentase tunas tertinggi mencapai 22,2% dibandingkan dengan kombinasi perlakuan BA 4,0 μM dengan IAA 1,0 μM yang hanya 13,8 % (Moyo *et al.*, 2009).

Penggandaan tunas pada tanaman berkayu atau tanaman tahunan seperti gaharu, cendana, belimbing, sukun, dan melinjo pada umumnya memerlukan ZPT dalam konsentrasi yang lebih tinggi berkisar antara 5—10 mg/l, untuk meningkatkan proliferasi tunas dan kadang perlu ditambahkan *thidiazuron* atau auksin seperti NAA dalam konsentrasi rendah yaitu 0,1—0,3 mg/l. Sebaliknya pada tanaman herba seperti seruni dan rami diperlukan sitokinin seperti BA dengan konsentrasi rendah, yaitu berkisar 0,1—1 mg/l (Lestari, 2011).

Eksplan empulur tembakau, yang dikulturkan pada media yang mengandung kinetin, IAA atau kombinasi keduanya menunjukkan bahwa nisbah sitokinin

dengan auksin yang tinggi mendorong pembentukan tunas, nisbah sitokinin dengan auksin yang rendah mendorong pembentukan akar, dan jumlah sitokinin dan auksin yang seimbang mendorong pembentukan kalus. Konsep ini tidak selalu berlaku pada setiap spesies tanaman yang dikulturjaringkan, namun hubungan antara sitokinin dan auksin dalam mengontrol regenerasi tunas atau akar berlaku untuk berbagai spesies tanaman (Skoog dan Miller, 1957 dalam Yusnita, 2003).

III. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan studi pembiakan *in vitro* tanaman melinjo yang terdiri dari 2 percobaan, yaitu:

1. Organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) *in vitro* dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan asam naftalen asetat (NAA).
2. Organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) *in vitro* dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan kinetin.

Kedua percobaan tersebut dilakukan di Laboratorium Ilmu Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Percobaan 1 dilaksanakan pada bulan Agustus 2015 hingga Januari 2016 dan percobaan 2 dilaksanakan pada Maret hingga Juni 2016.

3.1 Percobaan I. Organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) *in vitro* dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan asam naftalen asetat (NAA).

3.1.1 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah tanaman melinjo dewasa yang sudah berbuah. Eksplan yang digunakan adalah potongan daun muda berwarna hijau kemerahan yang sudah berkembang penuh (*fully expanded*), yang dipotong-potong menjadi berukuran lebih kurang 1 cm x 1 cm dengan tulang daun di bagian tengah (Gambar 1).



Gambar 1. Potongan daun melinjo yang digunakan sebagai eksplan berukuran lebih kurang 1 cm x 1 cm dengan tulang daun di bagian tengah

3.1.2 *Disain Percobaan, Pengamatan dan Analisis Data*

Percobaan ini dilaksanakan menggunakan rancangan teracak lengkap dengan perlakuan yang disusun secara faktorial (5x2). Faktor pertama adalah berbagai konsentrasi benziladenin (BA) yaitu 0, 0,5, 1, 1,5, dan 2 mg/l. Faktor kedua adalah tanpa NAA dan dengan 0,05 mg/l NAA. Keseluruhan perlakuan yang digunakan adalah sebagaimana disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi benziladenin (BA) dan asam naftalen asetat (NAA) yang digunakan pada percobaan.

Perlakuan (mg/l)	
BA	NAA
0	0
0,5	0
1	0
1,5	0
2	0
0	0,05
0,5	0,05
1	0,05
1,5	0,05
2	0,05

Setiap perlakuan diulang tiga kali dengan satu unit percobaan terdiri dari 4 botol kultur yang masing-masing berisi satu eksplan. Subkultur ke media baru dengan perlakuan yang sama dilakukan setiap 6 minggu.

Pengamatan dilakukan setelah kultur berumur 20 minggu setelah eksplan ditanam pada media perlakuan. Variabel yang diamati adalah sebagai berikut.

1. Persentase eksplan yang membentuk kalus/mata tunas.
2. Jumlah propagul. Propagul merupakan jumlah mata tunas dan tunas yang terbentuk pada eksplan.
3. Jumlah mata tunas. Mata tunas adventif adalah struktur meristem yang berukuran $\leq 0,5$ cm.
4. Jumlah tunas adventif eksplan. Tunas adventif adalah tunas yang muncul pada jaringan eksplan yang merupakan bentuk pemanjangan dari mata tunas $> 0,5$ cm.
5. Panjang tunas adventif.

