

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendans*)

Tanaman sarang semut (*Myrmecodia pendans*) merupakan tumbuhan epifit yang bersifat tidak parasit dan telah lama dikenal sekaligus dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai salah satu obat tradisional dan memiliki potensi sebagai antioksidan alami (Lampiran V-1). Tanaman sarang semut tersebar di Semenanjung Malaysia, Filipina, Kamboja, Sumatera, Kalimantan, Jawa, Papua, Papua Nugini, Cape York hingga Kepulauan Solomon (Wikipedia, 2011). Tanaman berumbi yang berongga pada bagian batang ini biasanya tumbuh menempel pada beberapa jenis tanaman seperti kayu putih, cemara gunung, kaha dan *beech*. Adapun klasifikasi ilmiah dari tanaman sarang semut yaitu *Kingdom: Plantae; Subkingdom: Tracheobionta; Super Divisi: Spermatophyta; Divisi: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub kelas: Asteridae; Ordo: Rubiales; Famili: Rubiaceace; Genus: Myrmecodia; Spesies: Myrmecodia pendans* (Plantamor, 2011).

Bagian dalam batang berbentuk rongga bersekat-sekat, menyerupai labirin dan biasa dijadikan tempat tinggal koloni semut (Lampiran V-m). Koloni semut yang tinggal di dalam rongga batang spesies *Myrmecodia pendans* adalah *Ochetellus sp.* Keunikan tanaman sarang semut terletak pada interaksi semut yang bersarang pada umbi yang terdapat lorong-lorong di dalamnya. Kestabilan suhu di dalamnya membuat koloni semut betah berlama-lama bersarang di dalam tanaman ini. Dalam jangka waktu yang lama terjadilah reaksi kimia secara alami antara senyawa yang di keluarkan

semut dengan zat yang terkandung di dalam buah sarang semut. Akar tanaman sarang semut tidak berfungsi sebagai penyerap unsur hara, hanya sebagai pengikat terhadap pohon inangnya.

Tanaman sarang semut mengandung flavonoid, tanin, antioksidan tokoferol (vitamin E) dan beberapa mineral penting untuk tubuh seperti kalsium, natrium, kalium, seng, besi, fosfor dan magnesium. Flavonoid merupakan antioksidan alami yang mampu bertindak sebagai pereduksi radikal hidroksil, superoksida dan radikal peroksil (Yuanita, dkk., 2014). Selain itu, flavonoid berperan sebagai antibiotik, antivirus HIV dan herpes (Soeksmanto, dkk., 2010). Oleh karena itu, tanaman sarang semut digunakan sebagai obat tradisional. Hal ini tentunya menuntut terjadinya eksploitasi terhadap tanaman tersebut. Jika hal tersebut tidak diimbangi dengan pelestarian, maka dapat mengakibatkan terjadinya kepunahan mengingat tanaman sarang semut sulit untuk dikembangkan secara konvensional.

Perbanyakan tanaman sarang semut secara alami dapat dilakukan dengan menggunakan biji yang berasal dari buah. Setiap buah beri yang dihasilkan tanaman sarang semut pada umumnya terdapat dua biji. Di tempat yang sesuai misalnya dalam pot dengan medium sabut kelapa yang lembab, biji-biji tersebut dapat berkecambah dengan cepat. Akan tetapi, perbanyakan tanaman sarang semut secara alami mengalami beberapa kendala. Ketika buah sarang semut jatuh, semut jenis *Iridomyrmex cordatus* akan membawa biji dari buah sarang semut ke dalam rongga-rongga pada tanaman sarang semut untuk dimakan (Huxley, 1997) sehingga hanya biji yang selamat yang

bisa tumbuh. Selain itu, burung jenis *Dicaeum cruentatum* memakan buah sekaligus biji sarang semut ketika berbuah (Siyang, 2012). Kendala lainnya yaitu biji sarang semut yang hanya dapat berkecambah dalam kondisi segar. Oleh karena itu diperlukan perbanyak alternatif dalam pelestarian tanaman sarang semut yang salah satunya dapat melalui perbanyak secara *in vitro*.

