

PENGARUH THIDIAZURON DAN NAA TERHADAP MULTIPLIKASI TUNAS BIJI TANAMAN SARANG SEMUT (*Myrmecodia pendans*) SECARA *IN VITRO*

Oleh :

Supriyadi, I, A, Rineksane dan B, H, Isnawan
Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian UMY

ABSTRACT

A research was conducted to determine the effect of Thidiazuron and Naphtalene Acetic Acid on the induction of ant plant shoots. The research was carried out at In Vitro Laboratory, Faculty of Agriculture, University Muhammadiyah Yogyakarta. The experiment was single factor wich arranged in Completely Randomized Design (CRD). The treatments consisted of 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA(T1), 0.5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA(T2), 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA(T3), 0 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA(T4), 0.5 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA(T5), 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/l NAA(T6). Each treatment has 5 replications. The data were analyzed by using The Analysis of Variance and followed by The Duncan Multiple Range Test (DMRT) at α 5%

The result showed that the treatment 1 mg/l TDZ + 0.1 mg/L NAA was the best treatment as shown by parameters the percentage of life (100%), the percentage of shoot(100%) and the number of shoot (2 shoots)

Keyword : Thidiazuron, NAA and ant plants

PENDAHULUAN

Tanaman sarang semut merupakan tanaman epifit yang tumbuh menempel di pohon inangnya, batangnya menggelembung dan di dalamnya banyak terdapat ruang atau rongga kecil yang dihuni semut. Sarang semut mengandung senyawa-senyawa kimia dari golongan flavonoid dan tannin yang diketahui mampu menyembuhkan berbagai macam penyakit, seperti virus HIV, herpes, diare, inflamasi dan kangker(Simanjuntak *et al*, 2010). Perbanyakan sarang semut yaitu secara generatif menggunakan biji, namun perbanyakan menggunakan biji mengalami kendala yaitu ketika buah sarang semut jatuh, semut jenis *Iridomyrmex cordatus* akan membawa biji dari buah sarang semut ke dalam rongga-rongga sarang semut untuk dimakan (Huxley, 1997) sehingga hanya biji yang selamat yang bisa tumbuh.

Perbanyakan tanaman secara *in vitro* merupakan alternatif yang tepat karena kultur *in vitro* merupakan penanaman bagian kecil dari tanaman dalam media buatan dan lingkungan terkendali sehingga menjadi tanaman utuh. Teknik *in vitro* digunakan untuk mengkonservasi tanaman sarang semut dalam rangka memenuhi kebutuhan bahan baku tanaman obat sarang semut tanpa mengancam kelestariannya di alam. Perbanyakan *in vitro* menghasilkan tanaman sarang semut dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu singkat

Pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara *in vitro* dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi dari zat pengatur tumbuh (ZPT) yang ada di dalam tanaman (Untung dan Fatimah, 2001). ZPT yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* adalah dari golongan auksin dan sitokinin. Pada penelitian Yunita (2004) mengenai pemberian thidiazuron sebanyak 0,3 ppm pada medium MS menghasilkan multiplikasi tunas melinjo yang lebih besar, baik multiplikasi tunas pada eksplan yang berasal dari lapang maupun eksplan *in vitro*. Raharjo (2004) mengungkapkan perlakuan NAA 1 mg/l pada tanaman *Azadirachta* (Jack) M. Jacobs menghasilkan rata-rata jumlah akar dan panjang akar terbesar masing-masing 2,3 akar dan 12,78 mm.

Hasil penelitian kultur *in vitro* tentang sarang semut, menunjukkan eksplan terbaik yang dapat digunakan adalah daun. Akar berhasil ditumbuhkan dari eksplan daun yang ditumbuhkan pada medium VW. Namun demikian, tunas dan planlet sarang semut belum diperoleh (Sukarjan *et al.*, 2011). Oleh karena itu penggunaan zat pengatur tumbuh sitokinin Thidiazuron dan auksin NAA akan diuji untuk menginduksi multiplikasi tunas biji sarang semut dengan menggunakan medium Vacin and Went (VW).

Kultur *in vitro* merupakan alternatif perbanyakan untuk mendapatkan multiplikasi tunas tanaman sarang semut, perbanyakan ini dibutuhkan adanya zat pengatur tumbuh. Penggunaan modifikasi zat pengatur tumbuh yang dapat menjadi faktor penentu keberhasilan kultur *in vitro*. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dikaji pengaruh penggunaan konsentrasi thidiazuron dan NAA untuk induksi tunas secara *in vitro*. Adapun permasalahan yang ingin dikaji dari penelitian ini adalah konsentrasi thidiazuron dan NAA yang tepat untuk menginduksi tunas sarang semut secara *in vitro*. Maka tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kombinasi konsentrasi Thidiazuron dan NAA yang tepat untuk induksi tunas sarang semut

TATA CARA PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan mulai pada bulan Juni sampai dengan September 2013. Tempat percobaan adalah di Laboratorium Kultur *in vitro* Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan biji sarang semut (*Myrmecodia pendans*). Media yang digunakan adalah VW padat ditambah dengan sitokinin (TDZ) dan auksin (NAA). Pengaturan pH media dengan menambahkan KOH atau HCl 0.1 N. Bahan untuk sterilisasi berupa alkohol 70%, clorox, betadin, bakterisida (agrept), dan fungisida (Banlate). Bahan lainnya seperti agar, gula, karet gelang, plastik, kertas buram, *tissue* dan label.