Pada penelitian ini, data akan diolah dengan menggunakan *standar error (SE)*, menurut Walpole, 1997 dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$SE = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i)^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n(n-1)}}$$

3.1.3 Pelaksanaan Percobaan

Pelaksanaan percobaan meliputi persiapan alat dan bahan, pembuatan media kultur, penanaman eksplan dan kondisi kultur.

3.1.3.1 Tahap Persiapan Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan dalam pembuatan media adalah gelas ukur, *beaker glass*, pinset, *magnetic stirrer*, *autoclave*, pipet, pH meter, timbangan analitik, botol kultur, plastik, karet gelang, kertas label, kamera, dan alat tulis. Bahan-bahan yang digunakan adalah garam-garam mineral dan bahan kimia komponen media MS (Tabel lampiran 13), aquades, BA, NAA, KOH 1 N atau HCl 1 N, Bayclin (5,25 NaOCl), detergen, air steril, spritus, Tween 20, agar-agar merk Swallow Globe, dan sukrosa.

Sedangkan alat yang akan digunakan dalam penanaman adalah pinset, *scapel*, *laminar air flow cabinet* (LAFC), lampu Bunsen, *hand sprayer*, dan petridis.

Sebelum digunakan untuk penanaman. pinset, *scapel*, kapas, dan petridis disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1,2 kg/cm² selama 30 menit.

3.1.3.2 Pembuatan Media Kultur

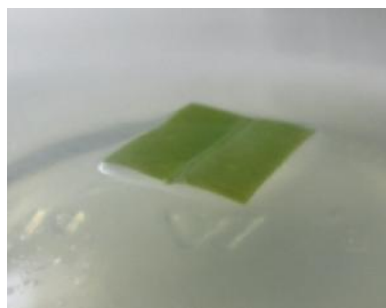
Media kultur yang digunakan adalah media Murashige dan Skoog (1962), yang diperkaya dengan vitamin (thiamin-HCl 0,1 mg/l, piridoksin-HCl 0,5 mg/l, asam nikotinat 0,5 mg/l, dan glisin 2 mg/l), mio inositol 100 mg/l, sukrosa 30 g/l, asam askorbat 150 mg/l, asam sitrat 50 mg/l. Selanjutnya pH-media diatur menjadi 5,8. Jika pH kurang dari 5,8 maka diberi penambahan KOH 1 N sedangkan jika pH lebih dari 5,8 maka diberi HCl 1 N. Setelah pH menjadi 5,8 ditambahkan 8 g/l bubuk agar-agar kemudian media dimasak hingga mendidih lalu media dituangkan ke dalam botol-botol kultur sebanyak 30 ml per botol. Botol berisi media ditutup dengan plastik bening kemudian diikat dengan karet dan

disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,2 kg/cm² selama 7 menit.

3.1.3.3 Penanaman eksplan dan Kondisi Ruang Kultur

Eksplan yang digunakan adalah potongan daun muda berwarna hijau kemerahan yang berasal dari tanaman melinjo dewasa yang sudah berbuah. Daun dibersihkan menggunakan detergen kemudian ditiriskan. Eksplan kemudian disterilisasi di dalam *laminar air flow cabinet* dengan cara dimasukkan ke dalam larutan pemutih Bayclin 20% dan ditambah dengan 2 tetes larutan Tween 80 kemudian dikocok menggunakan shaker selama 15 menit, kemudian dibilas menggunakan air steril sebanyak 3 kali. Eksplan kemudian disterilkan kembali dengan cara yang sama menggunakan Bayclin 10% selama 10 menit kemudian dibilas menggunakan air steril sebanyak 3 kali. Eksplan lalu dipotong dengan ukuran 1 cm x 1 cm.

Penanaman eksplan steril dan subkultur dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* (LAFC) dengan kondisi aseptik. Eksplan disubkultur ke media perlakuan yang baru setiap enam minggu. Kultur diinkubasikan dalam ruang kultur pada suhu 26 °C ± 2 °C dengan pencahayaan dari lampu fluoeresens (TL) berintensitas 1.000—2.000 lux.



Gambar 2. Eksplan melinjo dalam media tanam

3.2 Percobaan II. Organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) *in vitro* dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan kinetin.

3.2.1 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah bahan yang sama dengan percobaan 1.