Perbanyak *in vitro* untuk pelestarian tanaman sarang semut tentunya memiliki beberapa kelebihan dibandingkan pelestarian tanaman sarang semut secara konvensional. Pelestarian secara *in vitro* memungkinkan tanaman sarang semut dapat diperbanyak dalam waktu yang lebih singkat. Selain itu, melalui kultur *in vitro* dapat dihasilkan biakan tanaman sarang semut dalam jumlah yang banyak. Hal ini dikarenakan perbanyak secara *in vitro* dalam pembiakannya tidak harus menggunakan biji, akan tetapi dapat menggunakan bagian kecil dari tanaman sarang semut sehingga lebih efisien dalam hal biaya dan waktu.

## **B. Kultur *In vitro***

Kultur *in vitro* atau kultur jaringan adalah suatu teknik isolasi bagian-bagian tanaman, seperti jaringan, organ, ataupun embrio, kemudian dikultur dalam medium buatan yang steril sehingga bagian-bagian tanaman tersebut mampu beregenerasi dan berdiferensiasi menjadi tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009). Dalam pertumbuhannya, bagian tanaman yang dikultur memerlukan medium yang kaya akan nutrisi dan zat pengatur tumbuh, sehingga bagian-bagian tersebut memperbanyak diri dan akhirnya beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali.

Perbanyakan tanaman melalui kultur *in vitro* ini didasari atas teori *Schleiden* dan *Schwann* yang menyatakan bahwa tiap-tiap sel mampu tumbuh menjadi tanaman baru, maka diperoleh kemampuan ini yang disebut totipotensi dari sel. Dengan teori tersebut banyak dikembangkan tanaman baru yang berasal dari jaringan tumbuhan tertentu. Reproduksi tanaman dengan menggunakan jaringan tertentu tersebut disebut dengan kultur jaringan (*tissue culture*). Teknik ini dipopulerkan oleh Muer, Haberlant dan Riker pada tahun 1954 (Zulkarnain, 2009).

Secara teori, perbanyakan tanaman melalui kultur *in vitro* dapat dibedakan menjadi dua, yaitu:

1. Organogenesis adalah perbanyakan melalui tunas-tunas baru dari tunas aksilar, pada perbanyakan ini dibedakan:
  - a. Dari tunas aksilar yang dimanfaatkan yaitu meristemnya, sehingga dikenal sebagai kultur meristem. Pada teknik ini hal terpenting yang menjadi orientasi adalah menumbuhkan meristem, mendorong penunasan baru kemudian pengakaran.
  - b. Dari tunas aksilar yang dimanfaatkan yaitu ujung tunasnya, sehingga dikenal sebagai kultur tunas. Pada teknik ini hal terpenting yang menjadi orientasi yaitu bagaimana menumbuhkan tunas dan kemudian merangsang pengakaran.
  - c. Dari tunas aksilar yang dimanfaatkan yaitu nodus tunggalnya, sehingga dikenal sebagai mikro stek. Pada teknik ini yang menjadi orientasi adalah merangsang pertumbuhan tunas, sub

kultur mikro stek untuk menghasilkan tunas baru, demikian seterusnya kemudian dilakukan pengakaran.

2. Embriogenesis somatik adalah pembentukan embrio somatik adventif. Pembentukan embrio somatik dapat melalui cara morfogenesis langsung maupun tidak langsung.
  - a. Morfogenesis langsung, bahan tanam yang digunakan dapat bervariasi. Planlet yang ditanam dengan cara ini akan secara langsung membentuk tunas, kemudian dilakukan pengakaran atau secara langsung dari planlet membentuk embrio somatik.
  - b. Morfogenesis tidak langsung, bahan tanam yang digunakan dapat bervariasi sama halnya dengan morfogenesis langsung. Planlet yang ditanam tidak secara langsung membentuk tunas atau embrio somatik, akan tetapi terlebih dahulu membentuk kalus. Setelah itu, kalus akan membentuk tunas adventif dan ada pula yang membentuk embrio somatik (Santoso dan Nursandi, 2001).