Alat yang digunakan adalah sebagai berikut: *Hot Plate Magnetic Stirrer*, timbangan analitik, pH stik, timer, *dissecting kits*, autoklaf, petridish, botol kultur, gelas ukur, pipet tetes, pinset, *Laminar Air Flow (LAF)*, lampu Bunsen dan *milipore*

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode percobaan Laboratorium. Penelitian disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor. Perlakuan yang digunakan adalah kombinasi konsentrasi TDZ dan NAA yang terdiri 6 perlakuan yaitu : 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA(T1), 0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l

NAA(T2), 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA(T3), 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA(T4), 0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA(T5), 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA(T6). Penelitian ini meliputi beberapa tahapan kegiatan yaitu : Sterilisasi (alat dan eksplan) pembuatan medium, inokulasi, inkubasi pengamatan dan analisis data.

Beberapa parameter akan diamati dalam penelitian ini. Parameter tersebut adalah : Saat Eksplan Terkontaminasi, Saat muncul tunas, Saat Eksplan Browning, Persentase Eksplan Hidup (%), Persentase Eksplan Browning (%), Persentase Eksplan kontaminasi (%), Persentase Eksplan Bertunas (%), Persentase Eksplan, Tinggi Tunas, Jumlah Tunas Tiap Perlakuan, Jumlah Daun Pertunas, Warna Tunas, Jumlah Akar

Data hasil pengamatan perbanyak tunas sarang semut secara in vitro kemudian diolah dan dianalisis dengan uji *analysis of variance* pada taraf kesalahan 5% dan apabila berbeda nyata dilanjutkan uji lanjut dengan Uji Jarak Ganda Duncan (UJGD) pada taraf kesalahan 5%. Hasil olah data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan software SAS 6.1.2

HASIL ANALISIS DAN PEMBAHASAN

Secara umum eksplan biji sarang semut pada semua perlakuan mulai menunjukkan respon pertumbuhan pada 1 MST, ditandai dengan kemunculan hipokotil terlebih dahulu, setelah biji berkecambah multiplikasi terjadi setelah 16 MST pada perlakuan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA. Menurut Tjitrosoepomo (1985) dalam Anonim (2011) biji akan berkecambah atau bertunas jika syarat-syarat yang diperlukan terpenuhi yaitu : air, udara dan cahaya. Serangkaian proses perubahan morfologi dan biokimia yang terjadi selama perkecambahan benih ialah : imbibisi, pengaktifan enzim dan hormon untuk proses perombakan cadangan makanan, pertumbuhan awal embrio, pecahnya kulit benih dan munculnya akar serta pertumbuhan kecambah

Laju pertumbuhan sarang semut dapat diketahui dari persentase eksplan hidup, persentase eksplan bertunas dan persentase eksplan berakar, pengaruh perlakuan dapat diketahui dari parameter tinggi tunas, jumlah daun, jumlah akar dan jumlah tunas. Persentase eksplan hidup, persentase kontaminasi dan browning disajikan pada tabel 1.

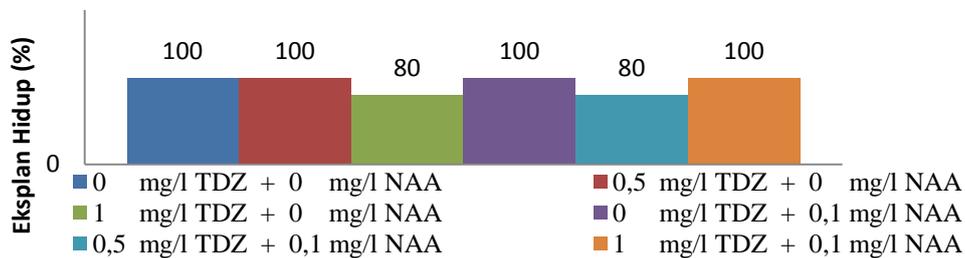
Tabel 1. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Persentase Eksplan Hidup (%), Persentase Kontaminasi (%) dan *Browning* (%) Sarang Semut pada 16 MST

Perlakuan	Persentase Eksplan(%)	
	Hidup	Terkontaminasi dan <i>Browning</i>
0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	100a	0
0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	100a	0
1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	80a	0
0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	100a	0
0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	80a	0
1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	100a	0

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata menurut sidik ragam pada taraf α 5 %

Persentase eksplan hidup ialah sejumlah eksplan yang tidak mengalami kontaminasi mikroorganisme atau jika mampu mengeluarkan unsur-unsur dari lembaga berupa akar atau tunas, yang dinyatakan dalam persen. Persentase eksplan hidup menggambarkan kondisi hidup eksplan yang diperlakukan dalam lingkungan percobaan. Faktor eksplan hidup dipengaruhi oleh kontaminasi dan *browning*, semakin tinggi

tingkat kontaminasi dan *browning* maka semakin rendah eksplan hidup. Hasil persentase eksplan hidup disajikan pada gambar 3 dan tabel 1



Gambar 1. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Persentase Eksplan Hidup (%) Sarang Semut pada 16 MST

Berdasarkan gambar 1 diketahui bahwa perlakuan 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA, 0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA, 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA dan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA memberikan persentase eksplan hidup 100 %, dan perlakuan 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dan 0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA dengan persentase hidup 80 %. Tingginya persentase eksplan hidup pada gambar 1 menandakan tidak adanya kontaminasi dan *browning* eksplan pada setiap perlakuan. Kontaminasi tidak terjadi karena sterilisasi eksplan yang dilakukan telah menghilangkan mikroorganisme penyebab kontaminasi. Rinaldi (2011) menjelaskan bahwa teknik aseptik/sterilisasi merupakan kunci keberhasilan dalam kultur *in vitro*. Dari semua bahan kontaminasi yang paling sulit diatasi adalah berasal dari eksplan.