3.2.2 Disain Percobaan, Pengamatan dan Analisis Data

Percobaan ini dilaksanakan menggunakan rancangan teracak lengkap dengan perlakuan yang disusun secara faktorial (3x2). Faktor pertama adalah berbagai konsentrasi benziladenin (BA) yaitu 2, 4, dan 6 mg/l. Faktor kedua adalah tanpa kinetin dan dengan penambahan 1 mg/l kinetin. Sebelum eksplan ditanam dalam media perlakuan, eksplan ditanam dalam media prakondisi MS 0 (tanpa penambahan zat pengatur tumbuh) selama 10 hari, kemudian eksplan dipindah ke media perlakuan. Perlakuan yang digunakan adalah sebagaimana disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Konsentrasi benziladenin (BA) dan kinetin yang digunakan pada percobaan.

Perlakuan (mg/l)	
BA	Kinetin
2	0
4	0
6	0
2	1
4	1
6	1

Setiap perlakuan diulang tiga kali dengan satu unit percobaan terdiri dari 4 botol kultur yang masing-masing berisi satu eksplan. Subkultur ke media baru dengan perlakuan yang sama dilakukan setiap 4 minggu.

Pengamatan dilakukan setelah kultur berumur 12 minggu setelah eksplan ditanam pada media perlakuan. Variabel yang diamati adalah sebagai berikut.

1. Persentase eksplan yang membentuk kalus/mata tunas.
2. Jumlah propagul. Propagul merupakan jumlah mata tunas dan tunas yang terbentuk pada eksplan.
3. Jumlah mata tunas. Mata tunas adventif adalah struktur meristem yang berukuran $\leq 0,5$ cm.
4. Jumlah tunas adventif eksplan. Tunas adventif adalah tunas yang muncul pada jaringan eksplan yang merupakan bentuk pemanjangan dari mata tunas $> 0,5$ cm.
5. Panjang tunas adventif.

Pada penelitian ini, data akan diolah dengan menggunakan *standar error (SE)*, menurut Walpole, 1997 dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$SE = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i)^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n(n-1)}}$$

3.2.3 Pelaksanaan Percobaan

Pelaksanaan percobaan meliputi persiapan alat dan bahan, pembuatan media kultur, penanaman eksplan dan kondisi kultur,

3.2.3.1 Tahap Persiapan Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan dalam pembuatan media adalah gelas ukur, *beaker glass*, pinset, *magnetic stirrer*, *autoclave*, pipet, pH meter, timbangan analitik,

botol kultur, plastik, karet gelang, kertas label, kamera, dan alat tulis. Bahan-bahan yang digunakan adalah garam-garam mineral dan bahan kimia komponen media MS (Tabel Lampiran 1), aquades, TDZ, KOH 1 N atau HCl 1 N, Bayclin (5,25 NaOCl), detergen, air steril, spritus, Tween 20, agar-agar merk Swallow Globe, dan sukrosa.

Sedangkan alat yang akan digunakan dalam penanaman adalah pinset, *scapel*, *laminar air flow cabinet* (LAFC), lampu Bunsen, *hand sprayer*, dan petridis.

Sebelum digunakan untuk penanaman. pinset, *scapel*, kapas, dan petridis disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1,2 kg/cm² selama 30 menit.

3.1.3.2 Pembuatan Media Kultur

Media kultur yang digunakan adalah media Murashige dan Skoog (1962), yang diperkaya dengan vitamin (thiamin-HCl 0,1 mg/l, piridoksin-HCl 0,5 mg/l, asam nikotinat 0,5 mg/l, dan glisin 2 mg/l), mio inositol 100 mg/l, sukrosa 30 g/l, asam askorbat 150 mg/l, asam sitrat 50 mg/l. Selanjutnya pH-media diatur menjadi 5,8. Jika pH kurang dari 5,8 maka diberi penambahan KOH 1 N sedangkan jika pH lebih dari 5,8 maka diberi HCl 1 N. Setelah pH menjadi 5,8 ditambahkan 8 g/l bubuk agar-agar kemudian media dimasak hingga mendidih lalu media dituangkan ke dalam botol-botol kultur sebanyak 30 ml per botol. Botol berisi media ditutup dengan plastik bening kemudian diikat dengan karet dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,2 kg/cm² selama 7 menit.

