

Multiplikasi Tunas *Tetrastigma rafflesiae* Miq. pada Media Tanam Murashige-Skoog dengan Penambahan 6-Benzylaminopurine dan 1-Naphtaleneacetic Acid secara *In Vitro*

In Vitro Shoot Multiplication of *Tetrastigma rafflesiae* Miq. on Murashige-Skoog Media with Addition of 6-Benzylaminopurine and 1-Naphtaleneacetic Acid

Ridha Permata Sari, Suwirman dan M. Idris^{*)}

Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat 25163

^{*)} Koresponden: uwakidris@gmail.com

Abstract

The study about *in vitro* shoot multiplication of *Tetrastigma rafflesiae* miq. on murashige-skoog media with addition of 6-Benzylaminopurine and 1-Naphtaleneacetic Acid had purpose to determine physiological responses of *Tetrastigma rafflesiae* nodes with addition of 6-Benzylaminopurine (BAP) and 1-Naphtaleneacetic Acid (NAA) in several concentrations on shoot multiplication stages. This experiment used randomised complete design in 11 treatments and three replications. The treatment were the addition of BAP (1.0-5.0 mg/l) and its combination with NAA (0.1 mg/l) on MS medium. The results showed that nodus successfully producing shoot and callus. The addition of BAP was more effective than its combination with NAA in shoot multiplication. MS medium with addition of 2.0-4.0 mg / l BAP showed a better media for shoot multiplication (2.3-2.7 shoot each explant). Generally, MS media with combination of BAP and NAA produced a higher shoot although it did not significantly differed with BAP treatments. The result indicated that addition of BAP in *in vitro* medias have a high possibility of success for shoot multiplications in Rafflesia's host plant conservation.

Keywords: 1-Naphtaleneacetic Acid, 6-Benzylaminopurine, Murashige-Skoog media, Shoot multiplication.

Pendahuluan

Tetrastigma merupakan inang satu-satunya dari *Rafflesia* (Zuhud, Hikmat dan Jamil, 1998). Perakaran tanaman ini menjadi tempat penginfeksi dan perkecambahan biji *Rafflesia* (Zuhud, Ekarelawan dan Hikmat, 1993). Peran sebagai satu-satunya inang *Rafflesia* membuat keberadaan *Tetrastigma* sangatlah penting untuk mempertahankan kelestarian *Rafflesia*, salah satunya *Tetrastigma leucostaphylum* (sin *T. lanceolarium*) yang telah berganti nama menjadi *T. rafflesiae* (Veldkamp, 2007).

Ketersediaan *T. rafflesiae* sangat diperlukan untuk mempertahankan keberadaan *Rafflesia*. Idris dan Surya (2011) menyatakan bahwa pemakaian kinetin dan air kelapa pada *T. rafflesiae* belum menghasilkan tunas secara optimal.

Sehingga diperlukan hormon atau alternatif lain untuk meningkatkan multiplikasi tunas *T. rafflesiae*. Sementara itu Jiang, Fu, Zhou dan Fu (2011) menyatakan bahwa BAP lebih efektif daripada kinetin dalam memperbanyak tunas *T. hemsleyanum* serta BAP yang dikombinasikan dengan NAA mampu meningkatkan multiplikasi dan pertumbuhan *T. hemsleyanum*.

Pentingnya keberadaan *Tetrastigma* terutama untuk mendukung usaha konservasi *Rafflesia* membuat penelitian ini sangat perlu untuk dilakukan. Penggunaan BAP dan NAA diharapkan mampu meningkatkan perbanyakan dan pertumbuhan tunas *T. rafflesiae*.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap dengan 11