Selain sterilisasi eksplan tingginya persentase hidup diduga juga pengaruh sumber eksplan. Biji dari buah sarang semut dikeluarkan segera sebelum disterilisasi sehingga kondisi eksplan biji masih steril karena sumber mikroorganisme belum bersentuhan dengan biji sarang semut. Hal ini berdampak pada tingginya persentase eksplan yang hidup (Gambar 3). Persentase eksplan hidup pada perlakuan 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dan 0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA lebih rendah dibanding lainnya yaitu 80%, tidak disebabkan oleh kontaminasi mikroorganisme tetapi karena viabilitas atau daya tumbuh benih dari biji tersebut rendah. Eksplan biji tersebut diduga tidak memenuhi kriteria benih yang baik. Sarjiyah (2013) menyatakan kriteria benih yang baik antara lain tidak terinfeksi penyakit, warna tidak kusam (bernas), bentuk dan ukuran normal, endosperm berisi penuh atau padat dan jaringan embrio tidak luka. Pengujian daya tumbuh tidak dilakukan karena terbatasnya sumber eksplan dari habitatnya serta kompetisi mendapatkan biji sarang semut dengan *Iridomyrmex cordatus* (Huxley, 1977) dan burung cabai merah atau *Dicaeum cruentatum* (Siyang, 2012)

Eksplan dalam penelitian ini tidak terjadi kontaminasi pada semua perlakuan (Tabel 1). Kontaminasi tidak terjadi karena metode sterilisasi eksplan yang digunakan sudah sesuai, sumber eksplan yang masih steril, media yang diberi larutan *plant preservative medium* (PPM) sehingga sumber kontaminan tidak bersumber pada media. Metode sterilisasi eksplan meliputi pencucian kontaminan dengan menggunakan deterjen, benlate, sunclin dan betadin. Larutan deterjen dengan konsentrasi 2 g/l berfungsi untuk menghilangkan kotoran, serta sebagai surfaktan. Larutan agrept dengan konsentrasi 2 g/l dicampur dengan larutan benlate dengan konsentrasi 2 g/l digunakan untuk mengendalikan bakteri dan fungi sumber kontaminan. Bahan aktif streptomisin sulfat pada agrept sering digunakan untuk mengendalikan bakteri selanjutnya larutan

benlate merupakan fungisida sistemik golongan benzimidazol karbamat yang mampu mempengaruhi pembelahan inti pada jamur (Cholif, 2007).

Larutan NaClO atau sunclin 5,25 % dengan unsur Cl⁻ yang berpengaruh pada aktivitas mikroba. Ion Cl⁻ dapat menyebabkan peluruhan dinding sel mikrobia sehingga protoplasma sel terurai selanjutnya sel mikrobia akan mengalami kematian. Betadin dengan bahan aktif Iod berfungsi untuk mencegah terjadinya infeksi pada eksplan. Hal lain yang menyebabkan tidak terjadinya kontaminasi diduga karena pemilihan bahan tanaman yang sehat, ruang kultur yang tetap steril, penutupan botol kultur yang baik dan pelaksanaan prosedur kerja yang tepat dan hati-hati (Cholif, 2007). Berdasarkan hasil penelitian bahwa kontaminasi tidak terjadi pada semua perlakuan, sehingga saat kontaminasi tidak bisa diukur dengan waktu. Berarti ini menggambarkan bahwa metode sterilisasi untuk biji sarang semut berhasil.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa eksplan tidak mengalami *browning* pada semua perlakuan (Tabel 1). Hal ini diduga karena tidak adanya senyawa fenol pada biji sarang semut, biji merupakan jaringan muda, kondisi biji tidak dilukai sehingga tingkat pencoklatan pada biji 0%. Pencoklatan sangat umum terjadi pada spesies tanaman berkayu, terutama bila eksplan diambil dari pohon dewasa. Penghambatan pertumbuhan biasanya sangat kuat pada beberapa spesies yang umumnya mengandung senyawa tanin atau hidrosifenol dengan konsentrasi tinggi. Pencoklatan pada jaringan muda lebih sedikit dibandingkan dengan jaringan yang tua (George dan Sherrington, 1984)

Berdasarkan hasil rerata variabel saat eksplan bertunas terjadi antara 12,2 – 20,8 hari (Tabel 2). Saat bertunas tidak berbeda nyata antar perlakuan karena eksplan berupa biji, sehingga media apapun masih dapat menginduksi terbentuknya tunas dari plumula atau calon tunas dalam biji. Thidiazuron dan NAA yang ditambahkan dalam media VW tidak mempercepat saat tumbuhnya tunas.

Tabel 2. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Rerata Saat Bertunas dan Persentase Bertunas (%) Sarang Semut pada 16 MST

Perlakuan	Saat Bertunas (hari)	Persentase Bertunas (%)
0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	14,8a	100a
0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	16,6a	100a
1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	12,2a	80a
0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	19,6a	100a
0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	14,6a	80a
1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	20,8a	100a

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata menurut sidik ragam pada taraf α 5%

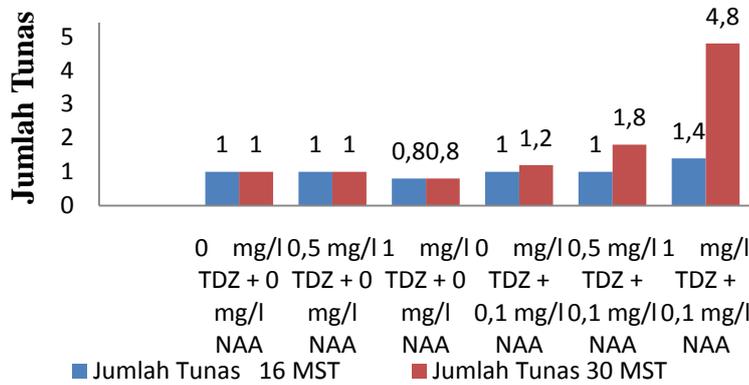
Berdasarkan tabel 2 diketahui bahwa semua perlakuan tidak berbeda nyata terhadap persentase eksplan bertunas. Pada penelitian ini eksplan biji sarang semut telah memiliki plumula atau calon tunas dan radikula atau calon akar, sehingga ada atau tidak adanya zat pengatur tumbuh dalam media tidak mempengaruhi persentase eksplan bertunas. Persentase bertunas disebabkan bukan karena tidak berpengaruhnya zat pengatur tumbuh melainkan tidak adanya daya tumbuh pada benih atau tidak memiliki viabilitas. Pada perlakuan dengan persentase bertunas 100 % tidak ada perbedaan antara yang diberikan perlakuan VW+TDZ dan NAA dengan VW0. Intan (2008) menjelaskan secara alami tanaman memiliki hormon endogen atau fitohormon, yang aktif dalam jumlah kecil (< 1mM) yang disintesis pada bagian tertentu, pada umumnya