Kultur *in vitro* dapat memperbanyak tanaman dengan sifat seperti induknya, pembiakan ini termasuk pembiakan secara vegetatif, yaitu individu baru terjadi dari bagian tubuh suatu induk. Oleh karena itu, individu yang baru terbentuk mempunyai sifat yang sama dengan induknya. Perbanyak tanaman dengan teknik ini membuat tanaman bebas dari penyakit karena dilakukan secara aseptik. Penggunaan metode ini sangat ekonomis dan komersial karena bahan tanaman awal yang diperlukan hanya sedikit atau

satu bagian kecil yang menghasilkan turunan dalam jumlah besar, sehingga penyediaan bibit dalam jumlah yang besar tidak memerlukan banyak tanaman induk. Beberapa keuntungan yang lain dari perbanyakan kultur *in vitro* antara lain: perbanyakan generatif dan vegetatif yang cepat dan efisien, mempermudah seleksi mutan, menghindari sterilitas yang menghambat hibridisasi, produksi tanaman bebas pathogen dan sebagai pelestarian plasma nutfah (Widiastoety dan Santi,1997).

Perbanyakan kultur *in vitro* telah dilakukan pada beberapa jenis tanaman seperti sarang semut. Penelitian kultur *in vitro* tanaman sarang semut telah dilakukan Sukarjan, dkk. (2012) yang menggunakan beberapa eksplan, dengan hasil terbaik yaitu eksplan daun yang ditanam pada medium VW tanpa dekstrak kurma. Supriyadi (2014) melakukan multiplikasi tanaman sarang semut dari eksplan biji dengan penambahan Thidiazuron dan NAA. Hasil terbaik diperoleh pada perlakuan Thidiazuron 1 mg/l dan NAA 0,1 mg/l. Selain itu, Nurjaman (2014) melakukan penelitian tentang pengaruh jenis eksplan dan Thidiazuron terhadap multiplikasi tunas adventif, menghasilkan bahwa Thidiazuron dapat menginduksi multiplikasi tanaman sarang semut dengan konsentrasi terbaik pada Thidiazuron 3 mg/l + 0,5 mg/l NAA dengan jumlah tunas sebanyak 15,33 tunas.

Keberhasilan kultur *in vitro* ditentukan oleh beberapa faktor, seperti medium dan zat pengatur tumbuh yang berpengaruh terhadap pertumbuhan planlet hingga tahap terakhir dalam kultur *in vitro*. Titik kritis sekaligus tahapan terakhir yang menjadi indikasi keberhasilan kultur *in vitro* yaitu

aklimatisasi. Proses tersebut sangat dipengaruhi oleh sistem perakaran yang cukup kuat dari planlet yang akan diaklimatisasi. Untuk menghasilkan sistem perakaran yang kuat dapat ditempuh melalui optimalisasi pengakaran planlet. Hal ini dapat dicapai dengan pemberian nutrisi tambahan maupun ZPT yang dapat meningkatkan kuantitas akar planlet.

### **C. Pengakaran**

Keberhasilan aklimatisasi dalam kultur *in vitro* ditentukan oleh proses pengakaran. Pengakaran adalah fase dimana planlet akan menunjukkan adanya pertumbuhan akar yang menandai bahwa proses kultur jaringan yang dilakukan mulai berjalan dengan baik. Namun, akar yang dihasilkan dari penginduksian belum cukup kuat baik dalam menopang tubuh tanaman maupun menyerap unsur hara dalam medium tumbuh aklimatisasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan peningkatan kuantitas akar planlet yang akan diaklimatisasi dalam proses pengakaran. Salah satu faktor yang berpengaruh dalam proses tersebut yakni medium tanam.