3.2.3.3 Penanaman eksplan dan Kondisi Ruang Kultur

Eksplan yang digunakan adalah potongan daun muda berwarna hijau kemerahan yang berasal dari tanaman melinjo dewasa yang sudah berbuah. Daun dibersihkan menggunakan detergen kemudian ditiriskan. Eksplan kemudian disterilisasi di dalam *laminar air flow cabinet* dengan cara dimasukkan ke dalam larutan pemutih Bayclin 20% dan ditambah dengan 2 tetes larutan Tween 80 kemudian dikocok menggunakan shaker selama 15 menit, kemudian dibilas menggunakan air steril sebanyak 3 kali. Eksplan kemudian disterilkan kembali dengan cara yang sama menggunakan Bayclin 10% selama 10 menit kemudian dibilas menggunakan air steril sebanyak 3 kali. Eksplan lalu dipotong dengan ukuran 1 cm x 1 cm.

Penanaman eksplan steril dan subkultur dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* (LAFC) dengan kondisi aseptik. Eksplan disubkultur ke media perlakuan yang baru setiap enam minggu. Kultur diinkubasikan dalam ruang kultur pada suhu $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ dengan pencahayaan dari lampu fluoeresens (TL) berintensitas 1.000—2.000 lux.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

Percobaan I. Organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) *in vitro* dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan asam naftalenasetat (NAA).

1. Penambahan BA ke dalam media MS esensial untuk terjadinya respon organogenesis. Tanpa BA, baik tanpa NAA maupun dengan penambahan 0,05 mg/l NAA, eksplan tidak menunjukkan respon organogenesis maupun pembentukan kalus.
2. Pembentukan propagul dalam bentuk mata tunas dan/atau tunas adventif dalam percobaan ini terjadi baik secara tidak langsung didahului terbentuknya kalus, maupun secara langsung muncul dari permukaan eksplan.
3. Pembentukan propagul didapatkan pada media dengan konsentrasi BA mulai 1 mg/l, 1,5 mg/l dan 2 mg/l. Peningkatan konsentrasi BA dari 0,5 mg/l menjadi 2 mg/l meningkatkan jumlah propagul dari 2,0 menjadi 5,2 buah.
4. Penambahan 0,05 mg/l NAA ke dalam media MS yang mengandung 1,5 mg/l BA dan 2 mg/l BA menghasilkan jumlah propagul yang lebih banyak dibandingkan dengan pada media BA tanpa NAA.

5. Pada perlakuan BA saja tanpa NAA, peningkatan konsentrasi BA dari 1 mg/l menjadi 2 mg/l, menyebabkan peningkatan persentase eksplan yang membentuk propagul secara langsung, sedangkan jika media ditambah dengan 0,05 mg/l NAA, peningkatan konsentrasi BA menyebabkan peningkatan persentase eksplan yang membentuk kalus sebelum terbentuk propagul.

Percobaan II. Organogenesis melinjo (*Gnetum gnemon* L.) *in vitro* dari eksplan daun sebagai respon terhadap benziladenin (BA) dan kinetin

1. Pemberian 2 mg/l BA ke dalam media MS tanpa penambahan kinetin menghasilkan 7,8 propagul per eksplan.
2. Peningkatan konsentrasi BA dari 2 mg/l menjadi 4 mg/l menyebabkan peningkatan jumlah propagul dari 7,8 menjadi 10,6 propagul per eksplan, namun peningkatan konsentrasi BA menjadi 6 mg/l menghasilkan jumlah propagul per eksplan sebanyak 8,2.
3. Pemberian 1 mg/l kinetin bersamaan dengan BA dalam media MS menyebabkan peningkatan persentase eksplan yang membentuk kalus lebih tinggi. Di samping itu, jika dikombinasikan dengan 1 mg/l kinetin, peningkatan konsentrasi BA dari 2, menjadi 4 dan 6 mg/l menghasilkan jumlah propagule per eksplan yang cenderung menurun.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk memanjangkan tunas sehingga siap diakarkan secara *in vitro* untuk selanjutnya planlet dapat diaklimatisasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardian, Kresna dan Agustiansyah. 2011. Pengaruh berbagai konsentrasi benziladenin dan asam naftalen asetat pada kultur *in vitro* singkong (*Manihot esculenta* Crantz.). *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. 12(1):43—49.
- Armini, A. N. M., Wattimena dan L.W. Gunawan. 1991. *Perbanyakan Tanaman Bioteknologi Tanaman Laboratorium Kultur Jaringan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Astuti, B. 1998. Pengaruh Ukuran Botol Kultur dan Periode Subkultur terhadap Multiplikasi Tunas Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) *In vitro* dari Eksplan Potongan Daun. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung. 35 p.
- Deny. 1997. Pengaruh Taraf Konsentrasi Thidiazuron terhadap Pembentukan Tunas Adventif Tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dari Eksplan Potongan Daun Secara *In vitro*. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung. 29 p.
- George, R.F and Sherrington, P.D. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited, Edington, UK. pp. 709.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T. Davies, Jr, R.L. Geneve. 2011. *Plant Propagation: Principles and Practices*. 776ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Hasyim dan S. Sulastri. 2009. Model kawasan agroforestry melinjo di wilayah Kabupaten Malang. *Agritek*. 17(3):592—607.
- Hapsoro, D. dan Yusnita. 2015. *Kultur Jaringan Untuk Perbanyakan Klonal Kelapa Sawit (Elaeis quinensis* Jacq.). Universitas Lampung. Bandar Lampung. 121 p.
- Lestari, E. G. 2011. Peranan zat pengatur tumbuh dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal Agro Biogen*. 7(1):63—68.