ditranslokasikan ke bagian lain tanaman dimana senyawa tersebut menghasilkan suatu tanggapan secara biokimia, fisiologis dan morfologis.

Tabel 3. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Rerata Jumlah Tunas Tanaman Sarang Semut pada 16 dan 30 MST

Perlakuan	Jumlah Tunas	Jumlah Tunas
	16 MST	30 MST
0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	1a	1a
0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	1a	1a
1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	0,8a	0,8a
0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	1a	1,2a
0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	1a	1,8a
1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	1,4a	4,8a

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata menurut sidik ragam pada taraf α 5 %
Data pada tabel 3 menunjukkan tidak ada beda nyata terhadap jumlah tunas.

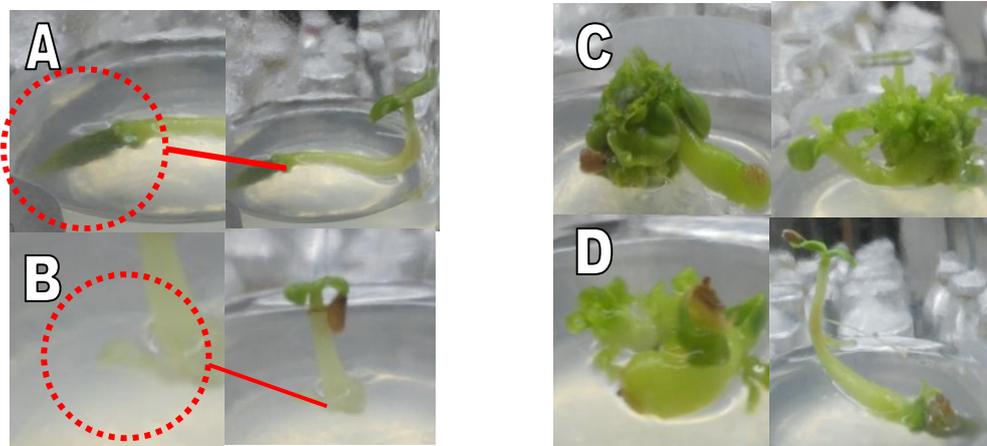


Gambar 2. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Jumlah Tunas Sarang Semut pada 16 dan 30MST

Data pada Gambar 3. menunjukkan Pada perlakuan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA memberikan nilai terbaik untuk pemunculan tunas yaitu sebesar 1,4 tunas adventif. Sementara perlakuan 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA memberikan nilai terendah dengan jumlah tunas 0,8 pada 16 MST. Wattimena (1992) menjelaskan pembentukan tunas adventif terjadi karena pemberian sitokinin dengan konsentrasi tinggi tanpa auksin atau auksin dalam konsentrasi yang rendah sekali. Pada perlakuan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA dapat memultiplikasi tunas adventif, namun jumlah tunas yang muncul hanya sedikit diduga hal ini disebabkan ketidakseragaman respon dari setiap eksplan sehingga data rata-rata yang dihasilkan belum menunjukkan yang sebenarnya. Multiplikasi tunas sarang semut diamati sampai minggu ke-30, hasilnya dapat dilihat pada gambar 5 dan tabel 3.

Pada tabel 3 pengaruh kombinasi zat pengatur tumbuh TDZ dan NAA pada 30 MST yaitu jumlah tunas adventif meningkat (gambar 6C dan tabel 3) sebesar 4,8 tunas namun belum menunjukkan ada beda nyata Hal ini sesuai dengan pernyataan Wattimena (1992) bahwa pembentukan tunas adventif terjadi karena pemberian sitokinin dengan konsentrasi tinggi tanpa auksin atau auksin dalam konsentrasi yang rendah sekali, ditegaskan (Flick *et al.*, 1993) dalam Endang (2011) bahwa kombinasi antara sitokinin dengan auksin dapat memacu morfogenesis dalam pembentukan tunas.

Penggunaan thidiazuron (TDZ) memiliki kemampuan multiplikasi tunas. Lu (1993) menyatakan bahwa thidiazuron dapat menginduksi pembentukan tunas adventif dan proliferasi tunas aksilar.



Gambar 3. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Multiplikasi tunas pada perlakuan (A) 0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA dan (B) 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA pada 16 MST dan (C) 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA dan (D) 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA pada 30 MST

Pertumbuhan eksplan ditandai dengan kenaikan volume yang bersifat irreversible (tidak dapat berbalik) seperti memanjangnya batang, akar dan sebagainya. Proses pertumbuhan melibatkan aktivitas pembelahan sel, pembesaran sel dan pemanjangan sel yang didapat dari sejumlah hormon. Variabel tinggi eksplan digunakan untuk menggambarkan seberapa besar pengaruh perlakuan TDZ dan NAA terhadap tinggi eksplan. Pengamatan terhadap tinggi tunas ini dilakukan pada minggu ke-16 dan minggu ke-30. Tinggi diukur mulai dari pangkal tunas sampai titik tumbuh.