Dalam proses pengakaran, medium tanam yang digunakan biasanya menggunakan arang aktif. Bahan baku arang aktif yaitu arang tempurung biji-bijian, kayu dan limbah biomassa lainnya (Hartoyo, 1988). Arang yang berasal dari tumbuhan mengandung 95 – 99% bahan arang aktif (Pierik, 1987). Penggunaan arang aktif dapat menyerap senyawa racun dalam medium dan senyawa inhibitor yang disekresikan oleh planlet, menstabilkan pH medium, merangsang pertumbuhan akar dengan mengurangi jumlah cahaya yang masuk ke dalam medium planlet, mencegah atau mengurangi

pembentukan kalus dan merangsang morfogenesis (Pierik 1987). Menurut Fridborg, *et al.*, (1978) arang aktif dapat menyerap senyawa fenol yang keluar dari jaringan tanaman yang terluka pada saat inisiasi. Selain itu, arang aktif dapat mengurangi pencoklatan medium akibat pemanasan tinggi setelah sterilisasi (Madhusudhanan dan Rahiman, 2000).

Faktor lain yang dapat memicu pertumbuhan sekaligus memperkuat akar secara *in vitro* yaitu dengan pemberian nutrisi tambahan dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Nutrisi tambahan yang digunakan dapat berupa sukrosa, sedangkan ZPT yang ditambahkan yaitu IBA.

### **1. Sukrosa**

Sukrosa merupakan salah satu jenis sumber karbon dan energi atau nutrisi bagi planlet karena umumnya bagian tanaman atau planlet yang dikulturkan tidak autotrof dan mempunyai laju fotosintesis sangat rendah. Selain itu, pemberian sukrosa, glukosa atau karbohidrat jenis yang lain sesungguhnya memacu pembentukan, regenerasi kalus, pembentukan tunas dan akar dalam kultur *in vitro* melalui energi dan beberapa kerangka karbon yang dihasilkan. Kedua bahan tersebut menjadi bahan dasar penting dalam pembentukan berbagai jenis asam amino, asam nukleat, zat pengatur tumbuh, protein dan bahan lain yang berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* (Winarto, dkk., 2009).

Selain sebagai sumber energi, sukrosa juga berperan sebagai *hardening* planlet. Peningkatan tekanan osmotik pada media dapat ditujukan untuk *hardening* planlet (Hartman *et al.*, 1997). Adanya suplai sukrosa dalam

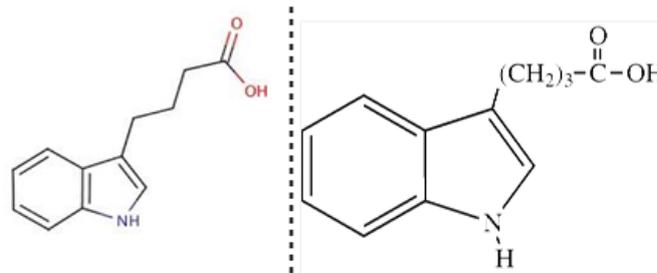
medium dapat memacu diferensiasi dan perkembangan akar (Warreing dan Phillips, 1981). Sukrosa bila disterilisasi pada suhu yang sesuai akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa. Glukosa merupakan sumber kekuatan bagi sel untuk tumbuh dan berkembang membentuk sel-sel baru (Srilestari, 2005). Konsentrasi sukrosa yang digunakan berkisar 1 – 5% (10 – 50 g/L), tetapi untuk kebanyakan pengkulturan, 2 – 3% sukrosa umumnya merupakan konsentrasi yang optimum (Yusnita, 2003). Sukrosa dengan konsentrasi 2% sampai 5% merupakan sumber karbon dan penggunaan sukrosa di atas 3% menyebabkan terjadinya pembelahan dinding sel (Marlin, dkk., 2008).

Hasil-hasil penelitian *in vitro* menunjukkan kebutuhan sukrosa yang berbeda untuk setiap jenis tanaman dan jenis kultur. Pemberian sukrosa 61,08 g/L sampai 78,26 g/L merupakan konsentrasi yang optimum dalam meningkatkan jumlah tunas, jumlah akar, dan persentase pembentukan akar pada kultur tanaman vanili (Fitriani, dkk., 2007). Batubara, dkk. (2013) juga menyatakan pemberian 30 g/L sukrosa menghasilkan saat tumbuh akar tercepat, jumlah tunas terbanyak dan jumlah akar terbanyak. Pada penelitian Kaisar (2014), diketahui bahwa interaksi 90 g/L sukrosa dan 3 g/L arang aktif menghasilkan jumlah akar terbanyak (24,5 akar) dan tinggi tunas tertinggi (32,5 cm).