perlakuan dan 3 ulangan. Media perlakuan didapatkan dengan penambahan BAP berkisar 1-5 mg/l dan kombinasinya dengan 0,1 mg/l NAA. Keasaman media diatur pada kisaran 5,8-6,0 menggunakan 0,1 N HCl dan 0,1 N NaOH. Sumber eksplan adalah nodus *T. rafflesiae* yang dipotong dengan ukuran 0,5-1 cm kemudian ditanam pada media perlakuan dan diinkubasi selama 8 minggu. Eksplan yang telah ditanam pada medium perlakuan, dipelihara di dalam ruang tumbuh yang suhunya telah diatur pada kisaran $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan fotoperiodisme 12 L/12 D dan intensitas cahaya 500-1500 Lux. Kemudian dilakukan pengamatan persentase hidup eksplan, persentase eksplan membentuk tunas, hari pertama munculnya tunas serta morfologi tunas yang dianalisa secara deskriptif serta jumlah dan tinggi tunas dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16.0. Uji lanjut menggunakan Duncan New Multiple Range Test (DNMRT) pada taraf peluang 5%.

Hasil dan Pembahasan

Persentase hidup eksplan

Penggunaan BAP dan NAA pada nodus *T. rafflesiae* menghasilkan persentase hidup 100% pada semua perlakuan, dihitung pada minggu kedua setelah penanaman. Hal ini menandakan bahwa medium MS cocok untuk kultur *T. rafflesiae* dan dianggap telah menyediakan nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan eksplan. Medium MS adalah media yang paling umum digunakan dalam kultur jaringan. Hal ini dikarenakan medium MS memiliki kandungan nitrogen yang lebih tinggi dibandingkan medium lainnya (Gunawan, 1988).

Sebagian besar eksplan mengalami pembengkakan pada bagian yang tertanam ke medium pada minggu pertama. Hal ini merupakan respon terhadap hormon yang diberikan pada media. Seperti yang diketahui bahwa auksin dan sitokinin berperan dalam pembelahan dan pemanjangan sel (Sakakibara, 2006; Mockaitis dan Estelle, 2008). Hal ini terbukti karena pada kontrol tidak ada eksplan yang mengalami pembengkakan. Hal yang sama juga terjadi pada penelitian

Stamp, Colby dan Meredith (1990) yang mana eksplan *Vitis* sp. yang ditanam pada media dengan penambahan BAP mengalami pembengkakan mulai hari ke-3.

Persentase eksplan bertunas

Penggunaan BAP tunggal lebih baik untuk pembentukan tunas dibandingkan dengan kombinasi BAP dan NAA (Tabel 1). Pada Tabel 1. dapat dilihat bahwa perlakuan 5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA gagal membentuk tunas yang diduga akibat ketidakseimbangan hormon pada eksplan. Konsentrasi BAP yang tinggi menghambat perkembangan tunas bahkan dapat mengakibatkan kematian eksplan (Lee dan Weitszen, 1990; Zang, Yu, Cheng, Zhang dan Tao, 2011). Keadaan yang sama juga terjadi pada penelitian Ozden dan Karaaslan (2010) bahwa peningkatan sitokinin (BAP) diikuti oleh semakin meningkatnya jumlah senyawa metabolit sekunder (fenol) yang terbentuk pada *Vitis fenivera*. Sulastri (2005) juga mendapatkan eksplan dan medium yang mencoklat setelah beberapa hari perlakuan, diduga merupakan aktifitas metabolit sekunder golongan fenolik yang dilepaskan ke media selama proses pertumbuhan awal sehingga eksplan juga tidak menghasilkan tunas.

Waktu muncul tunas dan kalus

Kisaran hari pertama munculnya tunas dan kalus pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2. Perlakuan yang menggunakan BAP saja menghasilkan tunas lebih cepat yaitu pada minggu ke-2 yang diikuti dengan pembentukan kalus. Perlakuan menggunakan kombinasi BAP dengan NAA memunculkan kalus terlebih dahulu pada minggu ke-2 yang diikuti dengan pembentukan tunas.