Tabel 4. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Rerata, Tinggi Tunas Tanaman Sarang Semut pada 16 dan 30 MST

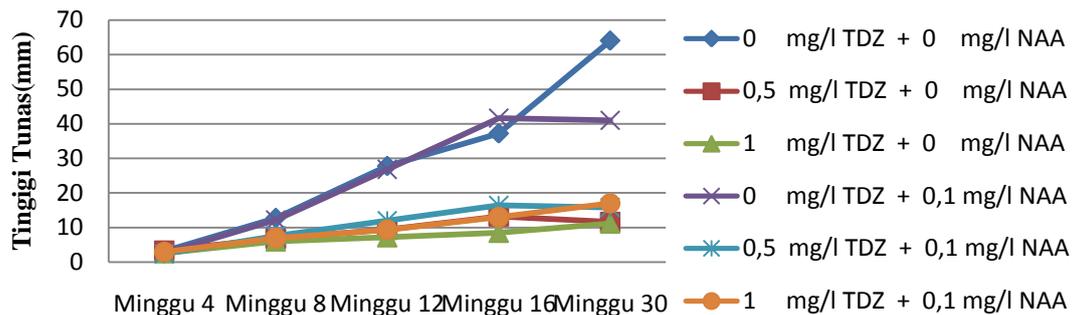
Perlakuan	Tinggi	Tinggi
	Tunas	Tunas
	16 MST	30 MST
0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	37,2a	64a
0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	13,2b	11,6c
1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	8,4b	9,6c
0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	41,6a	44,4b
0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	16,4b	15,8c
1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	13b	16,4c

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata menurut UJGD pada taraf α 5 %

Berdasarkan tabel 4 hasil tinggi tunas pada minggu ke-16 yang diujicobakan terdapat beda nyata. Rerata tinggi tunas sebesar 41,6 mm terdapat pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan VW0 dengan tinggi tunas 37,2 mm. Sementara diantara rerata terendah sebesar 8,4 mm pada perlakuan 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan 0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA, 0,5 mg/l TDZ + 0,1 dan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA mg/l

NAA karena peran auksin menurut Intan (2008) mempengaruhi pertambahan panjang batang dan pertumbuhan.

Perlakuan 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA tidak berbeda nyata, disebabkan sarang semut memiliki hormon endogen yang secara alami memicu pertumbuhannya. Pada perlakuan 0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dan 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dengan rerata terendah, diduga pemberian hormon eksogen yang diberikan yaitu thidiazuron tanpa kombinasi memacu pembelahan sel untuk pembentukan tunas baru dan bukan untuk pemanjangan sel. Sebagaimana dinyatakan oleh Rinaldi (2011) bahwa sitokinin berperan dalam merangsang pertumbuhan tunas atau multiplikasi.



Gambar 4. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Rerata Tinggi Tunas(mm) Sarang Semut pada Minggu ke- 4, 8, 12, 16 dan 30 setelah tanam

Berdasarkan gambar 7 dapat dilihat bahwa tinggi tunas pada semua perlakuan berada pada rerata tinggi tunas 2,4 – 3,4 mm pada minggu 4. Pada minggu ke-4 ini kondisi berbedanya tinggi diduga karena ketidak seragaman respon dari setiap eksplan. Selisih tinggi yang dihasilkan belum menunjukkan yang sebenarnya, mulai minggu 8 pengaruh dari zat pengatur tumbuh mulai terlihat reaksinya sebagaimana terlihat pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA dengan tunas tertinggi kisaran 12,2 – 12,8 mm, sedangkan perlakuan thidiazuron tunggal dan thidiazuron kombinasi NAA yang terendah kisaran 6 – 7,6 mm.

Tingginya tunas tanpa perlakuan dikarenakan secara alami tanaman memiliki hormon endogen dalam takaran yang kecil sehingga pertumbuhan tunas normal, sedangkan perlakuan NAA tunggal juga menghasilkan tunas tertinggi karena peran auksin ialah untuk pemanjangan sel. Pada perlakuan thidiazuron tunggal dan kombinasi tunas lebih pendek disebabkan peran dari thidiazuron yang berfungsi dalam penggandaan tunas adventif (Lu, 1993) yang memberikan efek rendahnya tinggi tunas. Perbedaan ini terus terjadi di setiap minggu 12, 16 dan 30, sedangkan pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA pada minggu ke 16 – 30 merupakan perlakuan yang menunjukkan tinggi tunas tertinggi. Hal ini disebabkan karena auksin pada NAA berperan dalam memacu pemanjangan dan pembelahan sel di dalam jaringan kambium (Pierik, 1987) dalam (Endang, 2011).

Jumlah daun adalah jumlah keseluruhan daun yang tumbuh pada tiap perlakuan yang diujicobakan. Berdasarkan tabel 5 diketahui bahwa ada beda nyata antara perlakuan yang diujicobakan. Rerata jumlah daun tertinggi 2,2 lembar terdapat pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA namun tidak berbeda dengan perlakuan 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dengan jumlah 2 lembar. Sementara perlakuan 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dengan jumlah daun 0 lembar atau daun belum membentuk merupakan diantara rerata jumlah daun terendah.

Tabel 5. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Rerata Jumlah Daun Tanaman Sarang Semut pada 16 dan 30 MST

Perlakuan	Jumlah Daun	Jumlah Daun
	16 MST	30 MST
0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	2a	4a
0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	0,4bc	0,8a
1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	0c	0,4a
0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	2,2a	4a
0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	1,2bc	2,6a
1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	0,4c	5,4a

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata menurut UJGD pada taraf α 5 %

Rerata jumlah daun terbanyak pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA diduga karena pemberian hormon eksogen auksin dalam kurun waktu yang lama 7 minggu bersimbiosis dengan hormon endogen pada eksplan, sehingga menginisiasi pembentukan akar dan daun, walaupun waktu pembentukan daun lama, pembentukan akar yang banyak dari auksin ini akan memicu laju translokasi unsur hara ke seluruh tanaman yang memicu pertumbuhan daun dan jumlah daun akan meningkat seiring dengan bertambahnya usia eksplan, berbeda dengan perlakuan 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA eksplan tumbuh normal karena hanya didukung hormon endogen.