## **2. IBA (*Indole-3-Butyric Acid*)**

IBA (*Indole-3-butyric acid* atau asam indol butirrat) merupakan salah satu hormon sintetis yang digunakan untuk menunjang pertumbuhan akar.

Hormon ini memiliki rumus molekul  $C_{12}H_{13}NO_2$  yang terdiri dari dua molekul yaitu indol dan asam butirat (USDA, 2011). Rumus bangun dari IBA dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



Gambar 1. Rumus Bangun IBA

Hingga saat ini, mekanisme kerja IBA sebagai zat pengatur tumbuh belum diketahui secara pasti. Akan tetapi, telah ditemukan bukti genetik yang menunjukkan bahwa IBA dapat diubah menjadi IAA melalui proses yang mirip dengan  $\beta$  – oksidasi asam lemak ( $\beta$  – *oxidation of fatty acids*). Konversi IBA menjadi IAA menunjukkan bahwa IBA bekerja sebagai penyerap penyimpanan untuk IAA pada tanaman (Zolman, *et al.*, 2008). IBA digunakan sebagai zat pengatur tumbuh dalam pengendalian karena hormon ini mengandung auksin.

Auksin didefinisikan sebagai zat tumbuh yang mendorong elongasi dari jaringan koleoptil. Hal tersebut dibuktikan melalui percobaan-percobaan dengan tanaman avena atau lainnya (Kartina, dkk., 2011). George dan Sherrington (1984) menuliskan bahwa senyawa yang disebut dengan auksin adalah apabila senyawa tersebut mampu mengontrol beberapa proses khusus seperti perkembangan sel dan elongasi sel. Zat pengatur tumbuh ini biasanya digunakan dalam konsentrasi rendah dan dalam masa induksi yang singkat,

antara 2 – 4 minggu. Penggunaan zat pengatur tumbuh dalam masa panjang dapat menimbulkan mutasi sel. Konsentrasi yang digunakan dari 0,001 – 2 mg/L (Gunawan, 1987).

Secara umum, auksin menyebabkan pemanjangan sel, pembesaran sel, pembentukan kalus dan pembentukan akar (Pierik, 1987), mempengaruhi pertambahan panjang batang, pertumbuhan, diferensiasi dan percabangan akar, perkembangan buah, dominansi apikal, fototropisme dan geotropisme (Yusnita, dkk., 2013). Terdapat banyak jenis auksin selain IBA, seperti NAA (*1 – Naphthaleneacetic Acid*), IAA (*Indole 3 Acetic Acid*), PAA (*Phenylacetic Acid*), 4-Cl-IAA (*4 – Chloro – Indoleacetic Acid*) dan 2,4 – D (*2,4 – Dichlorophenoxyacetic Acid*) (Karyanto, 2014).

Sekarang ini, IBA merupakan jenis auksin yang paling sering digunakan dalam induksi maupun penguatan akar dibandingkan jenis auksin lainnya. Selain karena kemampuannya dalam merangsang terbentuknya akar pada planlet, IBA memiliki kemampuan yang tinggi dalam mengendalikan inisiasi akar (Weisman, *et al.*, 1988). Disamping itu, IBA juga memiliki kestabilan yang baik dan tingkat toksisitas yang rendah dibandingkan NAA dan IAA (George, *et al.*, 2007). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Hoque, *et al.* (1998) jumlah akar terbanyak dihasilkan dari tunas yang dikulturkan pada medium MS  $\frac{1}{2}$  konsentrasi dengan penambahan IBA 0,2 mg/L. Pada pengakaran, ukuran tunas saat dipindahkan ke dalam medium pengakaran adalah  $\pm 2$  cm. Akar yang terbentuk secara *in vitro* seringkali tebal

atau gemuk (memiliki diameter lebih besar) dan memiliki rambut-rambut akar (Riyadi dan Sumaryono, 2010).

Pada penelitian Rineksane (2000) untuk perlakuan perendaman biji manggis dalam larutan Rooton F 2 g/L selama 30 menit cenderung menghasilkan akar jumlah akar terbanyak. Selain itu, pada perlakuan tersebut mampu menghasilkan akar primer terpanjang. Hal ini dikarenakan dalam Rooton F terkandung IBA yang berperan dalam meningkatkan jumlah dan panjang akar (Rineksane, 2000). Penambahan IBA dengan konsentrasi 0,5 mg/L memberikan hasil terbaik pada pengakaran tanaman *Pelargonium tomentosum* (Rostiana dan Seswita, 2007). Selain itu, penambahan IBA dengan konsentrasi rendah (0,2 – 0,4 mg/L) dalam menginduksi tunas *Piretrum* mampu menghasilkan jumlah akar yang banyak dibandingkan dengan perlakuan pemberian NAA.

Pengaplikasian IBA 2,000 ppm dalam kultur *ex vitro* pada tunas *Sansiviera* dapat meningkatkan jumlah akar sekunder, panjang akar dan bobot basah akar (Yusnita, dkk., 2013). Pemberian IBA 0,25 mg/L dapat menginduksi akar tanaman *Lens culinaris* dengan persentase perakaran sebesar 25% selama empat minggu (Riyadi dan Sumaryono, 2010). Selain itu, perlakuan IBA memberikan peluang hidup terbesar (96,6%) pada stek bunga sepatu (Kristina dan Syahid, 2012).

#### **D. Aklimatisasi**

Keberhasilan kultur *in vitro* ditentukan oleh aklimatisasi, sehingga aklimatisasi merupakan tahap penting dalam proses kultur *in vitro*.

Aklimatisasi adalah proses pengkondisian planlet atau tunas mikro (jika pengakaran dilakukan secara *ex vitro*) di lingkungan baru yang aseptik di luar botol. Tahap ini sering kali menjadi titik kritis dalam aplikasi teknik kultur jaringan. Aklimatisasi dilakukan pada tempat yang terkendali atau terkontrol baik suhu, cahaya, kelembaban dan faktor lingkungan lainnya sebelum tanaman hasil kultur di lapangan (Munir dan Zulman, 2011).

Aklimatisasi diperlukan karena tanaman hasil kultur jaringan umumnya memiliki lapisan lilin tipis dan belum berkembang dengan baik, sel-sel dalam palisade belum berkembang maksimal, jaringan pembuluh dari akar ke pucuk kurang berkembang, dan stomata sering kali tidak berfungsi, yaitu tidak dapat menutup pada saat penguapan tinggi. Oleh sebab itu, aklimatisasi akan membantu tanaman beradaptasi terhadap perubahan kondisi lingkungan seperti suhu, kelembapan, dan intensitas cahaya. Selain itu, medium tumbuh juga memiliki peranan yang cukup penting, khususnya bila pucuk-pucuk mikro yang diaklimatisasi belum membentuk sistem perakaran yang baik (Muhit, 2007). Fungsi medium tanam adalah sebagai tempat tumbuh dan menyimpan unsur hara serta air bagi tanaman. Medium tumbuh yang digunakan dapat berupa arang kayu, pakis, sabut kelapa dan serbuk gergaji, *moss*, kulit pinus, pecahan genteng dan batu bata.

Faktor penentu keberhasilan aklimatisasi salah satunya yaitu keadaan planlet pada tahap pra-aklimatisasi. Tahap pra-aklimatisasi yang bertujuan memperkuat sistem perakaran dengan meningkatkan kuantitas akar planlet yang akan diaklimatisasi dapat mendukung keberhasilan aklimatisasi. Hal ini

dikarenakan dengan sistem perakaran yang baik, maka planlet dapat beradaptasi dengan lingkungan *ex vitro*. Akar yang kuat dan banyak memungkinkan planlet dapat menyerap unsur hara pada medium tumbuh ketika diaklimatisasi.

### **E. Hipotesis**

Pemberian sukrosa 40 g/L dan IBA 0,5 mg/L dapat meningkatkan kuantitas akar serta keberhasilan proses aklimatisasi planlet tanaman sarang semut.