Hari munculnya tunas *T. rafflesiae* pada penelitian ini lebih cepat dibandingkan dengan penelitian Surya dan Idris (2011) yaitu tunas terbentuk sekitar 21-30 hari pengamatan. Ini memperlihatkan penggunaan BAP lebih efektif dalam menghasilkan tunas dibandingkan kinetin. Dapat disimpulkan bahwa BAP mampu dengan cepat menginduksi eksplan berproliferasi sehingga pada minggu kedua sel-sel tersebut telah mampu

bermorfogenesis membentuk tunas. Penelitian Alizadeh, Singh dan Patel (2010) juga memperlihatkan hal yang sama bahwa penggunaan BAP menghasilkan tunas lebih cepat dibandingkan kinetin pada empat jenis tanaman *Vitis* serta tunas lebih cepat muncul pada kombinasi BAP dengan NAA dibandingkan dengan penggunaan BAP tunggal. Hal ini tidak sesuai dengan waktu munculnya tunas pada tanaman *T. rafflesiae* dimana tunas lebih cepat muncul pada penggunaan BAP tunggal daripada kombinasi BAP dengan NAA. Hal ini dikarenakan kemampuan masing-masing tumbuhan berbeda-beda dalam merespon hormon eksogen yang ditambahkan.

Jumlah dan tinggi tunas

Analisis sidik ragam terhadap rata-rata jumlah tunas memperlihatkan hasil yang berbeda nyata. Setelah dilakukan uji lanjut DNMRT pada taraf 5% dapat dilihat bahwa konsentrasi 2-4 mg/l BAP baik untuk memperbanyak tunas (Tabel 3.). Pemakaian BAP tunggal lebih memacu peningkatan jumlah tunas bila dibandingkan dengan kombinasi BAP dan NAA. Pada penelitian Jiang *et al.* (2011) yang mengkultur *T. hemsleyanum* menggunakan BAP, kinetin dan NAA didapatkan bahwa BAP tunggal lebih efektif dalam memperbanyak tunas dibandingkan dengan kinetin. Pada penelitian tersebut kombinasi BAP dan NAA menurunkan pembentukan tunas seiring dengan peningkatan konsentrasi NAA.

Tabel 1. Respon eksplan *T. rafflesiae* terhadap pemberian berbagai konsentrasi BAP dan NAA

No	Perlakuan	Persentase Hidup (%)	Persentase Tunas (%)	Respon Lainnya
1	MS	100	100	-
2	1 mg/L BAP	100	100	Kalus
3	2 mg/L BAP	100	100	Kalus
4	3 mg/L BAP	100	100	Kalus
5	4 mg/L BAP	100	100	Kalus
6	5 mg/L BAP	100	100	-
7	1 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA	100	67	Kalus
8	2 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA	100	33	Kalus
9	3 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA	100	67	Kalus
10	4 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA	100	33	Kalus
11	5 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA	100	0	Kalus