Kecilnya jumlah daun yang terbentuk pada perlakuan 0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA, 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA, 0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA dan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA diduga karena pemberian thidiazuron yang aktif tidak hanya menghambat pertumbuhan akar juga tapi juga menghambat kulit biji untuk lepas sehingga kemunculan daun terhambat, dari terhambatnya pembentukan akar sehingga proses pengangkutan air dan zat-zat makanan menjadi lama tertransfer ke seluruh tubuh tanaman (Mulyani, 2006), ada salah satu unsur makro dari NH_4 yang memiliki nitrogen (Gao *et al*, 1992), karena menurut Wijaya (2008) dalam Fauzi (2010), fungsi nitrogen pada tanaman adalah mendorong pembentukan organ tanaman yang berkaitan dengan fotosintesis yaitu daun. Ketika daun ini tidak terbentuk maka proses pengolahan zat-zat makanan tidak terjadi, sehingga zat-zat makanan ini belum sesuai dengan kebutuhan tumbuhan dan membuat eksplan terhambat pertumbuhannya. Penambahan waktu untuk jumlah daun pada 30 MST tidak berbeda nyata, walaupun seharusnya semakin banyak jumlah tunas maka banyak pula jumlah daun

Tabel 6. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Warna Tunas pada minggu ke-4 dan 16

Perlakuan	Pengamatan Warna Eksplan	
	Minggu ke- 4	Minggu ke-16
0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	8/6 2,5 GY	8/2 2,5 GY
0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	8/6 2,5 GY	8/4 2,5 GY
1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	8/6 2,5 GY	8/4 2,5 GY
0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	8/6 2,5 GY	8/2 2,5 GY
0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	8/6 2,5 GY	8/4 2,5 GY
1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	8/6 2,5 GY	8/4 2,5 GY

Berdasarkan tabel warna eksplan didapatkan hasil pada pengamatan minggu ke 4 warna eksplan hijau kuning lebih kehijauan 8/6 2,5 GY. Kondisi ini menggambarkan bahwa eksplan pada semua perlakuan dapat tumbuh normal, pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA kondisi perubahan warna dari

minggu ke 4 sampai minggu ke 16 mengalami perubahan warna yaitu hijau kuning muda hampir mendekati putih atau 8/2 2,5 GY. Ini menggambarkan pertumbuhan eksplan terjadi secara normal dimana warna ketika tanaman muda/ berkecambah kondisi warna tanaman berwarna putih, pemberian NAA pada perlakuan tidak memberi pengaruh warna eksplan, diduga karena pemberian NAA yang kecil konsentrasinya, sedangkan pada perlakuan 0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA, 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA, 0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA dan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA perubahan warna hijau kekuningan lebih kekuningan atau 8/4 2,5 GY. Hal ini disebabkan adanya pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh sitokinin sintetik yang kuat dari thidiazuron sehingga mempengaruhi jumlah mRNA yang menyediakan beberapa protein yang mengikat klorofil sehingga perubahan warna sangat perlahan berubah (Cholif, 2007)

Saat berakar adalah waktu yang ditempuh eksplan untuk berakar yang dinyatakan dalam satuan hari. Peranan zat pengatur tumbuh berpengaruh terhadap kecepatan berakar, auksin merupakan zat pengatur tumbuh yang merangsang pembentukan akar

Tabel 7. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Rerata Saat Eksplan Berakar dan Persentase Eksplan Berakar pada 16 MST

Perlakuan	Saat berakar(Hari)	Persentase Berakar(%)	Jumlah Akar
0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	34	100a	8,6b
0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	0	0	0c
1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	0	0	0c
0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	28	100a	26,4a
0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	0	0	0c
1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	103	20b	0,4c

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata menurut UJGD pada taraf α 5 %

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel 7 diketahui bahwa terdapat beda nyata pada variabel saat berakar antara perlakuan yang diujicobakan. Saat berakar paling cepat yaitu pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA pada hari ke 34, sedangkan saat bertunas paling lama yaitu pada perlakuan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA pada hari ke-103

Berdasarkan tabel 6 diketahui bahwa perlakuan yang diujicobakan ada beda nyata terhadap persentase eksplan berakar. Rerata perlakuan dengan persentase eksplan berakar tertinggi yaitu sebesar 100% pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA, sedangkan persentase eksplan berakar terendah pada perlakuan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA sebesar 20 %

Banyaknya akar yang terbentuk pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA diduga pemberian konsentrasi auksin yang kecil. Pemberian auksin sintetik dalam konsentrasi rendah dapat menyebabkan pemunculan akar yang cepat jika dibandingkan dengan perlakuan 0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA, menurut pernyataan Wightman *et al* (1980) yang menyatakan bahwa aplikasi auksin eksogen pada media kultur dapat mempercepat pembentukan akar dan mempengaruhi pemanjangan akar jika digunakan dalam konsentrasi rendah.

Pertumbuhan akar yang terhambat pada perlakuan. 0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA, 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA, 0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA dan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA. Adanya peran thidiazuron yang menghambat pertumbuhan akar. Secara umum semakin tinggi konsentrasi TDZ yang digunakan semakin banyak jumlah

planlet yang dihasilkan tetapi semakin kecil ukuran tanaman yang dihasilkan dan umumnya tanaman sulit membentuk akar (Gribaudo dan Fronda, 1991), bahkan pada konsentrasi 1 mM tanaman tidak mampu membentuk akar. Hal ini juga dilaporkan oleh Viktor *et al* (1999) diferensiasi tidak langsung eksplan tidak akan membentuk tunas, peningkatan konsentrasi TDZ akan cenderung menurunkan panjang akar.