- Liberman, R., L. Shahar, A. N. Levi, D. Evenor, M. Reuveni, dan M. O. Shamir. 2010. Shoot regeneration from leaf explants of *Brunfelsia calycina*. *Journal Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 100:345—348.
- Mahadi, I., S. Wulandari, D. Trisnawati. 2013. Pengaruh pemberian NAA dan Kinetin terhadap pertumbuhan eksplan buah naga (*Hylocereus costaricensis*) melalui teknik kultur jaringan secara *in vitro*. *Jurnal Biogenesis*. 9(2):14—20.
- Moyo, M., J. F. Finnie, dan J. V. Staden. 2009. *In vitro* morphogenesis of organic nodules derived from *Sclerocarya birrea* subsp. *caffra* leaf explants. *Journal Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 98:273—280.
- Nisak, K., T. Nurhidayati, dan K. I. Purwani. 2012. Pengaruh kombinasi konsentrasi ZPT NAA dan BAP pada kultur jaringan tembakau *Nicotiana tabacum* var. Prancak 95. *Sains dan Seni Pomits*, 1(1):1—6.
- Ravindran, C. P., M. Manokari., M.S. Shekhawat. 2016. *In vitro* propagation through ex vitro rooting of a medicinal spice *Piper longum* Linn. *WSN*. 37 (2016):12—24.
- Rani, S. and J. S. Rana. 2010. *In vitro* propagation of *Tylophora indica*-influence of explanting season, growth regulator synergy, culture passage and planting substrate. *Journal of American Science*. 6(12):385 —392.
- Rusyadi, Y., N. Sunarlim, I. Mariska, dan Murtado. 2002. *Multiplikasi Tunas Tanaman Melinjo Melalui Kultur In vitro*. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman. 215—221.
- Saronto. 1996. Pengaruh Komposisi Media Dasar dan Konsentrasi Benziladenin terhadap Pembentukan Tunas Adventif Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) secara *In vitro* dari Eksplan Potongan Daun. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung. 47 p.
- Suparaini, Maizar, dan Fathurrahman. 2013. Penggunaan BAP dan NAA terhadap pertumbuhan eksplan buah naga (*Hylocereus costaricensis*) secara *in vitro*. *Jurnal Dinamika Pertanian*. XXVIII (2) : 83—90.
- Tampubolon, W. 2013. Informasi singkat benih *Gnetum gnemon* Linn. *Buletin*. BPTH Sulawesi. 2 p.
- Taiz, L., E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*. 5th edition. Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, USA. 782p.
- Unda, F., P. Kalynyak, dan A. Riseman. 2007. Organogenesis plant regeneration from leaf explants of *exacum styer* group. *Journal Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 89 : 105—111.

- Walpole, R. E. 1997. *Pengantar Statistika, Edisi 3*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Yuliarti, N. 2010. *Kultur Jaringan Tanaman : Skala Rumah Tangga*. Lily Publisher. 67 p.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan : Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Agromedia Pustaka. Jakarta. 105 p.
- Yunita, R. 2004. Multiplikasi tunas melinjo (*Gnetum gnemon*) secara *in vitro*. *Jurnal Sagu*. 3(1):1—8.
- Yusnita. 2015. *Kultur Jaringan Tanaman : Sebagai Teknik Penting Bioteknologi Untuk Menunjang Pembangunan Pertanian*. Universitas Lampung. Bandar Lampung. 69 p.