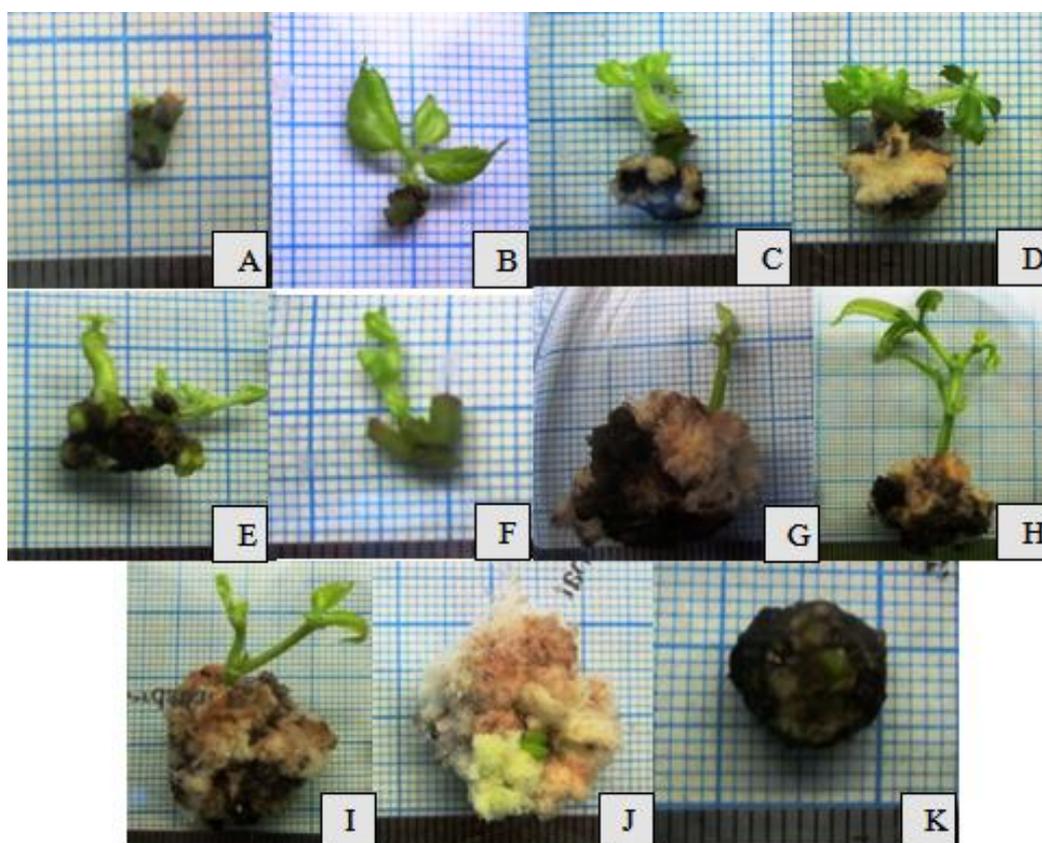
Tabel 2. Hari pertama muncul tunas dan kalus *T. rafflesiae* pada media MS dengan penambahan BAP dan NAA

No	Perlakuan	Hari pertama muncul (hst*)	
		Tunas	Kalus
1.	Kontrol (MS tanpa ZPT)	9	-
2.	MS + 1 mg/l BAP	8	14
3.	MS + 2 mg/l BAP	8	14
4.	MS + 3 mg/l BAP	8	12
5.	MS + 4 mg/l BAP	8	14
6.	MS + 5 mg/l BAP	9	-
7.	MS + 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA	29	11
8.	MS + 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA	40	9
9.	MS + 3 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA	29	9
10.	MS + 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA	21	11
11.	MS + 5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA	21	9

*hst: hari setelah tanam

Tabel 3. Jumlah dan tinggi tunas *T. rafflesiae* pada media MS dengan penambahan BAP dan NAA setelah minggu ke-8

No	Perlakuan	Rata-rata jumlah tunas	Rata-rata tinggi tunas (cm)
1.	Kontrol (MS tanpa ZPT)	1,0 ^{bcd}	0,17 ^a
2.	MS + 1 mg/l BAP	1,0 ^{bcd}	0,33 ^a
3.	MS + 2 mg/l BAP	2,3 ^{ab}	0,60 ^a
4.	MS + 3 mg/l BAP	2,3 ^{ab}	0,33 ^a
5.	MS + 4 mg/l BAP	2,7 ^a	0,53 ^a
6.	MS + 5 mg/l BAP	1,7 ^{abc}	0,53 ^a
7.	MS + 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA	0,7 ^{cd}	0,60 ^a
8.	MS + 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA	0,7 ^{cd}	0,87 ^a
9.	MS + 3 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA	0,7 ^{cd}	0,77 ^a
10.	MS + 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA	0,3 ^d	0,10 ^a
11.	MS + 5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA	0,0 ^d	0,00 ^a



Gambar 1. Morfologi eksplan *T. Rafflesiae* hasil perbanyakan dengan menggunakan BAP dan kombinasi BAP dengan NAA. A: Kontrol (MS tanpa hormon), B: MS + 1 mg/l BAP, C: MS + 2 mg/l BAP, D: MS + 3 mg/l BAP, E: MS + 4 mg/l BAP, F: MS + 5 mg/l BAP, G: MS + 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, H: MS + 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, I: MS + 3 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, J: MS + 4 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, K: MS + 5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA.