Jumlah akar yang banyak dapat mengoptimalkan penyerapan nutrisi yang ada pada media kultur. (Nickell (1982) dalam Andaryani (2010)). Hasil perolehan data pada Tabel 6 menunjukkan berpengaruh nyata terhadap jumlah akar. Pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA memberikan nilai terbaik untuk jumlah akar yaitu sebesar 26,4 akar. Perlakuan 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA, 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA, 0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA dan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA memberikan nilai terendah. Didapatnya nilai terbaik pada perlakuan 0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA karena sel-sel dalam eksplan diduga memiliki kemampuan untuk memproduksi auksin sendiri sehingga mampu mendorong proses metabolisme sel. Penambahan auksin pada media kultur akan menyebabkan interaksi yang tidak seimbang dengan auksin endogen sehingga dapat menghasilkan jumlah akar yang lebih banyak. Menurut Katuuk(1989) pemberian auksin yang rendah dapat memicu pertumbuhan akar.

Kalus adalah sekumpulan sel amorphous (tidak terbentuk atau belum terdiferensiasi) yang terbentuk dari sel-sel yang membelah terus menerus secara *in vitro*. Kalus dapat diperoleh dari bagian tanaman seperti akar, batang dan daun kalus berasal dari pembelahan berkali-kali parenkim di sekitar berkas pengangkut dan beberapa elemen penyusun berkas pengangkut kecuali xylem (Dodi, 2010)

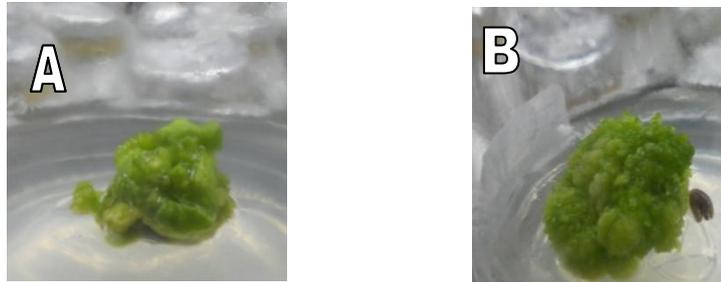
Tabel 8. Pengaruh TDZ dan NAA terhadap Diameter Kalus, Warna Kalus, Saat Berkalus

Perlakuan	Diameter Kalus(mm)	Saat Berkalus (hari)	Warna
0 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	-	-	-
0,5 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	-	-	-
1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA	6	52	8/6 2.5 GY
0 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	-	-	-
0,5 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	-	-	-
1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA	6	89	8/6 2.5 GY

Kalus embriogenik adalah kalus yang mempunyai potensi untuk beregenerasi menjadi tunas, dari hasil penelitian didapat dua perlakuan membentuk kalus embriogenik yaitu pada perlakuan 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA, masing-masing terdapat pada satu ulangan perlakuan. Menurut Mok and Mok (2001) thidiazuron merupakan salah satu tipe phenylurea sintetik yang memiliki kemampuan lebih baik dalam menginduksi tunas diantara jenis sitokinin lainnya, namun dalam penelitian ini pembentukan tunas pada eksplan sarang semut melalui fase organogenesis tidak langsung yaitu melalui fase kalus pada perlakuan thidiazuron tunggal maupun kombinasi, potensi pembentukan tunas juga bisa dilihat dari warna kalus hijau kekuningan muda (8/6 2,5 GY) ini menandakan pengaruh thidiazuron yang aktif membelah sel pada kalus, proses pembentukan kalus embriogenik disajikan pada gambar 7

Saat berkalus adalah waktu yang ditempuh eksplan untuk berkalus yang dinyatakan dalam satuan hari. Peranan zat pengatur tumbuh berpengaruh terhadap kecepatan berkalus, saat berkalus tercepat didapat pada perlakuan 1 mg/l TDZ + 0

mg/l NAA yaitu pada hari ke-52 sedangkan perlakuan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA pada hari ke-89. Berbedanya kecepatan berkalus diduga hal ini disebabkan ketidakseragaman respon dari setiap eksplan sehingga kecepatan yang dihasilkan belum menunjukkan yang sebenarnya.



Gambar 10. Pembentukan kalus embriogenik pada perlakuan (A) 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dan (B) 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA

Diameter kalus digunakan untuk menggambarkan seberapa besar pengaruh perlakuan TDZ dan NAA terhadap diameter kalus. Dari data tabel 8 diameter pada perlakuan 1 mg/l TDZ + 0 mg/l NAA dan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/l NAA tidak menunjukkan perbedaan yaitu 6 mm. Peran thidiazuron yang lebih aktif diduga menyebabkan kandungan zat pengatur tumbuh di dalam jaringan meningkat. Peningkatan tersebut menyebabkan jaringan menjadi stres sehingga terjadi pembelahan sel secara terus – menerus di dalam jaringan yang akhirnya ukuran kalus bertambah besar.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian thidiazuron yang dikombinasikan dengan NAA dapat disimpulkan bahwa perlakuan 1 mg/l TDZ + 0,1 mg/L NAA merupakan perlakuan yang terbaik yang ditunjukkan oleh parameter persentase eksplan hidup (100%), persentase eksplan bertunas (100%) dan jumlah tunas (2 buah).