Penelitian Idris dan Surya (2011) menghasilkan perbanyakan tunas *T. rafflesiae* terbaik terdapat pada medium MS dengan penambahan air kelapa 150 ml/l dan 4 mg/l kinetin dengan jumlah tunas yang dihasilkan 2-4 tunas per eksplan.

Sedangkan pada penelitian ini medium MS dengan penambahan 2 mg/l BAP telah mampu menghasilkan 2-4 tunas per eksplan. Dapat dilihat bahwa penggunaan BAP mampu meningkatkan produksi tunas

pada konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan kinetin.

Rata-rata tinggi tunas tidak berbeda nyata setelah dilakukan analisis sidik ragam. Peningkatan konsentrasi BAP menghasilkan tunas yang berukuran lebih kecil daripada kombinasi BAP dan NAA. NAA merupakan hormon golongan auksin yang berfungsi dalam pemanjangan sel, sehingga tunas yang dihasilkan pada perlakuan yang menggunakan NAA lebih tinggi. Pemberian BAP secara umum menghasilkan tunas yang banyak namun kecil dan pendek. Tunas yang dihasilkan pun cenderung bertumpuk sehingga akan mempersulit dalam pemisahan untuk keperluan subkultur. Sedangkan pada kombinasi BAP dan NAA walaupun jumlahnya sedikit namun tunas yang dihasilkan memiliki pertumbuhan yang baik. Tunas yang dihasilkan pun tidak menumpuk dan memiliki internodus yang jelas (Gambar 1).

Sitokinin diketahui sebagai hormon yang berperan penting dalam memacu pembentukan tunas, sedangkan auksin merupakan hormon yang memacu pembentukan akar (Perilli, Moubayidin dan Sabatini, 2009; Osborn dan McManus, 2005). Sitokinin bersama dengan auksin mampu memacu pertumbuhan tunas (Jiang *et al.*, 2011). Auksin diperlukan untuk meningkatkan pertumbuhan tunas terkait fungsinya dalam pemanjangan sel. Pada konsentrasi yang tepat penambahan BAP dan NAA akan menghasilkan tunas yang banyak dengan kondisi tunas yang baik. Hanya saja pada penelitian ini belum ditemukan konsentrasi BAP dan NAA yang tepat untuk memperbanyak dan optimalisasi pertumbuhan tunas *T. rafflesiae*.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil diatas dapat disimpulkan bahwa:

1. *T. rafflesiae* mampu membentuk tunas dan kalus pada media MS yang diberi tambahan 1-4 mg/l BAP tunggal dan 1-4 mg/l BAP yang dikombinasikan dengan 0,1 mg/l NAA, penambahan 5 mg/l BAP dan kontrol mampu membentuk tunas saja, serta penambahan 5 mg/l BAP +

0,1 mg/l NAA hanya menghasilkan kalus.