Berdasarkan hasil penelitian disarankan perlu penelitian lanjutan tentang : Mengetahui penambahan konsentrasi zat pengatur tumbuh thidiazuron dan NAA serta kombinasi ZPT lainnya, mengetahui penggunaan berbagai jenis media kultur in vitro, Mengetahui penggunaan berbagai jenis eksplan dari sarang semut, Mengetahui penggunaan imbalan sitokinin dan auksin untuk menginduksi pertumbuhan akar dan Mengetahui pengaruh Aklimatisasi

Daftar Pustaka

- Anonim. 2011. *Bahan Ajar Ilmu dan Teknologi Benih*. Universitas Hasanudin. Makasar
- Cholif, M. 2007. *Induksi Tunas Selasih Ungu (*Ocimum sanctum L*) Pada Medium MS dengan perlakuan NAA dan BAP secara In Vitro*. Skripsi. Fakultas Pertanian. UMY. Yogyakarta
- Dodi, Z. 2010. *Pengaruh Konsentrasi sukrosa dan BAP (Benzil Amino Purine) dalam Media Murashige Skoog (MS) terhadap Pertumbuhan dan Kandungan respiring kalus Pule Pandak (*Rauvolia verticillata Lour*)*. Skripsi. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam UMS. Surakarta
- Endang, G. L. 2011. *Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyakan Tanaman melalui Kultur Jaringan*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Bogor. *Jurnal AgroBiogen* 7(1):63-68

- Fauzi, A.R. 2010. Induksi Multiplikasi Tunas Ubi Kayu (*Mannihot esculenta* Crantz.) var. Adira 2 secara In Vitro. Skripsi. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Gao, Y. P., H. Motosugi, dan A. Sugiwaru. 1992. Rootstock effects on growth and flowering in young apple trees grown with ammonium and nitrate nitrogen. *Hort Science*, 117: 446-452
- George, E.F and P.D. Sherrington.1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*
- Griboado, I dan Fronda, A. 1991. *Effects of Thidiazuron on Grapevine Axillary Buds Cultivated in Vitro*. Centro di Studio per il Miglioramento Genetico della Vite, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via P. Giuria 15, I-10126 Turin, and Istituto di Coltivazioni Arboree dell'Università Via P. Giuria 15, I-10126 Turin, Italy. *HORTSCIENCE* 26(8):1083. 1991
- Huxley. 1977. *The Ant-Plants Myrmecodia and Hydnophytum (Rubiaceae), and the relationships Between their Morphology, Ant Occupants, Physiology and Ecology*. *Nem Phytol*. Department of Biology, University of Papua New Guinea, Port Moresby
- Intan, R.D.A. 2008. *Peranan dan Fungsi Fitohormon bagi Pertumbuhan Tanaman*. Makalah. Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran Bandung
- J.M.R. Victor, S.J. Murch, S. KrishnaRaj & P.K. Saxena.1999. *Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: The role of thidiazuron and N6-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis*. Department of Plant Agriculture, University of Guelph. Canada. *Plant Growth Regulation* 28: 9–15, 1999
- Katuuk, J.R.P.1989. *Teknik Kultur jaringan dalam Mikropropagasi Tanaman*. Depdikbut. Jakarta.
- Lok, A.F.S.L, dan Tan H.T.W. 2009. *Tuberous, epiphytic, rubiaceae myrmecophytes of Singapore*. *Nature in Singapore* 2:231-236.
- Lu, C.Y. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 29:92-96
- Mok, D.W.S & M.C. Mok. 2001. *Cytokinin metabolism and action*. *Annu. Rev. Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52 : 89-118
- Mulyani, S. 2006. *Anatomi Tumbuhan*. Kanisius (Anggota IKAPI). Yogyakarta
- Plummer, N. 2000. *Cultivation of the Epiphytic Ant-Plants Hydnophytum and Myrmecodia*. *Cactus and Succulent Journal* 72, 142-147.
- Raharjo, K.D. 2004. *Pengaruh Pemberian IBA, NAA, Air Kelapa Dan Arang Aktif Terhadap Induksi Akar Azadirachta Excelsa (Jack) M. Jacobs Secara In Vitro*. Skripsi Departemen Manajemen Hutan IPB
- Rinaldi, S.2011. *Pembiakan In Vitro*. Bahan Ajar Program Studi Agroteknologi Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian UNHAS
- Sarjiyah, S. 2013. *Panduan Praktikum Teknologi Bahan Tanam*. Fakultas Pertanian UMY
- Simanjuntak, P., Fanny, dan Subroto, M.A. 2010. *Isolasi Senyawa Aktif dari Ekstrak Hipokotil Sarang Semut (Myrmecodia pendans Merr. & Perry) sebagai penghambat Xantin Oksidase*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 8(1), 49-54.
- Siyang, T. 2012. *Scarlet-Backed Flowerpecker Feeding on Myrmecodia Fruit*. Bird Ecology study. <http://www.besgroup.org/2012/07/20/scarlet-backed-flowerpecker-feeding-on-myrmecodia-fruits/> (diakses 10 Januari 2014)

- Soeksmanto, A., M.A. Subroto, H. Wijaya and P. Simanjuntak. 2010. *Anticancer Activity Test for Extracts of Sarang Semut Plant (Myrmecodya pendens) to HeLa and MCM-B2 Cells*. Pakistan Journal of Biological Sciences 13(3):148-151
- Sukarjan, M., Supriyadi, dan W. Aprillyastuti. 2012. *Penyelamatan Plasmanutifah Sarang Semut (Myrmecodia pendans) secara In vitro sebagai Upaya Pelestarian Tanaman*. Fakultas Pertanian UMY
- Untung, S., dan Fatimah, N. 2001. *Kultur Jaringan Tanaman*. Universitas Muhammadiyah Malang. Malang. 191 hlm
- Wattimena, G. A. 1992. *Bioteknologi Tanaman: Pemuliaan tanaman secara in vitro*. Laboratorium kultur jaringan Tanaman. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB.
- Yunita, R. 2004. *Multiplikasi Tunas Melinjo (Gnetum gnemon) Secara in vitro*. Balai Pengkajian Teknologi pertanian (BPTP) Riau. SAGU, Maret 2004 vol.3 No. 1 : 1-8