2. Penambahan BAP tunggal lebih optimal dalam memperbanyak tunas *T. rafflesiae*. Penambahan 2-4 mg/L BAP baik untuk memperbanyak tunas *T. rafflesiae*.
3. Secara umum penggunaan kombinasi BAP dengan NAA menghasilkan tunas yang lebih panjang daripada penambahan BAP saja.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Dirjen Perguruan Tinggi (DIKTI) yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Kreatifitas Mahasiswa Penelitian (PKM-P). Terimakasih juga disampaikan kepada Dr. Zozy Aneloi Noli, Dr. Tesri Maideliza, Dr. Chairul, dan Zuhri Syam, M.P atas masukan dan saran yang diberikan pada penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Alizadeh, M., S. K. Singh and V. B. Patel. 2010. Comparative Performance of In Vitro Multiplication in Four Grape (*Vitis* sp.) Rootstock Genotypes. *International Journal of Plant Production* 4 (1) : 41-50.
- Gunawan, L. W. 1988. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Idris, M. dan N. W. Surya. 2011. Inisiasi Tunas dari Potongan Hipokotil *Tetrastigma leucostaphylum* dalam Perbanyak Inang Tumbuhan Rafflesia Secara *In Vitro*. *Biospectrum* 7 (1): 28-32.
- Jiang, W., Y. Fu, X. Zhou, dan C. Fu. 2011. High-Frequency Shoot Regeneration of Nodal Explants from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg: A Valuable Medicinal Plant. *African Journal of Biotechnology* 10(57) : 12177-12181.
- Lee, N. dan H. Y. Wetzstein. 1990. *In Vitro* Propagation of Muscadine Grape by Axillary Shoot Poliferation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(2): 324-329.

- Mockaitis, K dan M. Estelle. 2008. Auxin Receptor and Plant Development: A New Signaling Paradigm. *Annual Review of Cell and Developmental Biologi.* 24: 55-80.
- Osborne, D. J dan M. T. McManus. 2005. *Hormones, Signals and Target Cells in Plant Development.* Cambridge University. New York.
- Ozden, M. dan M. Karaaslan. 2010. Effect of Cytokinin on Callus Proliferation Associated with Physiological and Biochemical Changes in *Vitis vinifera* L. *Acta Physiol Plant.* 33: 1451-1459.
- Perilli, S., L. Moubayidin dan S. Sabatini. 2009. The Molecular Basis of Cytokinin Function. *Plant Biology.* 13: 21-26.
- Sakakibara, H. 2006. Cytokinin: Activity, Biosynthesis and Translocation. *Annual Review of Cell and Developmental Biologi.* 57: 431-449
- Stamp, J. A., S. M. Colby dan C. P. Meredith. 1990. Direct Shoot and Plant Regeneration from Leaves of Grape (*Vitis* spp.). *Plant Cell, Tissue dan Organ Culture.* 22: 127-133.
- Sulastrri, C. 2005. *Kultur Tunas Pisang Kepok (Musa branchycarpa Backer.) pada Medium Murashige-Skoog dengan Penambahan BAP dan NAA.* [Skripsi] Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Andalas. Padang.
- Surya, N. W. dan Idris M. 2011. A Preliminary Study on *In vitro* Seed Germination and Rooted Callus Formation of *Tetrastigma rafflesiae* (Vitaceae). *Garden's Bulletin Singapore* 63(1 & 2): 507–513.
- Veldkamp, J. F. 2007. The Correct Name for The Tetrastigma (Vitaceae) Host Of Rafflesia (Rafflesiaceae) In Malesia And A (Not So) New Species. *Reinwardita* 12(4): 261-265.
- Zhang, P., Z. Y. Yu, Z. M. Cheng, Z. Zhang dan J. M. Tao. 2011. *In Vitro* Explant Regeneration of The Grape Wink (*Vitis Vinifera* L. Wink). *Journal of Plant Breeding and Croop Science.* 3(11): 276-282.
- Zuhud E. A. M., Ekarelawan, Hikmat A. 1993. *Bioekologi dan Penanggulangan Rafflesia rochusenii untuk Pelestarian Pemanfaatannya di Gunung Salak.* Bogor: Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Zuhud, E. A. M., Hikmat A., dan Jamil N. 1998. *Rafflesia Indonesia : Keanekaragaman, Ekologi dan Peletariannya.* Jurusan Konservasi Sumberdaya Hutan – Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor.