



**PENGARUH KONSENTRASI HORMON 2,4-D
(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) TERHADAP
INDUKSI KALUS DAUN TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L.) MELALUI
KULTUR *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :
Deni Parmana
NIM 110210103033

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
JURUSAN PENDIDIKAN MIPA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**PENGARUH KONSENTRASI HORMON 2,4-D
(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) TERHADAP
INDUKSI KALUS DAUN TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L.) MELALUI
KULTUR *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :
Deni Parmana
NIM 110210103033

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
JURUSAN PENDIDIKAN MIPA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**PENGARUH KONSENTRASI HORMON 2,4-D
(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) TERHADAP
INDUKSI KALUS DAUN TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L.) MELALUI
KULTUR *IN VITRO***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pendidikan

**Oleh :
Deni Parmana
NIM 110210103033**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
JURUSAN PENDIDIKAN MIPA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang, saya persembahkan skripsi saya ini dengan segala cinta dan kasih kepada :

1. Orang tua saya Ibu Suntanah dan Bapak Parmat yang telah bekerja keras dan berkorban, mencurahkan cinta dan kasih sayangnya, tidak pernah berhenti mendoakan saya dan memberi semangat serta motivasi dalam menyelesaikan karya tulis ilmiah (Skripsi) ini.
2. Adik saya Muhammad Dito Suro Pangestu yang selalu memberi semangat dan doa kepada saya.
3. Keluarga besar saya yang selalu memberi dukungan, semangat, motivasi, doa, serta cinta dan kasih sayangnya kepada saya.
4. Niko Putra Karunia anggota keluarga baru, calon suamiku yang selalu menemani, memberi dukungan, semangat, doa, perhatian, kasih sayang dan bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini.

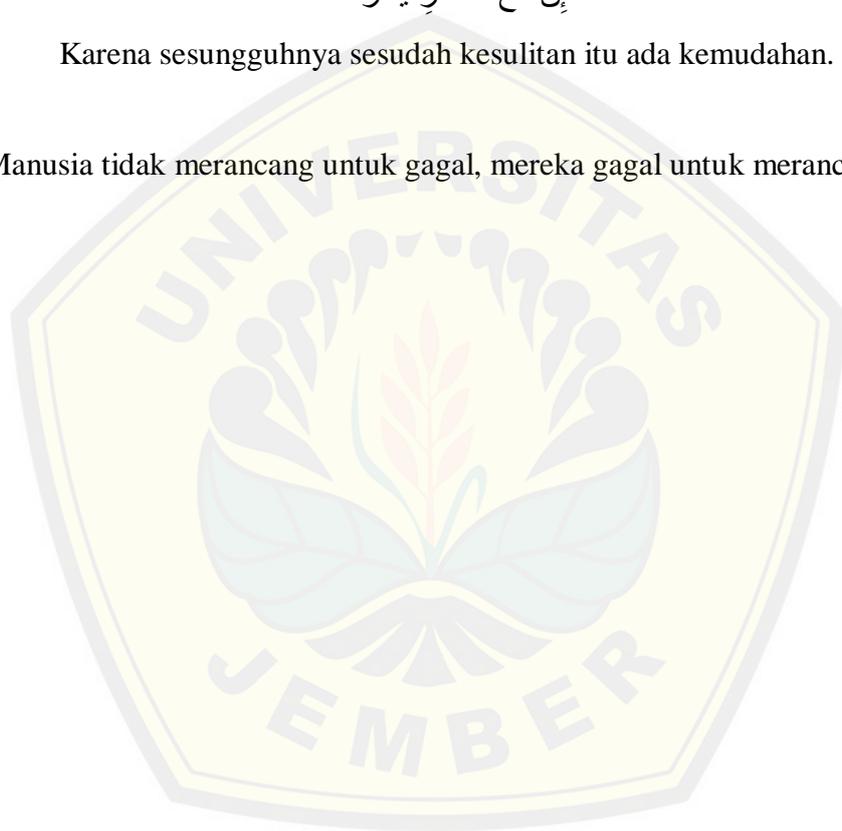
MOTTO

Gantungkan cita-citamu setinggi langit. Bermimpilah setinggi langit. Jika engkau jatuh, engkau akan jatuh diantara bintang-bintang. *)

فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا

Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. **)

Manusia tidak merancang untuk gagal, mereka gagal untuk merancang. ***)



*) Soekarno

**) QS. Al- Insyirah: 5

***) William J. Siegel

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Deni Parmana

NIM : 110210103033

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah berjudul “Pengaruh Konsentrasi Hormon 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) Terhadap Induksi Kalus Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) Melalui Kultur *In Vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember,

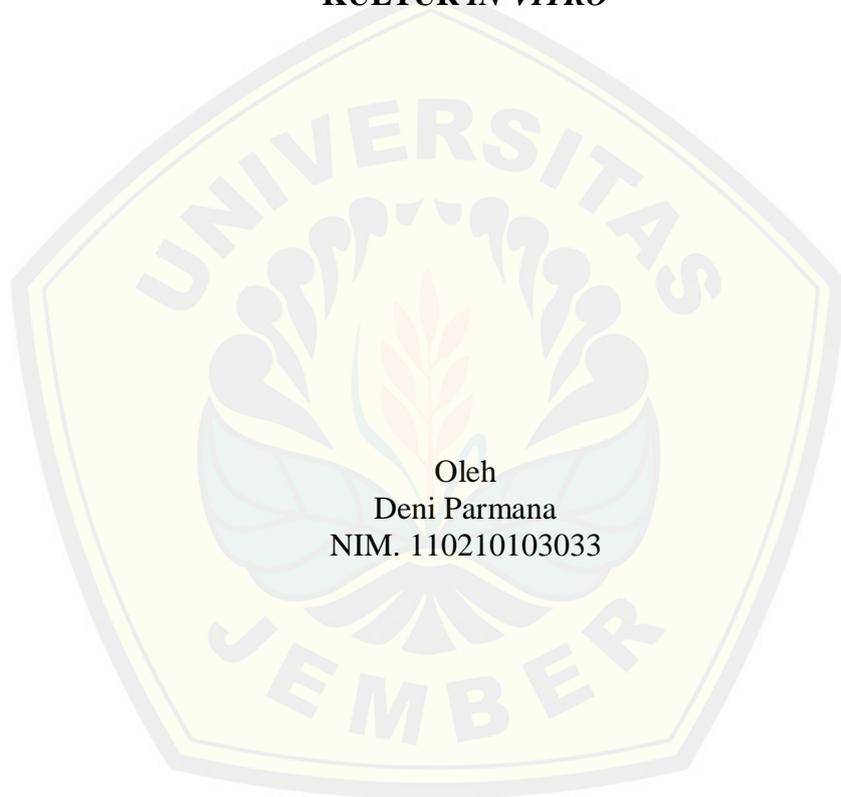
Yang menyatakan,

Deni Parmana

NIM 110210103033

SKRIPSI

**PENGARUH KONSENTRASI HORMON 2,4-D
(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) TERHADAP
INDUKSI KALUS DAUN TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L.) MELALUI
KULTUR *IN VITRO***



Oleh
Deni Parmana
NIM. 110210103033

Dipersiapkan dan disusun dibawah bimbingan :

Dosen Pembimbing Utama	: Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS. NIP. 196504261994031001
Dosen Pembimbing Anggota	: Dr. Iis Nur Asyiah, S.P., M.P. NIP. 197306142008012008

PERSETUJUAN

**PENGARUH KONSENTRASI HORMON 2,4-D
(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) TERHADAP
INDUKSI KALUS DAUN TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L.) MELALUI
KULTUR *IN VITRO***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan Strata Satu (S1) Program Studi Pendidikan Biologi dan mencapai gelar Sarjana Pendidikan

Oleh

Nama Mahasiswa : Deni Parmana
NIM : 110210103033
Jurusan : Pendidikan MIPA
Program Studi : Pendidikan Biologi
Angkatan Tahun : 2011
Daerah Asal : Mojokerto
Tempat, Tanggal Lahir : Pasuruan, 1 April 1993

Disetujui Oleh

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS.

NIP. 19650426 1994031 1 001

Dr. Iis Nur Asyiah, S.P., M.P.

NIP. 19730614 200801 2 008

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Pengaruh Konsentrasi Hormon 2,4-D (2,4-*Dichlorophenoxyacetic acid*) Terhadap Induksi Kalus Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) Melalui Kultur *In Vitro*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember pada:

Hari :

Tanggal :

Tempat : Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS.
NIP. 19650426 1994031 1001

Dr. Iis Nur Asyiah, S.P., M.P.
NIP. 19730614 200801 2 008

Anggota I,

Anggota II,

Dra. Pujiastuti, M.Si.
NIP. 19610222 198702 2 001

Mochammad Iqbal, S.Pd., M.Pd.
NIP. 19880120 201212 1 001

Mengesahkan :

Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Jember

Prof. Dr. Sunardi, M.Pd.
NIP. 19540501 198303 1 005

RINGKASAN

Pengaruh Konsentrasi Hormon 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) Terhadap Induksi Kalus Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) Melalui Kultur *In Vitro*; Deni Parmana; 110210103033; 2015; 59 Halaman; Program Studi Pendidikan Biologi, Jurusan Pendidikan Mipa, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember.

Tembakau merupakan tanaman perkebunan yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Tembakau cerutu atau dikenal dengan tembakau Deli merupakan tembakau primadona sebagai tembakau cerutu karena memiliki kualitas terbaik di dunia. Tembakau cerutu di Indonesia berpusat pada tiga areal yaitu di Deli (Sumatera Utara), Klaten (Jawa Tengah), dan Eks Karesiden Besuki (Jawa Timur). Tembakau yang dihasilkan merupakan tembakau untuk pengisi cerutu (*filler*), pembalut cerutu (*bladder*) dan pembungkus cerutu (*wrapper*). Penggunaan tembakau untuk pembuatan cerutu membutuhkan daun yang seragam dari segi aroma, kualitas, rasa, dan ukuran daunnya. Oleh karena itu diperlukan teknik pembudidayaan yang tepat agar diperoleh daun tembakau yang seragam dan berkualitas. Selama ini, pembudidayaan tanaman tembakau dilakukan secara konvensional, yaitu pembibitan melalui biji. Pembibitan melalui biji menghasilkan sifat-sifat genetik individu yang heterogen dan tidak sama persis dengan induknya. Salah satu alternatif pembudidayaan tembakau dalam jumlah besar dengan waktu yang relatif singkat, dan memperoleh keturunan yang sama persis dengan induknya, dapat dilakukan sewaktu-waktu dan tidak bergantung dengan musim adalah melalui teknik *in vitro* (kultur jaringan). Pembudidayaan secara *in vitro* juga menjadi alternatif yang tepat untuk memenuhi kebutuhan daun tembakau dalam skala besar dan cepat. Keberhasilan kultur jaringan tergantung dari beberapa faktor, salah satu faktor paling penting yaitu pemberian ZPT (Zat Pengatur Tumbuh) yang berfungsi untuk merangsang pertumbuhan. ZPT yang sering digunakan dalam kultur jaringan adalah jenis auksin dan sitokinin. Keseimbangan penggunaan ZPT pada tanaman dapat mengatur pertumbuhan tunas dan kalus baik secara langsung maupun secara tidak langsung. ZPT 2,4-D

merupakan salah satu ZPT yang digunakan untuk merangsang terjadinya proses kalogenesis dan embriogenesis baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Namun pengkajian tentang variasi konsentrasi 2,4-D untuk mengoptimalkan embriogenesis secara langsung untuk tanaman tembakau masih kurang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap induksi kalus daun tembakau dan untuk mengetahui konsentrasi optimal ZPT 2,4-D yang memberikan induksi kalus terbaik pada daun tanaman tembakau. Penelitian ini di laksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2014 sampai April 2015. Penelitian ini terdiri dari 2 tahap, yaitu Induksi kalus dan induksi tunas. Tahap pertama yakni tahap induksi kalus dengan satu faktor tunggal yaitu variasi konsentrasi 2,4-D dalam media MS yang terdiri dari 5 taraf konsentrasi, yaitu: 0 ppm; 0,5 ppm; 1,0 ppm; 1,5 ppm; 2,0 ppm dan masing-masing taraf konsentrasi terdiri dari 5 kali ulangan. Penelitian kemudian dilanjutkan pada tahap induksi tunas dengan pemberian 0,5 ppm BAP yang terdiri dari 5 kali ulangan.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan data dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA). Apabila terdapat perbedaan yang nyata di antara perlakuan-perlakuan tersebut, maka analisis akan dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ZPT 2,4-D terhadap induksi kalus tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). Sedangkan konsentrasi optimal ZPT 2,4-D yang memberikan pertumbuhan terbaik terhadap induksi kalus tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) adalah pada konsentrasi 1,5 ppm yaitu kalus berhasil terbentuk pada 24,4 hari.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul Pengaruh Konsentrasi Hormon 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) Terhadap Induksi Kalus Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) Melalui Kultur *In Vitro* sebagai tugas akhir di Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember untuk memenuhi persyaratan menyelesaikan pendidikan strata satu (S1).

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, M.S. selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, ilmu, perhatian, arahan, dan bimbingannya dalam menyelesaikan skripsi ini;
2. Dr. Iis Nur Asyiah, S.P., M.P. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, ilmu, perhatian, dan bimbingannya dalam menyelesaikan skripsi ini;
3. Dra. Pujiastuti, M.Si. selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan dalam menyelesaikan skripsi ini;
4. Mochammad Iqbal, S.Pd., M.Pd. selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan dalam menyelesaikan skripsi ini;
5. Prof. Dr. Joko Waluyo, M.Si. dan Drs. Slamet Hariyadi, M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama studi;
6. Prof. Dr. Suratno, M.Si. selaku ketua Program Studi Pendidikan Biologi;
7. Bapak dan Ibu Dosen Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu, serta membimbing selama perkuliahan;
8. Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember atas dana penelitian yang telah diberikan;
9. Teknisi Laboratorium Bapak Boedi Kriswanto, S.P. yang telah mengajari dan membantu selama mengerjakan penelitian di Laboratorium Kultur Jaringan;

10. Ibu ku Suntanah, Bapak ku Parmat yang telah berjuang, berkorban, selalu memberikan cinta dan kasih sayang, semangat, motivasi, perhatian serta doa kepada ku, juga adik tersayang Muhammad Dito Suro Pangestu;
11. Teman seperjuangan selama melakukan penelitian di Laboratorium Kultur Jaringan Hiqma Widya I.D, Ulya, Putri atas bantuan dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini;
12. Niko Putra Karunia yang selalu menemani dalam suka dan duka, memberikan bantuan, doa, semangat serta motivasi agar tidak putus asa dalam menyelesaikan skripsi ini;
13. Sahabat kosan tercinta Didin, Dwi, Ida terima kasih atas kekompakan, doa, kebersamaan, semangat, serta persahabatan selama ini;
14. Sahabat seperjuangan Arini, Febri, Rina, Winda, Nurul atas bantuan, semangat, kerjasama, serta persahabatan selama menyelesaikan perkuliahan di Universitas Jember;
15. Teman-teman Bionic 2011 Pendidikan Biologi Universitas Jember;
16. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulisan skripsi ini jauh dari sempurna sehingga penulis menerima kritik dan saran yang membangun. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PERSETUJUAN	vii
HALAMAN PENGESAHAN	viii
RINGKASAN	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Botani Tanaman Tembakau	6
2.2 Habitat Tanaman Tembakau	8
2.3 Karakteristik Tembakau TS3	9
2.4 Teknik <i>In Vitro</i> (Kultur Jaringan)	10
2.5 Somatik Embriogenesis	11
2.6 Induksi Kalus Primer	13

2.7 Zat Pengatur Tumbuh untuk Tanaman Tembakau	14
2.8 Hipotesis	20
BAB 3. METODE PENELITIAN	21
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.2 Variabel Penelitian	21
3.2.1 Variabel Bebas	21
3.2.2 Variabel Terikat	21
3.2.3 Variabel Kontrol	21
3.3 Definisi Operasional	21
3.3.1 2,4-D	21
3.3.2 BAP	21
3.3.3 Kalus	21
3.4 Alat dan Bahan	22
3.4.1 Alat Penelitian	22
3.4.2 Bahan Penelitian	22
3.5 Rancangan Penelitian	22
3.6 Pelaksanaan Penelitian	23
3.6.1 Sterilisasi Alat	23
3.6.2 Pembuatan Media dan Sterilisasi Media	23
3.6.3 Penanaman Eksplan pada Media	24
3.6.4 Pemeliharaan	24
3.7 Parameter Pengamatan	24
3.8 Skema Alur Penelitian	27
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Hasil Penelitian	28
4.1.1 Induksi Kalus	28
4.1.2 Induksi Tunas	33
4.2 Pembahasan	39
4.2.1 Induksi Kalus	39
4.2.2 Induksi Tunas	45

BAB 5. PENUTUP	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	60



DAFTAR TABEL

No.	Judul	Halaman
4.1	Nilai F-Hitung Pada Pengamatan Induksi Kalus Menggunakan 2,4-D .	29
4.2	Rata-Rata Hasil Analisis Uji DMRT (Duncan Multiple Range Test) Terhadap Induksi Kalus	29
4.3	Tabel Perbandingan Rata-Rata Persentase Terbentuknya Kalus Pada Perlakuan Konsentrasi Hormon 2,4-D Pada 3 MST dan 6 MST	31
4.4	Nilai F-Hitung Pada Pengamatan Induksi Tunas Menggunakan BAP ..	34
4.5	Rata-Rata Hasil Analisis Uji DMRT (Duncan Multiple Range Test) Terhadap Induksi Tunas	34
4.6	Tabel Struktur Kalus Pada Media 0,5 ppm BAP	37
4.7	Tabel Perbandingan Rata-Rata Persentase Terbentuknya Tunas Pada Perlakuan Konsentrasi Hormon 2,4-D Pada 4 MST dan 8 MST	38
4.8	Tabel Persentase Terbentuknya Akar Pada Perlakuan Konsentrasi Hormon 2,4-D pada 7 MST	39

DAFTAR GAMBAR

No.	Judul	Halaman
2.1	Morfologi Tanaman Tembakau	7
2.2	Morfologi Tembakau TS3	10
2.3	Embriogenesis Somatik	12
2.4	Struktur Kimia 2,4-D	16
2.5	Struktur Kimia BAP	18
3.1	Skema Alur Penelitian	28
4.1	Kalus yang Terbentuk Pada Permukaan Eksplan	30
4.2	Perbedaan warna kalus pada 7 MST dalam media 0,5 ppm BAP pada: a) Konsentrasi 0 ppm 2,4-D; b) Konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dengan angka 2,5 GY 8/6; c) Konsentrasi 1 ppm 2,4-D dengan angka 2,5 GY 6/6; d) Konsentrasi 1,5 ppm 2,4-D dengan angka 2,5 GY 7/8; e) Konsentrasi 2 ppm 2,4-D dengan angka 2,5 GY 5/6	33
4.3	Respon pembentukan tunas pada eksplan dalam media yang mengandung 0,5 ppm BAP pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D; a) 1 MST; b) 2 MST; c) 3 MST	35
4.4	Perbedaan jumlah tunas yang muncul pada kalus yang disubkultur kedalam media 0,5 ppm BAP pada: a) Konsentrasi 0 ppm 2,4-D; b) Konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D; c) Konsentrasi 1 ppm 2,4-D; d) Konsentrasi 1,5 ppm 2,4-D; e) Konsentrasi 2 ppm 2,4-D.	36
4.5	Jumlah daun pada tunas setelah disubkultur pada media 0,5 ppm BAP pada: a) Konsentrasi 0 ppm 2,4-D; b) Konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D; c) Konsentrasi 1 ppm 2,4-D	37
4.6	Pembentukan akar setelah 7 MST pada perlakuan: a) Konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dan b) Konsentrasi 1 ppm 2,4-D pada yang mengandung media 0,5 ppm BAP	39

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Judul	Halaman
A.	Matriks Penelitian	60
B.	Komposisi Media MS	61
C.	Analisis Kedinian Kalus	62
	C1. Data Pengamatan Kedinian Kalus	62
	C2. Sidik Ragam Kedinian Kalus	62
	C3. Uji Beda Duncan Kedinian Kalus	63
D.	Analisis Berat Basah Kalus	64
	D1. Data Pengamatan Berat Basah Kalus	64
	D2. Sidik Ragam Berat Basah Kalus	64
	D3. Uji Beda Duncan Berat Basah Kalus	65
E.	Persentase Terbentuknya Kalus	66
	E1. Tabel Persentase Terbentuknya Kalus 3 MST	66
	E2. Tabel Persentase Terbentuknya Kalus 6 MST	66
F.	Analisis Kedinian Tunas	67
	F1. Data Pengamatan Kedinian Tunas	67
	F2. Sidik Ragam Kedinian Tunas	67
	F3. Uji Beda Duncan Kedinian Tunas	68
G.	Analisis Jumlah Tunas	69
	G1. Data Pengamatan Jumlah Tunas	69
	G2. Sidik Ragam Jumlah Tunas	69
	G3. Uji Beda Duncan Jumlah Tunas	70
H.	Analisis Jumlah Daun	71
	H1. Data Pengamatan Jumlah Daun	71
	H2. Sidik Ragam Jumlah Daun	71
	H3. Uji Beda Duncan Jumlah Daun	72
I.	Analisis Tinggi Tunas	73
	I1. Data Pengamatan Tinggi Tunas	73

I2. Sidik Ragam Tinggi Tunas	73
I3. Uji Beda Duncan Tinggi Tunas	74
J. Persentase Terbentuknya Tunas	75
J1. Tabel Persentase Terbentuknya Tunas 4 MST	75
J2. Tabel Persentase Terbentuknya Tunas 8 MST	75
K. Persentase Eksplan Berakar	76
K1. Tabel Persentase Eksplan Berakar 8 MST	76



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tembakau termasuk dalam famili Solanaceae yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Tembakau adalah tanaman musiman yang tergolong tanaman perkebunan dan tersebar luas di seluruh Indonesia (Nisak, 2012). produksi tembakau cerutu banyak dikembangkan di daerah Deli (Sumatera Utara), Klaten (Jawa Tengah), dan Eks Karesiden Besuki (Jawa Timur). Dalam perkembangan selanjutnya, areal terluas penanaman tembakau cerutu (sekitar 80% dari total areal penanaman) berada di daerah Eks Karesiden Besuki, terutama di Kabupaten Jember (Djajadi, 2013). Tembakau mempunyai banyak manfaat seperti *chlorogenic acid* dan *rutin* yang terkandung di dalam daun tembakau berfungsi untuk menangkal radikal bebas, selain itu tembakau juga merupakan salah satu komoditi yang sangat penting terutama dalam sektor perekonomian. Keistimewaan dan manfaat yang besar dari tembakau menyebabkan kebutuhan tembakau di Indonesia meningkat (Nisak, 2012). Dalam penelitiannya, Fatmawati (2010) menjelaskan bahwa berdasarkan beberapa sumber menunjukkan cukai hasil tembakau merupakan salah satu sumber penerimaan terbesar negara dari dalam negeri yaitu sebesar 95%. Pada tahun 2000 sampai 2004 mengalami peningkatan sehingga pada tahun berikutnya pemerintah menargetkan penerimaan cukai rokok sebesar 98% dari total penerimaan cukai.

Tembakau adalah bahan baku utama dalam produksi rokok dan cerutu. Tembakau cerutu yang paling terkenal yaitu tembakau Deli. Di pasar internasional, tembakau Deli lebih dikenal sebagai tembakau sumatera. Tembakau Deli di PT. TN (Taru Tama Nusantara) dikenal sebagai TS3 atau Tipe Sumatra 3, sedangkan PTPN X memberi nama dengan Tembakau F1N (Suhara, 2009). Tembakau Deli menjadi primadona tembakau cerutu yang mempunyai kualitas terbaik di dunia (*world top quality*). Daun tembakau Deli memiliki ciri khas yaitu daun tipis dan elastis serta berwarna cerah (Silaban, 2013).

Produksi tembakau cerutu di Indonesia berpusat pada tiga areal, yaitu Deli (Sumatra Utara), Klaten (Jawa Tengah), dan Eks Karesiden Besuki (Jawa Timur). Seiring dengan berkembangnya penanaman tembakau cerutu, areal paling luas penanaman tembakau cerutu berada di daerah Eks Karesiden Besuki, terutama di Kabupaten Jember yaitu sekitar 80% dari total areal penanaman. Tembakau yang diproduksi oleh perkebunan di wilayah Jember dikenal sebagai tembakau Na-Oogst (NO) dengan mutu tinggi dan sangat disukai di pasar International yang merupakan salah satu tembakau terbaik dunia. Tembakau yang dihasilkan merupakan tembakau untuk pengisi cerutu (*filler*), pembalut cerutu (*bladder*) dan pembungkus cerutu (*wrapper*). Jenis tembakau cerutu yang dihasilkan adalah tembakau dengan mutu filler yang dibutuhkan oleh pasar Eropa. Mutu filler yang dihasilkan tersebut mempunyai sifat aromatik, elastisitas tinggi, dan rasa ringan (Djajadi, 2008).

Pembudidayaan tanaman tembakau secara konvensional yaitu dilakukan dengan cara menyemaikan biji, di mana untuk mendapatkan bibit yang seragam biji harus direndam di dalam air selama 2 hari dan diletakkan di tempat yang mendapatkan penyinaran dan aliran udara yang bagus (Fatmawati, 2010). Pembibitan melalui biji menghasilkan sifat-sifat genetik individu yang heterogen karena tembakau dapat melakukan penyerbukan secara silang, dan sifat-sifat genetik yang diturunkan tidak sama persis dengan induknya. Selain itu, tingkat pemasakan buah per individu tanaman tidak sama sehingga panen buah untuk dijadikan benih tidak dapat dilakukan secara serempak. Pembudidayaan tembakau secara konvensional tidak akan mampu memenuhi permintaan pasar akan daun tembakau yang setiap tahun semakin meningkat. Oleh karena itu dilakukan pembudidayaan tanaman tembakau melalui metode kultur jaringan bertujuan untuk memperoleh bibit tembakau dalam jumlah banyak dan seragam. Melalui kultur jaringan, tembakau dapat dibudidayakan dalam jumlah besar dengan waktu yang relatif singkat, serta diperoleh keturunan yang sama persis dengan induknya. Budidaya tanaman tembakau melalui kultur jaringan dapat dilakukan sewaktu-waktu karena tidak bergantung pada musim (Desriatin, 2010).

Pengembangbiakan secara *in vitro* (kultur jaringan) merupakan alternatif yang prospektif melengkapi pembiakan cara alami maupun cara buatan lainnya, terutama untuk kebutuhan skala besar dan cepat. Metode kultur jaringan banyak dimanfaatkan di bidang pertanian untuk pengadaan bibit secara massal, menciptakan bibit unggul yang toleran terhadap penyakit, kadar garam dan kekeringan, untuk produksi biomassa, produksi metabolit sekunder, dan untuk mendapatkan varian baru. Keberhasilan kultur jaringan tergantung dari beberapa faktor, meliputi faktor lingkungan dan faktor endogen dari eksplan. Faktor lingkungan meliputi kondisi media, zat pengatur tumbuh (ZPT), suhu, cahaya dan proporsi sukrosa. Faktor endogen meliputi kondisi eksplan seperti umur, keadaan fisiologis dan hormon, jenis organ dan ukuran eksplan (Suyitno, 2011).

Keberhasilan kultur jaringan ditentukan oleh faktor-faktor yang mempengaruhi, diantaranya adalah zat pengatur tumbuh (Nisak, 2012). Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan senyawa organik bukan hara, yaitu hormon tumbuhan yang dapat memacu pertumbuhan sel-sel atau jaringan tertentu dari sel-sel yang belum terdiferensiasi. Faktor penting dalam penggunaan ZPT adalah; jenis, konsentrasi dan urutan penggunaan ZPT serta lama waktu induksi tanaman pada media yang mengandung ZPT. Zat pengatur tumbuh jika digunakan dalam jumlah sedikit dapat merangsang dan mempercepat proses pertumbuhan tanaman, sedangkan dalam jumlah banyak dapat menghambat pertumbuhan bahkan mematikan tanaman. Ada beberapa jenis ZPT yaitu; auksin, giberelin, sitokinin, dan adenin, namun yang paling sering digunakan adalah auksin dan sitokinin (Fitri, 2012).

Keseimbangan penggunaan ZPT, yaitu auksin dan sitokinin pada tanaman dapat mengatur pertumbuhan tunas dan kalus pada kultur *in vitro* baik secara langsung dan tidak langsung. Berdasarkan penelitian Malik (2003), medium dengan penambahan 3,5 mg/L 2,4-D merupakan konsentrasi optimum yang digunakan untuk menginduksi kalus *Triticum aestivum* L. melalui kultur biji. Konsentrasi 2,4-D antara 1 – 5 mg/L baik untuk induksi kalus pada *Saccharum officinarum* L. dan konsentrasi paling optimal dalam induksi kalus adalah pada konsentrasi 3 mg/L. Hal tersebut juga dibuktikan pada penelitian lain yang

menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D sebesar 3 mg/L mampu menginduksi kalus secara maksimal (Smiullah, 2013).

Menurut Mustafa (2012), penggunaan hormon *2,4-Dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D) sangat tepat digunakan untuk merangsang terjadinya proses kalogenesis dan embriogenesis baik secara langsung dan tidak langsung. Embriogenesis secara langsung (*direct somatic embryogenesis*) adalah pembentukan embrio secara langsung tanpa melalui pembentukan kalus, sedangkan embriogenesis secara tidak langsung (*indirect somatic embryogenesis*) adalah pembentukan embrio yang diawali dari pembentukan kalus (Ibrahim, 2013). Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya pada tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) serta kultur jantung pisang curup menunjukkan bahwa dengan penggunaan ZPT khususnya 2,4-D dalam kultur jaringan lebih menekankan pada induksi kalus. Belum ada penelitian yang menggunakan 2,4-D pada tanaman tembakau untuk mengetahui embriogenesis secara langsung. Oleh karena itu perlu dikaji penggunaan konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D yang paling efektif untuk merangsang terjadinya embriogenesis pada tanaman tembakau.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijabarkan diatas, maka dapat dirumuskan beberapa masalah diantaranya adalah :

1. Adakah pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau (*Nicotiana tabacum* L.)?
2. Berapakah konsentrasi optimal zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau (*Nicotiana tabacum* L.)?

1.3 Batasan Masalah

Untuk mempermudah pembahasan dan mengurangi kerancuan dalam menafsirkan masalah yang terkandung dalam penelitian ini maka permasalahan yang dibahas dibatasi dalam :

1. Tembakau yang digunakan dalam penelitian ini adalah tembakau varietas TS3 (Tembakau Deli).
2. Eksplan yang diambil berasal dari daun tembakau steril hasil dari teknik *in vitro*.
3. Media dasar yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS (*Murashige and Skoog*).
4. Pengamatan dilakukan sampai terbentuknya tunas pada eksplan yang ditanam dalam media.
5. Konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D menggunakan 5 taraf perlakuan 0 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, dan 2 ppm.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang akan diteliti, tujuan yang ingin dicapai diantaranya adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau (*Nicotiana tabacum* L.).
2. Mengetahui konsentrasi optimal zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau (*Nicotiana tabacum* L.).

1.5 Manfaat Penelitian

Setelah dilakukan penelitian ini diharapkan dapat membawa manfaat, diantaranya adalah :

1. Bagi ilmu pengetahuan, dapat menambah wawasan keilmuan dan pengetahuan tentang pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau (*Nicotiana tabacum* L.).
2. Bagi peneliti lain, dapat digunakan sebagai bahan perbandingan dan acuan untuk penelitian sejenis.
3. Bagi perusahaan pemangku kepentingan, dapat dijadikan sebagai sarana untuk memperbanyak koleksi tanaman tembakau yang seragam dalam waktu yang relatif singkat.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Botani Tanaman Tembakau

Tanaman tembakau termasuk famili solanaceae. Adapun klasifikasi tanaman tembakau adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Sub kingdom : Tracheobionta

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Asteridae

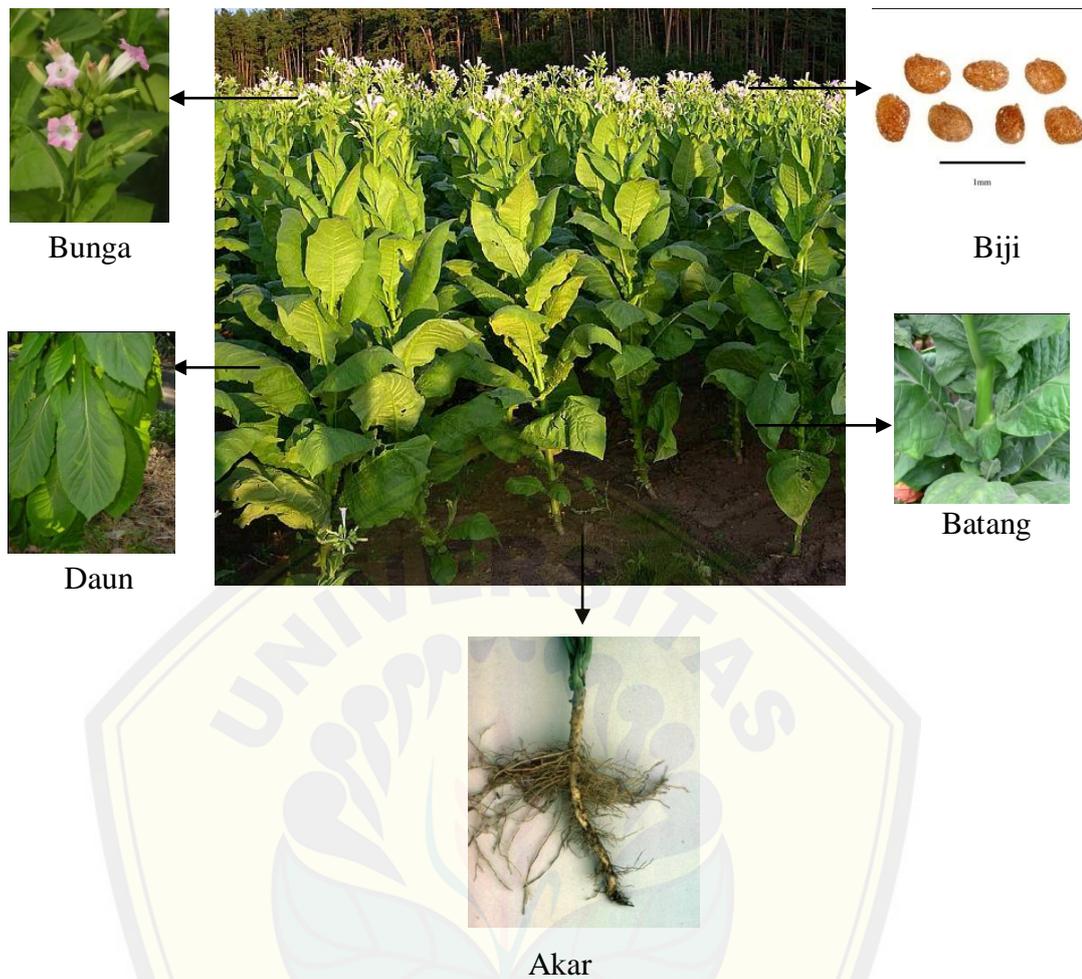
Ordo : Solanales

Famili : Solanaceae

Genus : Nicotiana

Spesies : *Nicotiana tabacum* L. (Plantamor, 2014)

Di Indonesia tanaman tembakau dikenal dengan sebutan Tembakau, Mbako (Jawa), Bako (Sunda), terlihat pada Gambar 2.1. Tembakau berasal dari Benua Amerika, khususnya Amerika Utara dan Amerika Selatan. Penggunaan tembakau berasal dari bangsa Indian, berkaitan dengan upacara-upacara keagamaan mereka. Pada tahun 1556 tanaman tembakau mulai diperkenalkan di Benua Eropa. Kemudian tanaman tembakau menyebar dengan sangat cepat di seluruh Eropa, Afrika, Asia dan Australia (Matnawi, 1997).



Gambar 2.1 Morfologi Tanaman Tembakau
(Sumber : www.forestryimages.org, 2014)

Morfologi tanaman tembakau yaitu :

a. Akar

Tanaman tembakau memiliki akar tunggang. Akar yang dimiliki tembakau yang hidup subur dapat mencapai panjang 0,75 m. Selain akar tunggang, tembakau juga mempunyai akar-akar serabut dan bulu-bulu akar. Pertumbuhan akar tembakau ada yang lurus, berlekuk, baik pada akar tunggang maupun pada akar serabut. Banyak sedikitnya akar yang dimiliki tanaman tembakau tergantung dari beberapa faktor, antara lain; jenis tanah, kesuburan tanah. Akar tanaman tembakau kurang tahan terhadap adanya air berlebihan. Air yang selalu menggenang atau sering menggenang akan berpengaruh terhadap aerasi sehingga

menyebabkan pertumbuhan akar terganggu dan berakibat pada terhambatnya pertumbuhan tanaman bahkan tanaman dapat mati (Matnawi, 1997).

b. Batang

Pada pertumbuhan normal, batang tembakau tumbuh tegak dengan bantuan ajir (lanjaran). Batang tembakau ada yang bercabang, meskipun kebanyakan tidak bercabang. Terbentuknya cabang pada batang tembakau karena adanya titik tumbuh yang terputus sehingga merangsang pertumbuhan tunas-tunas baru. Tinggi rata-rata batang tembakau bukan naungan adalah 1,75 m, sedangkan tinggi rata-rata tembakau naungan adalah 4 m (Matnawi, 1997).

c. Daun

Bentuk daun tembakau sangat bervariasi, tergantung varietasnya. Daun tembakau ada yang berbentuk ovalis, oblongus, orbicularis, dan ovatus. Daun tersebut mempunyai tangkai yang menempel langsung pada bagian batang. Jumlah daun yang dimanfaatkan setiap batangnya dapat mencapai 32 helai daun. Ukuran (besar kecilnya) daun dan tebal tipisnya juga berbeda-beda, tergantung jenis daun, varietas yang ditanam, kesuburan tanah, dan pengelolaan (Matnawi, 1997).

d. Bunga dan Buah

Bunga tembakau termasuk bunga majemuk yang berbentuk seperti terompet. Memiliki benangsari berjumlah lima buah. Warna bunga dalam satu malai ada yang kemerah-merahan dan putih. Bakal buah terdapat pada bagian dasar bunga. Biji tanaman tembakau berukuran sangat kecil dan berjumlah sangat banyak yakni mencapai ribuan perbatang (Matnawi, 1997).

2.2 Habitat Tanaman Tembakau

Setiap jenis tembakau menghendaki jenis tanah yang berbeda. Tembakau cerutu dataran rendah seperti tembakau deli menghendaki tanah yang banyak mengandung humus. Tembakau deli tumbuh baik pada ketinggian 12 – 150 m dpl. Jenis tanah yang cocok yaitu andosol atau inceptisol berkadar humus tinggi, dengan kisaran pH 5,5 – 6,5. Selama pertumbuhan tembakau deli membutuhkan drainase yang baik dan cukup air. Tanaman ini menggunakan jarak tanam sistem

double row, dengan jarak tanam 45 x 50 x 100 cm. Suhu optimum 18 – 27⁰C, menghendaki curah hujan rendah pada saat tanam dan curah hujan tinggi saat panen. Curah hujan yang diperlukan berkisar antara 1.500 mm – 2.000 mm setiap tahunnya. Ketersediaan air dan penyinaran cahaya matahari akan mempengaruhi pertumbuhan dan produksi tanaman tembakau. Kurangnya penyinaran matahari menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan produksi.

2.3 Karakteristik Tembakau TS3

Tembakau TS3 merupakan nama lain dari tembakau Deli. PT. TTN menyebut TS3 atau Tipe Sumatra 3, sedangkan PTPN X memberi nama dengan Tembakau F1N. Tembakau Deli menjadi primadona tembakau cerutu, dan digunakan sebagai pembungkus cerutu nomor satu di dunia. Tembakau Deli dibudidayakan di dataran rendah. Tembakau Deli yang saat ini dibudidayakan adalah D-4 atau biasa disebut TS4, F15 dan KF-7 (Suhara, 2009).

Tembakau Deli dapat dibedakan atas kualitasnya karena tembakau ini digunakan sebagai *wrapper*, yaitu mempunyai keistimewaan ciri, rasa dan aroma khas yang tidak dapat digantikan posisinya dengan tembakau jenis lain. Karakteristik tanaman serta morfologi tembakau Deli pada Gambar 2.2, yaitu berhabitus piramid dengan tinggi batang dapat mencapai 2,6 – 4 meter. Batang berbentuk bulat dengan diameter 2 – 3,5 cm dan mempunyai ruas sepanjang 7 – 12 cm. Tembakau TS3 memiliki daun yang berbentuk oval, pada bagian ujung daun runcing, bagian tepi daun berombak, dan memiliki filotaksis 3/8 kanan. Jumlah daun dalam satu pohon dapat mencapai 30 lembar. Karakteristik perbungaan tembakau TS3 secara umum tidak jauh berbeda dengan tembakau besuki, yakni bunga berbentuk terompet dan berwarna merah muda (Litbang PTPN X, 2003).



Gambar 2.2 Morfologi Tembakau TS3
(Sumber : Litbang PTPN X, 2003)

2.4 Teknik *In Vitro* (Kultur Jaringan)

Kultur jaringan adalah suatu upaya mengisolasi bagian-bagian tanaman (protoplas, sel, jaringan, dan organ), kemudian mengkulturkannya pada nutrisi buatan yang steril di bawah kondisi lingkungan terkendali sehingga bagian-bagian tanaman tersebut dapat beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali. Teknik kultur jaringan dilakukan berdasarkan sifat totipotensi sel. Totipotensi sel yaitu suatu konsep yang menyatakan bahwa setiap sel hidup memiliki potensi genetik untuk menghasilkan organisme lengkap (Zulkarnain, 2009).

Kultur jaringan meliputi penanaman sel atau agregat sel, jaringan, dan organ tanaman pada medium yang mengandung gula, vitamin, asam-asam amino, garam-garam anorganik, air, zat pengatur tumbuh, dan bahan pematat. Medium yang umum digunakan dalam kultur jaringan adalah media Murashige and Skoog (MS). Keistimewaan media MS adalah kandungan nitrat, kalium, dan amoniumnya tinggi. Media MS maupun medium B5 mengandung jumlah hara anorganik yang layak untuk memnuhi kebutuhan banyak jenis sel tanaman dalam kultur (Wetter, 1991). Tipe kultur dalam teknik kultur jaringan berdasarkan macam eksplan yang digunakan dikenal dengan beberapa tipe kultur, seperti kultur organ (biji, meristem, nodus tunggal, potongan daun, akar, serta tunas), kultur kalus, kultur sel, dan kultur protoplas (Zulkarnain, 2009).

Di dalam teknik kultur jaringan, zat pengatur tumbuh sangat nyata pengaruhnya (Zulkarnain, 2009). Kultur jaringan tanaman terdiri dari sejumlah teknik untuk menumbuhkan organ, jaringan dan sel tanaman. Jaringan dapat dikulturkan pada agar padat atau ditanam dalam medium hara cair. Jika ditanam dalam agar, jaringan akan membentuk kalus, yaitu massa atau sel-sel yang tidak tertata. Kultur dimulai dengan penanaman satu iris jaringan steril pada medium hara yang dipadatkan dengan agar. Dalam waktu 2 – 3 minggu akan terbentuk kalus. Waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan kalus dan kultur suspensi sel amat beragam dan bergantung pada jaringan eksplan serta komposisi medium kultur yang digunakan (Wetter, 1991).

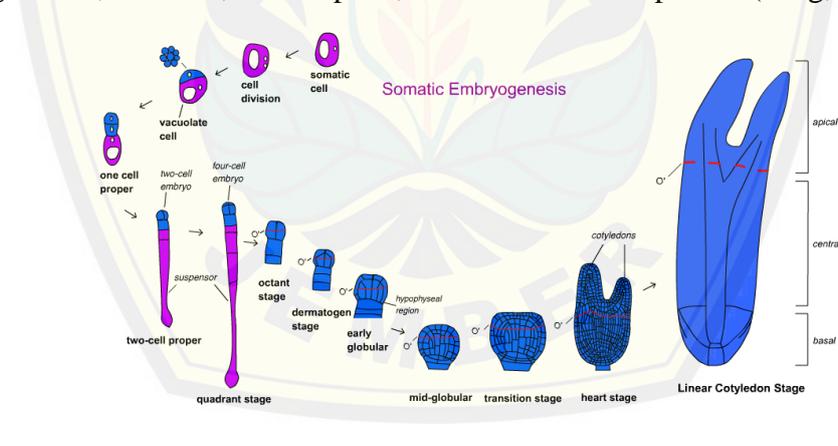
2.5 Somatik Embriogenesis

Somatik embriogenesis adalah proses dimana sel-sel somatik berkembang menjadi embrio melalui tahap-tahap morfologi yang khas tanpa melalui fusi gamet (Arimarsetyowati, 2012). Eksplan pada metode ini akan membentuk embrioid (bentuk-bentuk serupa embrio), dan tidak menjadi akar atau tunas. Embrio somatik yang berasal dari kultur sel, jaringan, atau organ dapat terbentuk secara langsung atau tidak langsung. Embrio somatik secara langsung yaitu pembentukan embrio tanpa melalui pembentukan kalus. Eksplan tersebut dikatakan mempunyai *Preembryonically determined cells* (PEDC), sedangkan embrio somatik secara tidak langsung adalah pembentukan embrio melalui fase kalus. Embrio somatik yang terbentuk dikatakan muncul dari *Induced embryocally determined cells* (IEDC) (Purba, 2009).

Keberhasilan embriogenesis somatik dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah jenis eksplan, genotipe tanaman donor, kondisi fisiologis tanaman donor, jenis dan kondisi fisik medium, lingkungan kultur, dan zat pengatur tumbuh. Pada tahap induksi kalus embriogenik dibutuhkan media yang mengandung auksin dengan konsentrasi tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 2,4-D merupakan auksin yang efektif untuk induksi kalus embriogenik pada beberapa tanaman jarak pagar dan pada beberapa tanaman lain seperti tebu, kopi arabika dan tanaman kurma (Anggraeni, 2012).

Penggunaan eksplan yang bersifat meristematik dapat menghasilkan embrio somatik yang lebih tinggi, karena jaringan meristem yang memiliki pertumbuhan paling cepat berada pada tahap awal pertumbuhan sehingga sangat baik digunakan sebagai eksplan dalam kultur jaringan. Selain itu penggunaan jaringan tanaman yang masih muda memiliki daya agregasi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan jaringan tua, karena sel-selnya masih aktif membelah dan relatif mengandung sedikit kontaminan (Anggraeni, 2012).

Embrio somatik dicirikan dari strukturnya yang bipolar (mempunyai dua calon meristem), yaitu meristem akar dan meristem tunas. Dengan memiliki struktur tersebut maka perbanyakkan melalui embrio somatik lebih menguntungkan daripada pembentukan tunas adventif yang unipolar karena embrio akan mudah berkembang menjadi individu yang lengkap sehingga mudah untuk beradaptasi. Di samping strukturnya, tahap perkembangan embrio somatik menyerupai embrio zigot (Gaj, 2001). Tahap perkembangan embrio somatik Gambar 2.3 dimulai dari fase globular, fase hati, fase torpedo, fase kotiledon dan planlet (Fang, 2009).



Gambar 2.3 Somatik Embriogenesis
(Sumber : plantandsoil.unl.edu, 2015)

Regenerasi tanaman dengan teknik kultur jaringan dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik. Perbanyakkan tanaman dengan menggunakan teknik kultur jaringan melalui jalur embriogenesis somatik lebih menguntungkan dibandingkan melalui organogenesis karena dapat menghasilkan tanaman baru dengan jumlah yang lebih banyak. Selain itu, karena embrio

somatik berasal dari sel tunggal maka akan lebih mudah untuk memonitor proses pertumbuhan setiap individu tanaman. Embriogenesis somatik juga merupakan jalur yang efisien untuk penelitian yang melibatkan produksi tanaman yang ditransformasikan secara genetik (Ibrahim, 2010). Keuntungan dari teknik tersebut adalah embrio-embrio somatik yang dihasilkan memiliki sifat bipolar, yakni memiliki ujung-ujung akar dan pucuk yang diperlukan bagi pertumbuhan tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009).

Respon organogenesis eksplan secara *in vitro* terjadi dengan dua cara yaitu secara langsung dan tidak langsung. Organogenesis secara langsung ditunjukkan dengan munculnya organ secara langsung dari potongan tanaman utuh tanpa melalui terbentuknya kalus. Sedangkan organogenesis secara tidak langsung terjadi melalui terbentuknya kalus terlebih dahulu, kemudian kalus akan berdiferensiasi membentuk organ yang spesifik (Fatmawati, 2010).

2.6 Induksi Kalus Primer

Kalus merupakan proliferasi massa sel yang belum terdiferensiasi, yang diperoleh dari teknik kultur jaringan dengan tambahan nutrisi, dan hormon tertentu yang dapat menunjang pertumbuhan yang ditambahkan ke dalam media kultur. Kalus terbentuk lima hari setelah massa kultur dan dapat bertahan sampai empat minggu (Malik, 2003). Pembentukan kalus dari jaringan eksplan yang dikulturkan melalui kultur *in vitro* melibatkan perkembangan sel yang berlangsung secara acak dan tidak merata, di samping keterlibatan sel-sel yang belum terspesialisasi dan hilangnya struktur sel-sel terorganisasi. Pembentukan kalus pada permukaan eksplan melalui tiga tahap, yaitu induksi, pembelahan sel, dan diferensiasi sel. Kalus yang terbentuk pada eksplan disebabkan sel-sel yang kontak dengan medium terdorong menjadi meristematik. Sel tersebut kemudian akan membelah dan memperbanyak diri, namun tidak berdiferensiasi, sehingga tidak terorganisir dan menjadi seperti jaringan penutup luka (Zulkarnain, 2011).

Pembentukan kalus terjadi karena adanya pelukaan yang diberikan pada eksplan, eksplan tersebut akan memperbaiki sel-sel yang rusak tersebut. Dinding sel akan mengalami pembentangan dan terjadi penyerapan air, sehingga sel akan

membengkak dan memicu sel tersebut untuk membelah sehingga akan membentuk kalus (Sitorus, 2011). Sebelum terbentuk kalus, eksplan mengalami perubahan fisik. Pada awalnya eksplan berbentuk lurus akan berubah menjadi bengkok dan membesar serta berwarna lebih merah dibandingkan dengan sebelum eksplan dikulturkan (Arianto, 2013). Kalus kemudian akan terbentuk pada bagian pinggir eksplan yang bersentuhan langsung dengan media. Kalus yang terbentuk akan terus berkembang sampai menutupi seluruh permukaan eksplan.

Kalus embriogenik ditandai dengan struktur kalus kering, berwarna putih susu, mengkilat, dan remah (mudah dipisahkan), sedangkan kalus non embriogenik berwarna bening kecoklatan, struktur kalus kompak sehingga sulit dipisahkan, dan basah. Kalus yang mempunyai struktur kompak diindikasikan sebagai kalus yang tidak embriogenik (*non friable*). Kalus embriogenik mempunyai kemampuan lebih tinggi untuk membentuk organ (tunas, daun, dan akar) daripada kalus yang non embriogenik (Sukmadjaja, 2011). Sujatmiko (2012), juga menambahkan bahwa pada umumnya kalus embriogenik ditandai dengan bentuknya yang *friable*, tidak berair, memiliki *green spot* dan berwarna kehijauan. Sedangkan kalus non embriogenik adalah kalus yang sulit untuk diregenerasikan dengan tanda-tanda berair, berwarna kuning pucat, dan tidak memiliki struktur globular. Oleh karena itu, kalus yang baik untuk membentuk organ spesifik adalah kalus embriogenik.

Warna kalus yang terbentuk dari eksplan terdiri dari warna putih, putih kehijauan, hijau, dan coklat. Warna kalus putih karena jaringan parenkim yang mengandung butiran pati yang merupakan polisakarida simpanan pada tumbuhan. Kalus yang berwarna hijau mengandung klorofil, dan kalus yang berwarna coklat karena kalus tersebut menghasilkan senyawa fenol akibat dari respon pelukaan (Desriatin, 2010).

2.7 Zat Pengatur Tumbuh untuk Tanaman Tembakau

Zat pengatur tumbuh yang umum digunakan dalam kultur jaringan adalah sitokinin dan auksin. Peran auksin dan sitokinin sangat nyata dalam pengaturan pembelahan sel, pemanjangan sel, diferensiasi sel, dan pembentukan organ.

Sitokinin adalah senyawa yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sama halnya dengan kinetin (*6-furfurylaminopurine*).

Auksin adalah sekelompok senyawa yang berfungsi merangsang pemanjangan sel-sel pucuk yang spektrum aktivitasnya menyerupai IAA (*Indole-3 acetic acid*). Secara umum, auksin dapat meningkatkan pemanjangan sel, pembelahan sel, dan pembentukan akar adventif. Auksin berpengaruh pula untuk menghambat pembentukan tunas adventif dan tunas aksilar, tetapi kehadirannya dalam medium kultur dibutuhkan untuk meningkatkan embriogenesis somatik pada kultur suspensi sel. Konsentrasi auksin yang rendah akan meningkatkan pembentukan akar adventif, sedangkan auksin konsentrasi tinggi akan merangsang pembentukan kalus dan menekan morfogenesis (Zulkarnain, 2009).

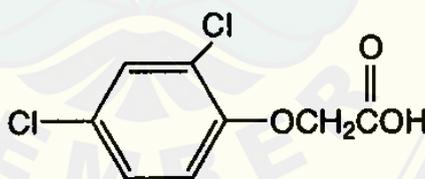
Auksin mendorong pembelahan sel dengan cara mempengaruhi dinding sel. Adanya induksi auksin dapat mengaktifasi pompa proton yang terletak pada membran plasma sehingga menyebabkan pH pada bagian dinding sel lebih rendah, yaitu mendekati pH pada membran plasma sekitar pH 4,5. Pompa proton yang sudah aktif tersebut dapat memutuskan ikatan hidrogen diantara serat selulosa dinding sel sehingga menyebabkan dinding sel mudah merenggang akibatnya tekanan dinding sel akan menurun dan dengan demikian terjadilah pelenturan sel. pH rendah ini juga dapat mengaktifasi enzim tertentu pada dinding sel yang dapat mendegradasi bermacam-macam protein pada dinding sel yang lunak dan lentur sehingga pemanjangan, pembesaran dan pembelahan sel dapat terjadi (Purmitasari, 2012).

Auksin yang paling banyak digunakan pada kultur *in vitro* adalah IAA (*indole-3 acetic acid*), α -NAA (*α -naphthalenacetic acid*), dan 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*). 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) merupakan auksin sintetik yang digunakan untuk merangsang regenerasi sel. Kombinasi antara 2,4-D dengan sitokinin lebih tepat digunakan sebagai induksi kalus. Sifat genetik tanaman mempengaruhi inisiasi kalus serta konsentrasi yang dibutuhkan untuk pembentukan kalus tersebut. Pemakaian 2,4-D dengan konsentrasi tinggi menghambat poliferasi kalus dan dalam konsentrasi rendah merangsang terjadinya

morfogenesis. Induksi kalus yang optimal diperoleh melalui manipulasi konsentrasi dan durasi sebagai akibat dari perbedaan genotip dan respon terhadap hormon tersebut (Malik, 2003).

Menurut Zulkarnain (2009), pemberian 2,4-D pada konsentrasi 10^{-7} – 10^{-5} M tanpa sitokinin sangat efektif untuk induksi proliferasi kalus pada kebanyakan kultur. Senyawa tersebut dapat menekan organogenesis dan sebaiknya tidak digunakan pada kultur yang melibatkan inisiasi pucuk dan akar. Pembatasan penggunaan 2,4-D pada kultur *in vitro* juga merupakan hal yang penting karena 2,4-D dapat meningkatkan peluang terjadinya mutasi genetik dan menghambat fotosintesis pada tanaman yang diregenerasikan.

Zat pengatur tumbuh (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) mengandung bahan aktif 2,4 D serta unsur makro (N, P dan K) dan unsur mikro (Mg, Mn, S, Zn dan Cu). Berdasarkan hasil Uji Nitrogen yang dilakukan di Balai Riset dan Standardisasi Industri Surabaya, konsentrasi Nitrogen dalam zat pengatur tumbuh (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) adalah 8,9 mg/ml. Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D sebagai salah satu zat pengatur tumbuh golongan auksin sintetik yang memiliki fungsi merangsang pembelahan dan perbesaran sel pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Struktur Kimia 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*)

(Sumber : ipmworld.umu.edu/chapterswareherb2,4-D, 2014)

Menurut Sujatmiko (2012), pada umumnya zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk menginduksi kalus adalah golongan auksin terutama 2,4-D. Hal tersebut berdasarkan penelitian yang sudah ada. Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa penambahan 1 mg/L 2,4-D pada media menghasilkan kalus melon hingga 44,3% menggunakan eksplan berupa biji muda. Pada penelitian

yang lain kombinasi antara 0,25 mg/L 2,4-D dengan 0,25 mg/L BAP dapat menginduksi kalus sampai dengan 62,5% menggunakan eksplan berupa kotiledon.

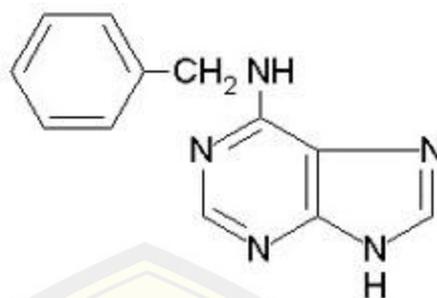
Wetter (1991), juga menjelaskan bahwa senyawa yang sering digunakan untuk induksi kalus adalah 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) dan NAA (*Naphthalenacetic acid*). Senyawa tersebut digunakan pada kadar 0,1 – 50 μM . Zat pengatur tumbuh 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) dan NAA (*Naphthalenacetic acid*) sangat lambat diuraikan oleh tumbuhan, dan stabil pada pemanasan dengan autoklaf. Sitokinin seperti kinetin atau benziladenin (0,1 – 10 μM) dibutuhkan bersama 2,4-D atau NAA untuk mendapatkan pembentukan kalus yang baik.

Sitokinin merupakan hormon tumbuh yang penting sebagai pemacu pertumbuhan dan morfogenesis. Dalam kultur jaringan, sitokinin berperan sebagai perangsang pembelahan sel atau sitokinesis dan penginduksi pembentukan tunas. Salah satu sitokinin sintetik yang mempunyai aktivitas dalam memacu pembelahan sel dalam kultur jaringan adalah BAP (*6-Benzil Amino Purine*). BAP (*6-Benzyl Amino Purine*) sering digunakan dalam teknik *in vitro* karena lebih stabil, tidak mahal, mudah tersedia, bisa disterilisasi, dan efektif. Struktur kimia BAP ditunjukkan pada Gambar 2.5 (Khumaida, 2013).

Di dalam kultur jaringan, BAP memicu terjadinya pembelahan dan diferensiasi sel seperti halnya fungsi sitokinin pada umumnya. Mekanisme kerja BAP sama dengan mekanisme kerja sitokinin alami pada tumbuhan. BAP yang terdapat di dalam media kultur jaringan akan diserap oleh eksplan kemudian BAP akan mencari jaringan target dengan bergerak naik dalam getah xilem. BAP akan terus mendorong kebagian ujung dengan menghambat pembentukan akar, kemudian akan menekan terjadinya regenerasi sel-sel baru di bagian ujung dan membentuk struktur pertunasan (Campbell, 2005).

Penggunaan BAP dalam media kultur jaringan akan memberikan pengaruh interaksi terhadap diferensiasi jaringan dalam kultur jaringan tanaman. Salah satunya adalah peristiwa pembentukan organ (*organogenesis*) yang dapat terjadi baik secara langsung (*direct*) maupun tidak langsung (*indirect*). *Direct organogenesis* merupakan peristiwa pembentukan organ tanpa melalui peristiwa

callogenesis (pembentukan kalus), sedangkan *indirect* organogenesis adalah pembentukan organ yang didahului dengan pembentukan kalus (*callogenesis*) (Hartanti, 2012).



Gambar 2.5 Struktur Kimia BAP (6-Benzil Amino Purine)

(Sumber : www.phytotechlab.com, 2015)

Penelitian yang dilakukan oleh Fatmawati (2010), dengan menggunakan zat pengatur tumbuh BAP dan IAA terhadap tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) Var. Parancak 95 menunjukkan bahwa organogenesis yang terjadi secara tidak langsung, yaitu melalui pembentukan kalus. Interaksi antara BAP dan IAA yang menghasilkan tunas paling banyak adalah kombinasi 0,5 ppm IAA dan 2 ppm BAP dengan rata-rata jumlah tunas yang dihasilkan adalah 34 tunas/eksplan. Hasil yang diperoleh juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hendaryono (1994) bahwa rasio perbandingan auksin dan sitokinin untuk multiplikasi tunas adalah 1 : 4.

Penelitian Yuniastuti (2010), dengan menggunakan medium N2 serta penambahan 4 ppm BAP dapat menghasilkan jumlah tunas Anthurium terbanyak dan terpanjang. Pemberian 0,5 ppm BAP dan 1,5 ppm BAP pada media MS untuk induksi tunas pada eksplan ubi jalar menghasilkan jumlah tunas terbanyak (Khumaida, 2013). Kombinasi BAP 1 ppm dan IAA 1 ppm merupakan konsentrasi yang tepat untuk menginduksi tunas tanaman krisan dengan jumlah tunas terbanyak. Keseimbangan antara BAP dan IAA sangat penting dalam menginduksi tunas karena masing-masing zat pengatur tumbuh tersebut mempunyai peranan dalam menginduksi tunas (Maryani, 2005).

Menurut Wulandari (2013), konsentrasi BAP paling baik untuk multiplikasi tunas eksplan buah naga BAP 3 ppm dengan rerata jumlah tunas 5,38 buah per eksplan dan rerata tinggi tunas 1,68 cm. Konsentrasi 0,4 mg/l BAP dan 0,2 mg/l 2,4-D merupakan kombinasi yang seimbang dan efektif untuk menginduksi regenerasi tunas pada *Phalaenopsis* (Rianawati, 2009). Penggunaan hormon 2,4-D yang dikombinasikan dengan BAP terhadap tanaman strawberry menunjukkan bahwa hasil induksi kalus maksimal terjadi pada kombinasi antara 2 – 4 mg/L 2,4-D dan 0,5 – 1 mg/L BAP dengan penambahan 50 g/L sukrosa (Omar, 2013).

Konsentrasi BAP 10 μ M sampai 50 μ M merupakan konsentrasi maksimal untuk menginduksi tunas pada eksplan *Paphiopedilum callosum* (Wattanawikkit, 2011). Kombinasi auksin IBA 0,1 mg/l dan sitokinin BAP 0,05 mg/l dan IBA 0 mg/l dan sitokinin BAP 0,03 mg/l merupakan konsentrasi paling optimal dalam peningkatan tinggi, jumlah ruas, dan jumlah tunas gaharu pada minggu ke-8 dengan pertambahan tinggi rata-rata sebesar 1,7000 cm dan jumlah ruas rata-rata sebesar 6,4000 ruas, serta rata-rata tunas sebesar 1,9091 (Mulyono, 2010).

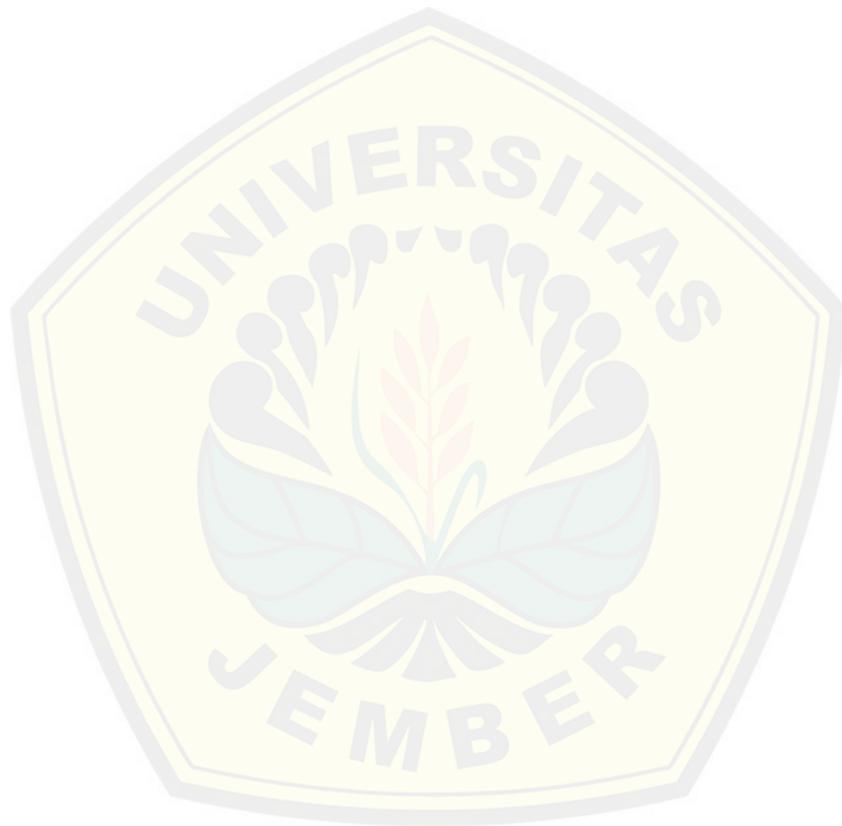
Media multiplikasi untuk mendapatkan tunas tertinggi pisang Mas Kirana dengan konsentrasi ZPT BAP 4 ppm. Jumlah planlet vigor tertinggi pada media morfogenesis (MS0) dicapai oleh tunas yang berasal dari multiplikasi pada media MS + BAP 4 ppm (Kasutjaningati, 2013). Pertumbuhan eksplan embrio dari biji galur mutan jarak pagar paling baik pada media MS dengan penambahan 3 mg/L BAP dan 0,5 mg/L IAA dengan tinggi 2,33 cm. Sedangkan jumlah pucuk dan daun yang paling banyak adalah dengan menggunakan media MS dengan 5 mg/L BAP dan 0,5 mg /L IAA yaitu 4,6 dan 3,89 (Rahayu, 2013).

Hendaryono (1994) menjelaskan bahwa apabila konsentrasi auksin lebih tinggi daripada konsentrasi sitokinin dapat menginduksi terbentuknya akar pada eksplan. Sebaliknya, jika konsentrasi sitokinin lebih tinggi dibandingkan auksin maka pembentukan tunas akan lebih cepat (atau lebih banyak). Pengaruh sitokinin pada sel-sel tumbuh dalam kultur jaringan dapat menjelaskan tentang bagaimana hormon ini dapat berfungsi dalam tanaman. Ketika sebagian jaringan parenkim dari batang dibiakkan tanpa adanya sitokinin (hanya auksin), sel-sel akan tumbuh sangat besar namun tidak akan terspesialisasi. Tetapi jika sitokinin ditambahkan

bersama dengan auksin, sel-sel akan membelah dan terspesialisasi (Campbell, 2005).

2.8 Hipotesis

1. Terdapat pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau (*Nicotiana tabacum* L.).
2. Konsentrasi optimal zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) adalah 1,5 ppm.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penelitian dimulai pada bulan Desember 2014 sampai April 2015.

3.2 Variabel Penelitian

3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ZPT yaitu 2,4-D yang digunakan adalah 0 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm dan 2 ppm dan BAP 0,5 ppm.

3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah induksi kalus dan tunas yang terbentuk dari daun tembakau yang dikultur.

3.2.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah ukuran botol kultur, media MS (*Murashige and Skoog*), volume media, pH, suhu, cahaya, dan waktu pengamatan.

3.3 Definisi Operasional

3.3.1 2,4-D merupakan auksin sintetik yang ditambahkan kedalam media tanam untuk merangsang terbentuknya kalus pada eksplan (Malik, 2003).

3.3.2 BAP merupakan salah satu jenis Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) golongan sitokinin yang dipakai dalam penelitian ini dan berfungsi untuk memacu pertumbuhan tunas (George dan Sherington, 1984).

3.3.3 Kedinian kalus adalah waktu yang dibutuhkan eksplan untuk menginduksi kalus.

3.3.4 Teknik *In Vitro* adalah teknik mengisolasi bagian-bagian tanaman (protoplas, sel, jaringan, dan organ), kemudian mengkulturkannya pada

nutrisi buatan yang steril di bawah kondisi lingkungan terkendali sehingga bagian-bagian tanaman tersebut dapat beregenerasi menjadi tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009).

3.4 Bahan dan Alat

3.4.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian terdiri atas: autoklaf, kompor, timbangan analitik, pengaduk magnetik, pH meter, mikropipet, gelas ukur, gelas beker, botol kosong steril, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF), cawan petri, skalpel, spatula, pinset, bunsen, gunting eksplan, dan kamera.

3.4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri atas: daun tanaman tembakau steril hasil *in vitro* yang sudah disediakan, media MS (*Murashige and Skoog*), zat pengatur tumbuh 2,4-D, air suling, alkohol 97%, spirtus, aluminium foil, kertas tisu, plastik wrap, kertas label, HCL, dan NaOH.

3.5 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor, yaitu induksi kalus dan induksi tunas. Model matematika percobaan RAL satu faktor adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

i : 1,2,, t (perlakuan)

j : 1, 2,, r (ulangan)

Y_{ij} : Nilai pengamatan pada perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

μ : Nilai rata-rata umum

α_i : Pengaruh perlakuan ke- i

ε_{ij} : Pengaruh acak pada perlakuan ke- i ulangan ke- j

Tahap pertama yakni induksi kalus dengan satu faktor tunggal yaitu variasi konsentrasi 2,4-D dalam media MS. Adapun konsentrasi 2,4-D terdiri dari 5 taraf

konsentrasi, yaitu: 0 ppm (D0); 0,5 ppm (D1), 1,0 ppm (D2); 1,5 ppm (D3) dan 2,0 ppm (D4) dan masing-masing taraf konsentrasi terdiri dari 5 kali pengulangan (U).

Penelitian kemudian dilanjutkan pada tahap induksi tunas dalam satu perlakuan. Perlakuan dengan pemberian BAP dengan taraf konsentrasi 0,5 ppm pada media MS yang terdiri dari 5 kali pengulangan (U). Eksplan yang digunakan berasal dari kalus yang diambil dari tahap induksi kalus pada masing-masing taraf konsentrasi 2,4-D.

Data yang diperoleh, dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA). Apabila terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan-perlakuan tersebut, maka analisis akan dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kepercayaan 5%.

3.6 Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Sterilisasi Alat

Peralatan meliputi botol kultur, gelas beker, cawan petri, gelas ukur, pinset, gunting, pisau skalpel dicuci menggunakan sabun, dibilas dan dikeringkan. Peralatan yang sudah kering (kecuali botol kultur) dibungkus menggunakan plastik. Semua peralatan yang akan digunakan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 17,5 psi selama 2 jam.

3.6.2 Pembuatan Media dan Sterilisasi media

Media dasar yang digunakan untuk penelitian ini adalah MS (*Murashige and Skoog*). Pembuatan 625 liter media dasar MS diperlukan 12,5 ml larutan stok A dan B; 6,25 ml larutan stok C dan D; 3,125 ml larutan stok E dan F; 6,25 ml larutan Mio Inositol; 0,625 ml vitamin; dan sukrosa 18,75 gram. Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan untuk induksi kalus adalah 0,5 ppm 2,4-D, 1 ppm 2,4-D, 1,5 ppm 2,4-D, dan 2 ppm 2,4-D. Menambahkan aquades sampai larutan mencapai media 250 mL pada masing-masing perlakuan. Larutan diaduk menggunakan pengaduk magnetik sampai homogen. Pengukuran pH larutan diukur dengan pH meter sampai menunjukkan angka 6 – 6,3 dengan

menambahkan larutan HCL atau NaOH. Larutan HCL digunakan untuk menurunkan pH dan larutan NaOH digunakan untuk menaikkan pH pada larutan. Larutan yang sudah jadi ditambahkan agar komersial pada masing-masing perlakuan sebanyak 5 gram dan dimasak sampai agar-agar larut. Sebanyak 25 ml media yang sudah siap dituang kedalam botol steril. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121⁰C dengan tekanan 17,5 psi selama 2 jam. Media yang telah steril disimpan diruang kultur.

3.6.3 Penanaman Eksplan pada Media

Eksplan daun diambil dari kultur steril tembakau yang sudah disediakan. Eksplan dibawa ke LAF (*Laminar Air Flow Cabinet*). Memotong eksplan dengan ukuran $\pm 0,5 \times 1$ cm. Menanam eksplan kedalam botol kultur yang telah berisi 25 ml media dengan posisi bagian abaksial menyentuh medium. Setiap media diisi dengan 1 eksplan yang sama. Botol media ditutup kembali dan dibalut menggunakan plastik wrap. Botol yang telah berisi eksplan dipindahkan ke ruang penyimpanan dan disusun pada rak kultur.

3.6.4 Pemeliharaan

Pemeliharaan meliputi menjaga kebersihan ruang kultur, pemisahan eksplan atau media yang terkontaminasi oleh mikroorganisme dari ruang kultur. Penyemprotan ruangan dan botol-botol eksplan setiap hari dengan menggunakan alkohol 97% serta penyinaran dengan menggunakan cahaya lampu neon pada setiap rak kultur. Pemeliharaan dilakukan selama 2-3 bulan sampai eksplan bermultiplikasi menjadi kalus.

3.7 Parameter Pengamatan

1. Kedinian kalus, ditentukan dengan cara mengamati eksplan sejak awal penanaman, sampai muncul kalus pertama kali terlihat berpoliferasi pada permukaan eksplan. Perhitungan dinyatakan dalam satuan hari setelah tanam (HST);

2. Berat basah kalus, diukur pada akhir pengamatan dengan menimbang botol kultur yang berisi eksplan, kemudian melakukan sub kultur dan menimbang berat botol hasil subkultur dengan menggunakan neraca analitik. Hasil perhitungan berat basah adalah selisih antara botol kultur awal dengan botol kultur akhir (setelah perlakuan sub kultur) dan hasil perhitungan dinyatakan dalam satuan gram (g);
3. Persentase terbentuknya kalus, eksplan berkalus yang dihitung adalah eksplan yang berhasil menginduksi kalus. Perhitungan dilakukan di akhir pengamatan, dinyatakan dalam satuan persen (%) yang dihitung dengan menggunakan rumus :
$$\frac{\text{Jumlah eksplan yang berkalus}}{\text{Jumlah seluruh eksplan}} \times 100\%$$
4. Morfologi kalus, morfologi kalus yang diamati meliputi: tekstur kalus yaitu kalus remah (terpisah-pisah menjadi bagian-bagian yang kecil, mudah lepas, dan mengandung banyak air) atau kalus kompak (tidak mudah terpisah, tidak mudah lepas, dan mengandung sedikit air), dan warna kalus (putih, putih kehijauan, hijau, dan cokelat);
5. Kedinian tunas, ditentukan dengan cara mengamati eksplan sejak awal penanaman, sampai muncul tunas pertama kali terlihat berpoliferasi pada permukaan eksplan. Perhitungan dinyatakan dalam satuan hari setelah tanam (HST);
6. Jumlah tunas, dihitung jumlah tunas yang terbentuk pada eksplan, tunas yang dihitung adalah tunas dengan panjang minimal 1 cm. Pengamatan ini dilakukan setiap minggu;
7. Jumlah daun, dihitung jumlah daun yang tumbuh pada eksplan dan telah membuka sempurna. Perhitungan dilakukan setiap minggu;
8. Tinggi tunas, diukur pada akhir pengamatan dengan cara mengukur tunas dari pangkal tunas hingga ujung tunas atau titik tumbuh tertinggi pada batang. Tinggi tunas diukur dengan menggunakan penggaris dan dinyatakan dalam satuan sentimeter (cm);

9. Persentase terbentuknya tunas, eksplan bertunas yang dihitung adalah eksplan yang berhasil menumbuhkan tunas minimal 1 cm. Perhitungan dilakukan di akhir pengamatan, dinyatakan dalam satuan persen (%) yang dihitung dengan menggunakan rumus

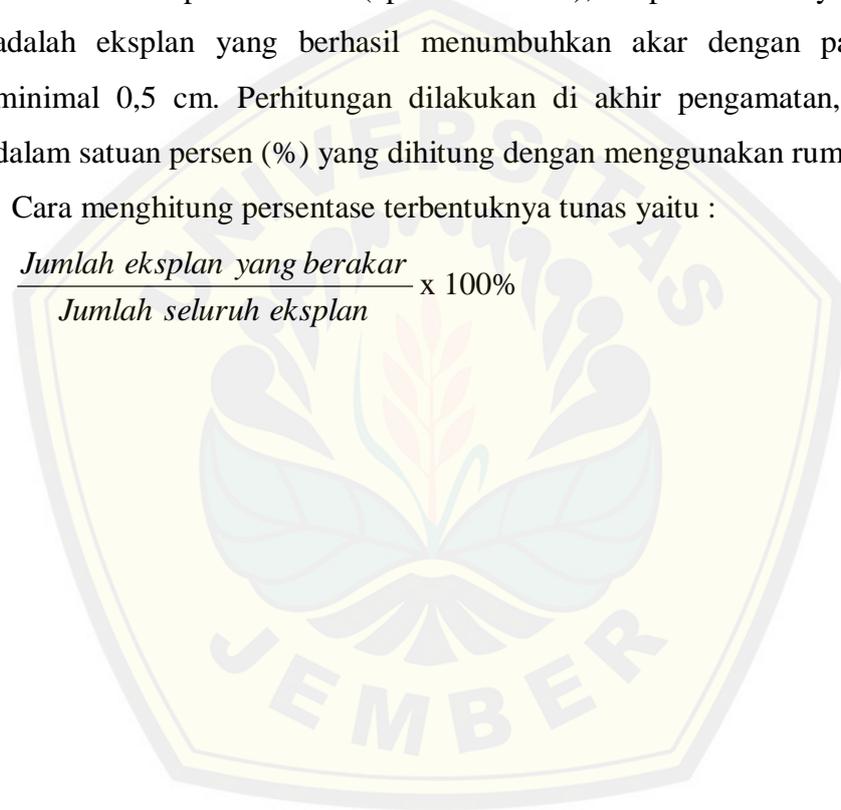
Cara menghitung persentase terbentuknya tunas yaitu :

$$\frac{\text{Jumlah eksplan yang bertunas}}{\text{Jumlah seluruh eksplan}} \times 100\%$$

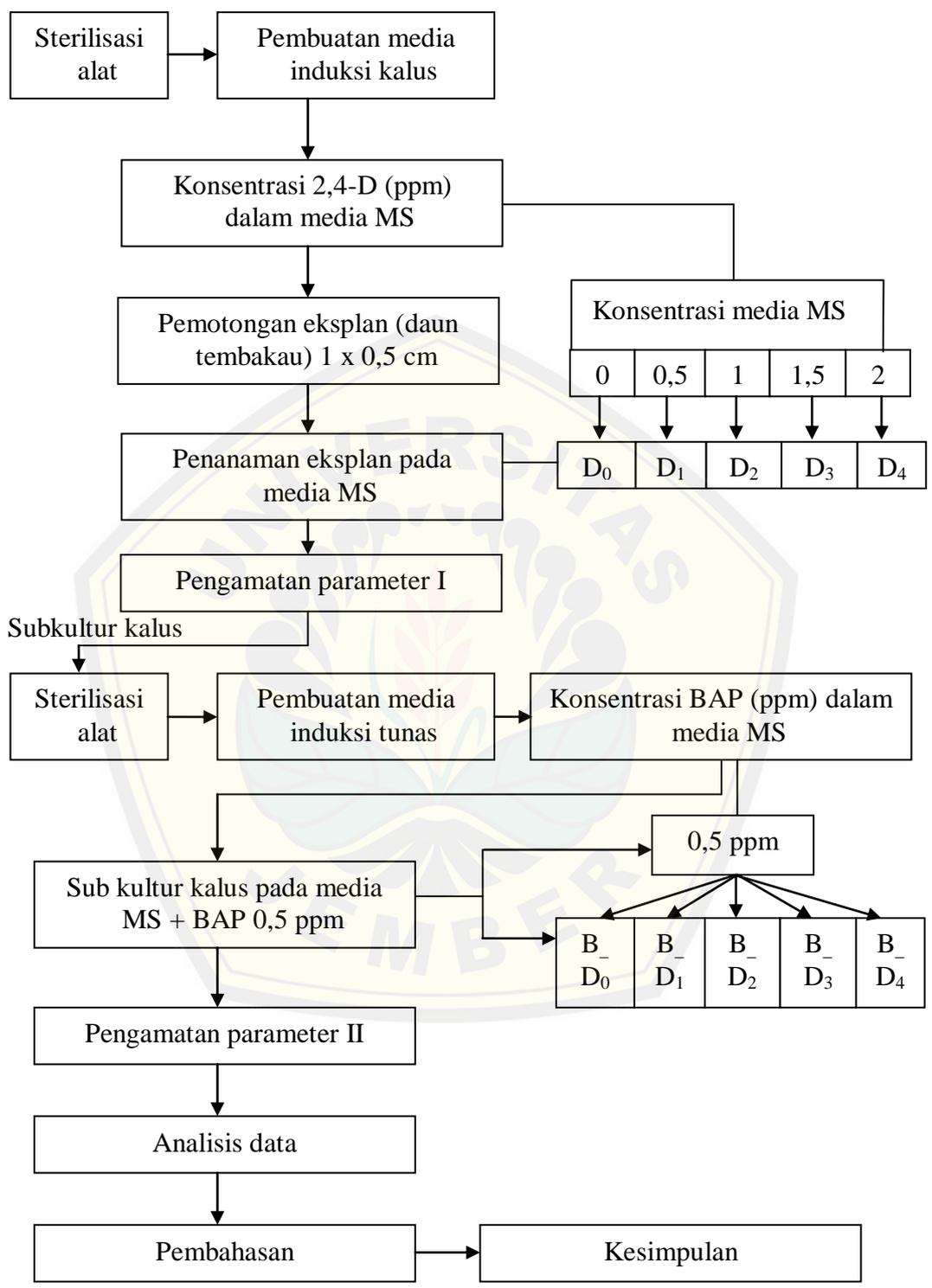
10. Persentase eksplan berakar (apabila berakar), eksplan beakar yang dihitung adalah eksplan yang berhasil menumbuhkan akar dengan panjang akar minimal 0,5 cm. Perhitungan dilakukan di akhir pengamatan, dinyatakan dalam satuan persen (%) yang dihitung dengan menggunakan rumus

Cara menghitung persentase terbentuknya tunas yaitu :

$$\frac{\text{Jumlah eksplan yang berakar}}{\text{Jumlah seluruh eksplan}} \times 100\%$$



3.8 Skema Alur Penelitian



Gambar 3.1 Skema alur penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Penelitian tentang penggunaan variasi konsentrasi 2,4-D (2,4-*Dichlorophenoxyacetic acid*) terhadap induksi kalus dan BAP (6-*Benzyl Amino Purin*) terhadap induksi tunas daun tembakau (*N. tabacum* L.) Varietas TS3 dilakukan melalui dua tahap. Tahap pertama yaitu pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D untuk memperoleh kalus. Tahap kedua yaitu dengan pemberian zat pengatur tumbuh BAP untuk membentuk tunas. Parameter pengamatan pada penelitian ini yaitu kedinian kalus, berat basah kalus, persentase eksplan berkalus, morfologi kalus (warna dan tekstur kalus), kedinian tunas, jumlah tunas, jumlah daun, tinggi tunas, persentase terbentuknya tunas, dan persentase eksplan berakar (apabila berakar). Hasil penelitian pada masing-masing tahap diuraikan sebagai berikut.

4.1.1 Induksi Kalus

Kalus merupakan sumber bahan tanam yang penting untuk meregenerasi tanaman baru. Penggunaan kalus sangat menguntungkan karena kalus dapat diinisiasi dari jaringan pada seluruh bagian tanaman (Marlin, 2012). Pembentukan kalus dari jaringan eksplan yang dikultur melalui teknik *in vitro* melibatkan perkembangan sel yang berlangsung secara acak dan tidak merata. Kalus yang terbentuk pada permukaan eksplan disebabkan karena adanya rangsangan luka yang menyebabkan kesetimbangan dinding sel berubah arah, sebagian protoplas mengalir keluar sehingga mulai terbentuk kalus (Zulkarnain, 2011). Data yang diperoleh dari penggunaan variasi konsentrasi 2,4-D dianalisis menggunakan analisis sidik ragam. Berdasarkan hasil analisis sidik ragam, nilai F-hitung pada masing-masing parameter pengamatan tahap induksi kalus disajikan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Nilai F-Hitung parameter pengamatan induksi kalus menggunakan 2,4-D

Parameter Pengamatan	Nilai F-Hitung
Kedinian kalus	278,18 **
Berat basah kalus	17,15 **

Keterangan :

tn = tidak berpengaruh nyata (nilai F-Hitung \leq nilai F-Tabel pada taraf 5%)

* = berpengaruh nyata (nilai F-Hitung < nilai F-Tabel pada taraf 1% dan nilai F-Hitung > F-Tabel pada taraf 5%)

** = berpengaruh sangat nyata (nilai F-Hitung > nilai F-Tabel pada taraf 1%)

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa terdapat pengaruh sangat nyata antara pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap kedinian kalus dan berat basah kalus. Analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) untuk mengetahui besar pengaruh masing-masing konsentrasi 2,4-D terhadap induksi kalus tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) Varietas TS3. Hasil analisis disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Rata-rata hasil analisis uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) terhadap induksi kalus.

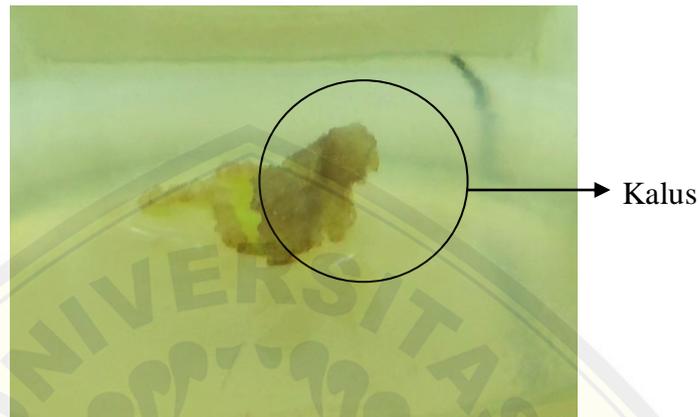
Perlakuan 2,4-D	Rata-rata	
	Kedinian kalus (HST)	Berat basah kalus (gr)
0	0,00 D	0,38 D
0,5	30,60 Ab	1,71 A
1	33,00 A	1,21 B
1,5	24,40 C	0,99 Bc
2	28,20 B	0,82 C

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh yang tidak nyata menurut uji DMRT pada taraf kepercayaan 95%.

a. Kedinian kalus

Salah satu indikator terjadinya pertumbuhan melalui kultur *in vitro* adalah terbentuknya kalus pada permukaan eksplan (Gambar 4.1). Waktu terbentuknya kalus pada suatu eksplan berbeda-beda hal ini dipengaruhi beberapa faktor, antara lain bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan, komposisi media serta zat

pengatur tumbuh yang digunakan. Pengamatan terhadap kedinian kalus dimulai setelah eksplan ditanam pada media. Terbentuknya kalus pada permukaan eksplan terjadi pada 21 HST. Pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D berpengaruh sangat nyata terhadap kedinian kalus. Rata-rata terbentuknya kalus pada eksplan dapat dilihat pada Tabel 4.2.



Gambar 4.1 Kalus yang terbentuk pada permukaan eksplan

Berdasarkan Tabel 4.2 dapat diketahui bahwa perlakuan yang paling baik untuk induksi kalus pada eksplan daun tembakau yaitu pada perlakuan 2,4-D 1,5 ppm dengan rata-rata waktu terbentuknya kalus 24,4 hari, kemudian dilanjutkan pada perlakuan 2 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm secara berurutan dengan waktu 28,2 hari, 30,6 hari, 33 hari dan perlakuan 0 ppm dimana tidak terbentuk kalus pada permukaan eksplan. Respon tercepat pembentukan kalus pada konsentrasi 2,4-D 1,5 ppm terjadi karena konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi yang tepat untuk menginduksi kalus pada eksplan. Respon paling lambat adalah pada konsentrasi 2,4-D 0 ppm dimana tidak terbentuk kalus pada permukaan eksplan.

b. Berat basah kalus

Pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D berpengaruh nyata terhadap berat basah kalus. Rata-rata berat basah kalus tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) paling tinggi dihasilkan pada konsentrasi 2,4-D 0,5 ppm selanjutnya 1 ppm, 1,5 ppm dan 2 ppm berturut-turut dengan berat 1,71 gr, 1,21 gr, 0,99 gr dan 0,82 gr. Hasil terendah terdapat pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D yaitu 0,38 gr karena tidak mampu

menginduksi terbentuknya kalus, disajikan pada Tabel 4.2. Berdasarkan hasil analisis menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D 0,5 ppm merupakan konsentrasi yang paling baik karena mampu menghasilkan rata-rata berat basah kalus paling tinggi yaitu 1,71 gr. Pertambahan berat dan jumlah kalus tersebut terjadi disebabkan karena adanya poliferasi sel.

c. Persentase terbentuknya kalus

Kalus yang terbentuk pada permukaan eksplan setelah 3 minggu menunjukkan bahwa pada konsentrasi 2,4-D 1,5 ppm mampu menginduksi terbentuknya kalus pada seluruh eksplan yang ditanam dengan rata-rata persentase 100%. Konsentrasi 2,4-D 2 ppm dan 0,5 ppm menghasilkan sedikit kalus yakni sebesar 60% dan 40% kalus yang tumbuh dari seluruh eksplan yang ditanam (Tabel 4.3), sedangkan pada konsentrasi 1 ppm dan 0 ppm 2,4-D belum terbentuk kalus pada permukaan eksplan. Hal ini diduga terjadi karena beberapa faktor, yaitu faktor eksplan itu sendiri dan faktor peneliti. Pada konsentrasi 1 ppm diduga hormon eksogen belum mampu menginduksi hormon endogen sehingga tidak terbentuk kalus, selain itu juga dikarenakan kondisi eksplan yang sudah mulai menurun atau hampir layu sehingga untuk membentuk kalus membutuhkan waktu yang relatif lambat. Faktor dari peneliti dapat disebabkan karena kurang teliti dalam mengamati terbentuknya kalus pada permukaan eksplan sehingga pada konsentrasi tersebut tidak ditemukan kalus pada permukaan eksplan (*human error*).

Tabel 4.3 Tabel perbandingan rata-rata persentase terbentuknya kalus pada perlakuan konsentrasi hormon 2,4-D pada 3 MST (Minggu Setelah Tanam) dan 6 MST (Minggu Setelah Tanam)

Perlakuan 2,4-D (ppm)	Rata-rata persentase terbentuknya kalus (%)	
	3 MST	6 MST
0	0	0
0,5	40	100
1	0	100
1,5	100	100
2	60	100

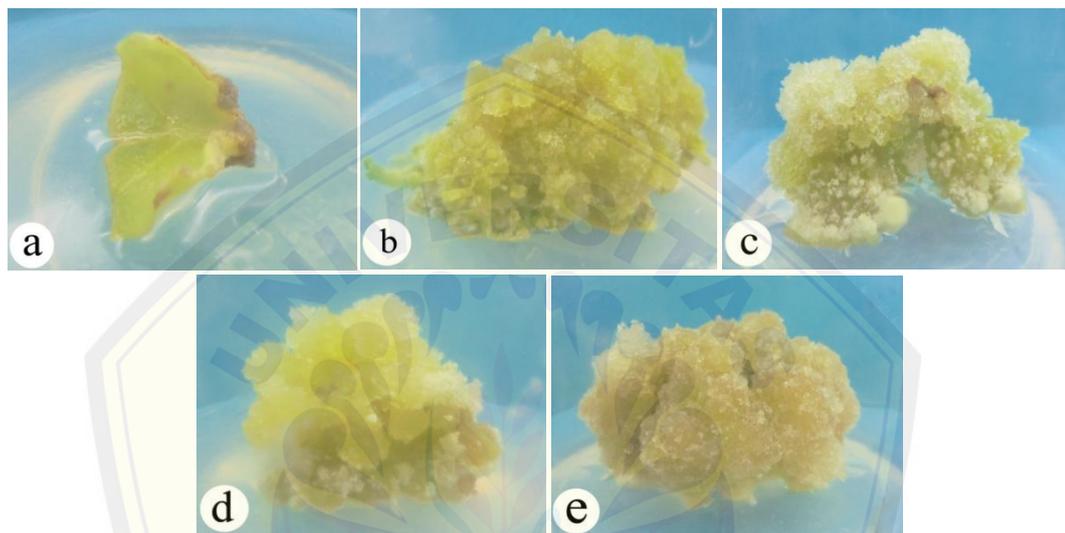
Hasil yang diperoleh setelah 6 minggu (Tabel 4.3) terjadi peningkatan jumlah kalus yang terbentuk pada permukaan eksplan. Peningkatan terjadi pada konsentrasi 0,5 ppm sebesar 60%, konsentrasi 1 ppm sebesar 100%, pada konsentrasi 1,5 ppm 0% dan pada konsentrasi 2 ppm sebesar 40%. Rata-rata kalus yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, dan 2 ppm 2,4-D sebesar 100%. Hal ini menunjukkan bahwa semua eksplan yang di tanam didalam media yang ditambahkan dengan zat pengatur tumbuh 2,4-D mampu menginduksi terbentuknya kalus, sehingga kalus terbentuk pada seluruh eksplan namun kecepatan pembentukan kalus pada masing-masing konsentrasi berbeda. Berdasarkan diatas dapat diketahui bahwa konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D yang tepat untuk membentuk kalus pada permukaan eksplan adalah 0,5 ppm.

d. Morfologi kalus (warna dan tekstur)

Pengamatan morfologi kalus meliputi warna kalus dan tekstur kalus. Pengamatan warna kalus dilakukan pada akhir pengamatan, yaitu pada 7 MST. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa warna kalus pada masing-masing konsentrasi berbeda. Pada konsentrasi 0 ppm tidak mampu menghasilkan kalus karena tidak ada rangsangan untuk membentuk kalus pada eksplan, sedangkan pada konsentrasi 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm dan 2 ppm berhasil menginduksi kalus. Warna kalus yang dihasilkan pada konsentrasi 0,5 ppm menunjukkan angka 2,5 GY 8/6, pada kalus dengan konsentrasi 1 ppm menunjukkan angka 2,5 GY 6/6, pada konsentrasi 1,5 ppm menunjukkan angka 2,5 GY 7/8 dan pada konsentrasi 2 ppm menunjukkan angka 2,5 GY 5/6. Angka yang dihasilkan pada kalus ditunjukkan pada Gambar 4.2. Menentukan warna kalus disesuaikan dengan buku *Munsell Color Charts for Plants Tissues* dengan mencocokkan warna kalus yang terbentuk pada eksplan dengan skala yang ada pada buku.

Secara umum perubahan warna yang terjadi pada kalus diawali dari kalus yang berwarna putih kemudian menjadi putih kekuningan setelah itu menjadi kuning kecoklatan dan pada akhirnya kalus akan menjadi coklat. Hasil pengamatan yang dilakukan terhadap warna kalus menunjukkan hasil yang

berbeda pada setiap perlakuan yang diberikan. Berdasarkan Gambar 4.2 dapat diketahui bahwa secara umum warna kalus yang dihasilkan adalah kuning kehijauan sampai kecokelatan. Kalus yang terbentuk juga mempunyai tekstur remah, karena mudah dipisahkan. Kalus yang diperoleh dari tahap pertama akan disubkultur kedalam media baru dengan menggunakan ZPT 0,5 ppm BAP untuk mengetahui kalus yang baik yang mampu menginduksi tunas.



Gambar 4.2 Perbedaan warna kalus pada 7 MST dalam media 0,5 ppm BAP pada:
a) Konsentrasi 0 ppm 2,4-D; b) Konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dengan angka 2,5 GY 8/6; c) Konsentrasi 1 ppm 2,4-D dengan angka 2,5 GY 6/6;
d) Konsentrasi 1,5 ppm 2,4-D dengan angka 2,5 GY 7/8; e) Konsentrasi 2 ppm 2,4-D dengan angka 2,5 GY 5/6.

4.1.2 Induksi Tunas

Keberhasilan kultur jaringan tanaman dipengaruhi oleh sterilisasi, pemilihan eksplan, faktor lingkungan (pH), cahaya, temperatur, serta ZPT (Zat Pengatur Tumbuh) (Fatmawati, 2010). Zulkarnain (2007) juga mengungkapkan bahwa kehadiran zat pengatur tumbuh dalam teknik *in vitro* sangat nyata pengaruhnya. Konsentrasi zat pengatur tumbuh pada medium kultur jaringan juga berperan sangat penting dalam morfogenesis (Fatmawati, 2010). Penelitian tahap kedua yaitu induksi tunas terhadap kalus yang dihasilkan pada tahap pertama kedalam medium dengan pemberian BAP 0,5 ppm. BAP merupakan zat pengatur tumbuh yang tergolong dalam kelompok sitokinin. Sitokinin mempunyai dua peranan

penting untuk propagasi secara *in vitro* yaitu merangsang pembelahan sel dan merangsang pertumbuhan tunas dan daun (Desriatin, 2010). Data yang diperoleh dari penelitian tersebut kemudian dianalisis menggunakan analisis sidik ragam. Berdasarkan hasil analisis sidik ragam, nilai F-hitung pada masing-masing parameter tahap induksi akar dapat dilihat dalam Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Nilai F-Hitung parameter pengamatan induksi tunas menggunakan 0,5 ppm BAP

Parameter Pengamatan	Nilai F-Hitung	
Kedinian tunas	4,76	*
Jumlah tunas	19,74	**
Jumlah daun	10,15	**
Tinggi tunas	3,64	*

Keterangan :

tn = tidak berpengaruh nyata (nilai F-Hitung \leq nilai F-Tabel pada taraf 5%)

* = berpengaruh nyata (nilai F-Hitung < nilai F-Tabel pada taraf 1% dan nilai F-Hitung > F-Tabel pada taraf 5%)

** = berpengaruh sangat nyata (nilai F-Hitung > nilai F-Tabel pada taraf 1%)

Pemberian zat pengatur tumbuh BAP juga berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah tunas dan jumlah daun, sedangkan untuk kedinian tunas menunjukkan perbedaan yang nyata. Hasil dari parameter pengamatan yang menunjukkan pengaruh sangat nyata dan pengaruh nyata akan dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) taraf kepercayaan 95%. Hasil analisis disajikan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Rata-rata hasil analisis uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) terhadap induksi kalus dan tunas.

Perlakuan 2,4-D	Rata-rata			
	Kedinian tunas (HST)	Jumlah tunas	Jumlah daun	Tinggi tunas (cm)
0	30,20 a	9,00 a	29,80 a	1,33 a
0,5	19,20 ab	2,60 b	10,60 b	1,02 a
1	24,80 ab	1,00 b	4,20 b	0,84 ab
1,5	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
2	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh yang tidak nyata menurut uji DMRT pada taraf kepercayaan 95%.

1. Kedinian tunas

Pengamatan terhadap waktu munculnya tunas dimulai setelah dilakukan subkultur kalus pada media yang mengandung zat pengatur tumbuh BAP 0,5 ppm. berdasarkan hasil analisis dapat diketahui bahwa zat pengatur tumbuh BAP berpengaruh nyata terhadap kedinian tunas. Respon pembentukan tunas pada eksplan disajikan pada Gambar 4.3.



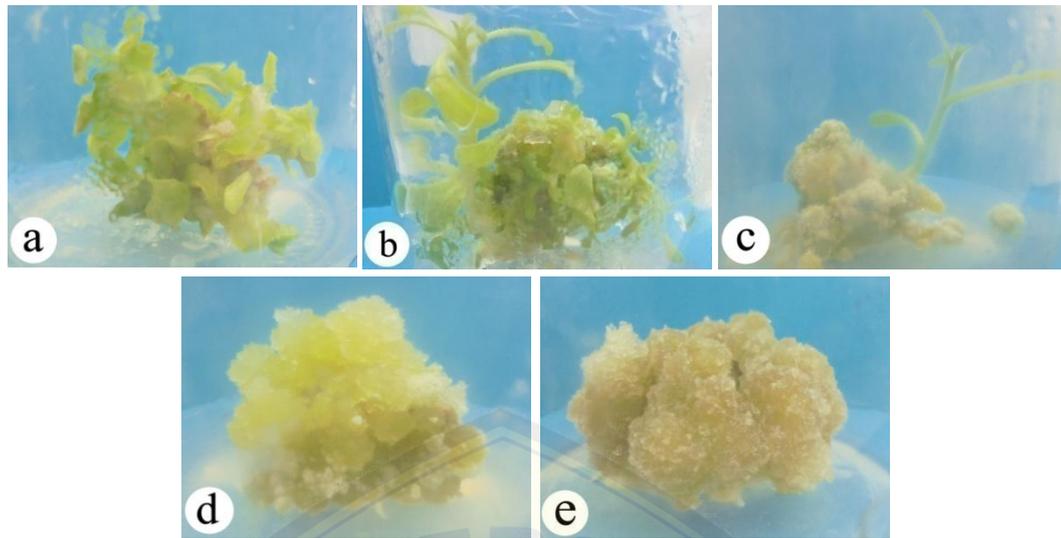
Gambar 4.3 Respon pembentukan tunas pada eksplan dalam media yang mengandung 0,5 ppm BAP pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D; a) 1 MST; b) 2 MST; c) 3 MST.

Hasil analisis dengan uji Duncan terhadap kecepatan terbentuknya tunas pada permukaan kalus pada Tabel 4.5 menunjukkan bahwa respon tercepat pada konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm BAP dengan rata-rata waktu terbentuknya tunas 19,2 hari. Respon tercepat selanjutnya pada konsentrasi 1 ppm 2,4-D dengan rata-rata waktu 24,8 hari, dan 0 ppm 2,4-D selama 30,2 hari.

Respon paling lambat ditunjukkan pada konsentrasi 1,5 ppm 2,4-D dan 2 ppm 2,4-D dimana tidak terbentuk tunas. Konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D 1,5 ppm dan 2 ppm tidak mampu menginduksi tunas pada kalus setelah dilakukan subkultur ke dalam media yang mengandung 0,5 ppm BAP. Konsentrasi 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D merupakan konsentrasi tinggi yang mempengaruhi pembentukan tunas pada media yang mengandung BAP. Konsentrasi tersebut menghambat induksi tunas karena terlalu tinggi sehingga waktu yang dibutuhkan semakin lama. Pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D juga menunjukkan respon yang cukup lama dengan rata-rata waktu terbentuknya tunas 30,2 hari.

2. Jumlah tunas

Hasil uji lanjut dengan uji Duncan (Tabel 4.5) menunjukkan perbedaan yang sangat nyata terhadap jumlah tunas yang tumbuh. Jumlah tunas yang terbentuk setelah dilakukan subkultur terhadap kalus yang terbentuk kedalam media yang mengandung 0,5 ppm BAP setelah 7 MST pada Tabel 4.4 menunjukkan bahwa rata-rata jumlah tunas terbanyak terbentuk pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D sebanyak 9 tunas. Jumlah rata-rata tunas terbanyak selanjutnya yaitu pada konsentrasi 0,5 dan 1 ppm 2,4-D dengan jumlah 3 dan 1 tunas. Respon paling lambat terdapat pada konsentrasi 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D karena tidak mampu membentuk tunas pada permukaan kalus (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Perbedaan jumlah tunas yang muncul pada kalus yang disubkultur kedalam media 0,5 ppm BAP pada: a) Konsentrasi 0 ppm 2,4-D; b) Konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D; c) Konsentrasi 1 ppm 2,4-D; d) Konsentrasi 1,5 ppm 2,4-D; e) Konsentrasi 2 ppm 2,4-D.

Kalus yang diinduksi ke dalam media yang mengandung 0,5 ppm BAP menghasilkan dua tipe kalus, yaitu kalus embriogenik serta kalus non embriogenik yang disajikan pada Tabel 4.6. Kalus embriogenik pada umumnya ditandai dengan bentuknya yang *friable*, tidak berair, memiliki *green spot* dan berwarna kehijauan. Sedangkan kalus non embriogenik adalah kalus yang sulit untuk diregenerasikan dengan tanda-tanda berair, berwarna kuning pucat, dan tidak memiliki struktur globular (Sujatmiko, 2012). Berdasarkan Gambar 4.4 dapat diketahui bahwa konsentrasi 0 ppm 2,4-D merupakan konsentrasi paling baik untuk membentuk tunas pada eksplan setelah dilakukan subkultur ke dalam media yang mengandung 0,5 ppm BAP.

Tabel 4.6 Tabel Morfologi Kalus Pada Media 0,5 ppm BAP

Perlakuan 2,4-D (ppm)	Morfologi Kalus
0	-
0,5	Embriogenik
1	Embriogenik
1,5	Non embriogenik
2	Non embriogenik

3. Jumlah daun

Salah satu indikator terbentuknya tunas adalah munculnya daun. Daun yang muncul dapat menentukan baik tidaknya tunas yang terbentuk pada eksplan. Hasil uji lanjut dengan uji Duncan pada Tabel 4.5 terhadap rata-rata jumlah daun yang terbentuk pada eksplan yang ditanam dalam media 0,5 ppm BAP menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D mampu menghasilkan daun dengan jumlah terbanyak yaitu 29 daun. Jumlah terbanyak selanjutnya yaitu pada konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D yaitu sebanyak 10 daun, dan jumlah paling sedikit terdapat pada konsentrasi 1 ppm 2,4-D yaitu sebanyak 4 daun. Pada konsentrasi 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D tidak mampu membentuk tunas, sehingga tidak terbentuk daun. Berdasarkan tabel tersebut dapat diketahui bahwa pemberian zat pengatur tumbuh BAP berpengaruh nyata terhadap jumlah daun.



Gambar 4.5 Jumlah daun pada tunas setelah disubkultur pada media 0,5 ppm BAP pada: a) Konsentrasi 0 ppm 2,4-D; b) Konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D; c) Konsentrasi 1 ppm 2,4-D.

4. Tinggi tunas

Berdasarkan Tabel 4.4 dapat diketahui bahwa pemberian zat pengatur tumbuh BAP berpengaruh nyata terhadap tinggi tunas. Berdasarkan hasil uji Duncan terhadap tinggi tunas pada Tabel 4.5 dapat diketahui bahwa tunas paling tinggi terdapat pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D dengan tinggi 1,33 cm, kemudian pada konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dengan tinggi 1,02 cm dan pada konsentrasi 1 ppm 2,4-D yaitu dengan tinggi 0,84 cm. Pada konsentrasi 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D tidak muncul tunas.

5. Persentase terbentuknya tunas

Setelah dilakukan subkultur selama 4 MST kedalam media dengan penambahan 0,5 ppm BAP menunjukkan rata-rata tunas yang terbentuk paling tinggi yaitu pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D sebesar 40% dan rata-rata terendah pada konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D sebesar 20% sedangkan pada konsentrasi 1 ppm, 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D belum terbentuk tunas (Tabel 4.7).

Tabel 4.7 Tabel perbandingan rata-rata persentase terbentuknya tunas pada perlakuan konsentrasi hormon 2,4-D pada 4 MST (Minggu Setelah Tanam) dan 8 MST (Minggu Setelah Tanam)

Perlakuan 2,4-D (ppm)	Rata-rata persentase bertunas (%)	
	4 MST	8 MST
0	40	100
0,5	20	60
1	0	60
1,5	0	0
2	0	0

Pengamatan pada 8 MST menunjukkan bahwa rata-rata tertinggi jumlah tunas yang terbentuk adalah pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D yaitu sebesar 100%, artinya setiap eksplan yang di subkultur mampu membentuk tunas. Rata-rata tertinggi selanjutnya yaitu pada konsentrasi 0,5 ppm dan 1 ppm 2,4-D yaitu sebesar 60%. Rata-rata terendah yaitu pada konsentrasi 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D karena tidak mampu menumbuhkan tunas sehingga tetap berupa kalus. Berdasarkan Tabel 4.7 dapat diketahui bahwa terjadi peningkatan persentase terbentuknya tunas.

6. Persentase eksplan berakar

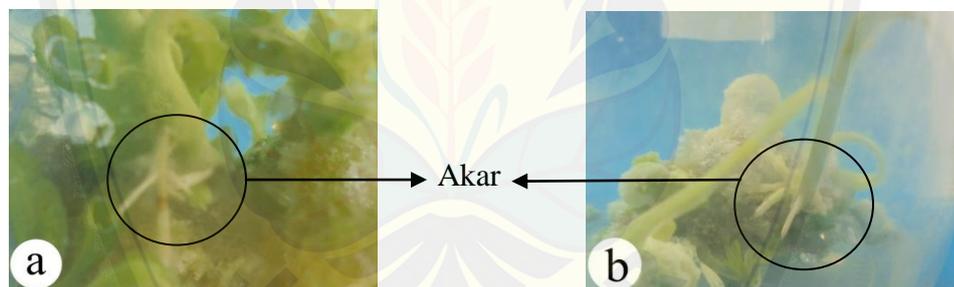
Eksplan yang mampu menginduksi tunas belum tentu mampu membentuk sistim perakaran. Pemberian 0,5 ppm BAP mampu menginduksi akar pada ekplan dengan pemberian 0,5 ppm 2,4-D dan 1 ppm 2,4-D. Pengamatan yang dilakukan pada 8 MST menunjukkan bahwa eksplan pada konsentrasi 0,5 ppm dan 1 ppm 2,4-D mampu membentuk akar dengan rata-rata akar yang terbentuk sebesar 20%, sedangkan pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D tidak mampu membentuk sistim perakaran. Kalus pada konsentrasi 1,5 ppm 2,4-D dan 2 ppm 2,4-D tidak

terbentuk tunas sehingga tidak terbentuk akar meskipun tidak semua tunas dapat membentuk sistim perakaran ditunjukkan pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Tabel persentase terbentuknya akar pada perlakuan konsentrasi hormon 2,4-D pada 7 MST (Minggu Setelah Tanam)

Perlakuan 2,4-D (ppm)	Persentase terbentuk akar (%)
0	0
0,5	20
1	20
1,5	0
2	0

Tabel tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi 0,5 ppm dan 1 ppm 2,4-D dapat membentuk perakaran pada tunas. Pada konsentrasi 0 ppm, 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D tidak mampu membentuk tunas sehingga tidak terbentuk akar. Akar yang terbentuk pada tunas ditunjukkan pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Pembentukan akar setelah 7 MST pada perlakuan: a) Konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dan b) Konsentrasi 1 ppm 2,4-D pada yang mengandung media 0,5 ppm BAP.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Induksi Kalus

Pengamatan terhadap eksplan tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) yang ditumbuhkan di dalam medium MS dengan menggunakan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP yang diberikan secara bertahap menunjukkan adanya respon pertumbuhan organogenesis. Respon organogenesis yang terjadi pada eksplan tembakau terjadi secara tidak langsung. Organogenesis secara tidak langsung diawali dengan pembentukan kalus terlebih dahulu yang kemudian kalus akan

berdiferensiasi membentuk organ yang spesifik (Fatmawati, 2010). Eksplan daun tembakau dengan kultivar berbeda juga memberikan respon dengan pembentukan kalus terlebih dahulu, karena eksplan daun tembakau memiliki kemampuan lebih tinggi untuk membentuk kalus daripada jenis eksplan yang lain (Desriatin, 2010).

Dalam kultur jaringan, kalus dapat dihasilkan dari potongan organ yang telah steril, kemudian organ tersebut ditanam di dalam media yang mengandung auksin dan sitokinin. Kalus merupakan kumpulan dari massa sel yang belum terdiferensiasi. Kalus mempunyai pertumbuhan yang abnormal dan berpotensi untuk berkembang menjadi akar, tunas dan embrioid yang nantinya akan berkembang menjadi plantlet (Fatmawati, 2010). Menurut Wetter (1991), kalus akan terbentuk pada 2-3 minggu setelah tanam.

Pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D berpengaruh sangat nyata terhadap kedinian kalus. Berdasarkan hasil uji DMRT (Tabel 4.2) terhadap kedinian kalus menunjukkan bahwa kalus yang muncul pada permukaan eksplan dengan pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D 1,5 ppm dapat menginduksi kalus lebih cepat daripada konsentrasi lainnya yaitu 24,4 hari. Hal ini terjadi karena zat pengatur tumbuh yang dibutuhkan eksplan untuk menginisiasi kalus cukup tinggi, sehingga pada konsentrasi 1,5 ppm 2,4-D sudah mampu menginisiasi terbentuknya kalus. Pada konsentrasi 2 ppm 2,4-D kalus terbentuk setelah 28,2 hari, dan respon paling lama ditunjukkan pada konsentrasi 2,4-D 0,5 ppm dan 1 ppm yaitu selama 30,6 dan 33 hari. Respon pembentukan kalus paling lambat terjadi pada konsentrasi rendah yaitu 0,5 ppm dan 1 ppm 2,4-D dimana pada konsentrasi tersebut tidak mampu memenuhi kebutuhan eksplan akan zat pengatur tumbuh secara eksternal sehingga pada konsentrasi tersebut waktu inisiasi kalus menjadi lebih lambat.

Pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D tidak terbentuk kalus pada permukaan eksplan dikarenakan tidak adanya zat pengatur tumbuh yang mampu merangsang pembentukan kalus. Menurut Malik (2003), bahwa penggunaan 2,4-D pada konsentrasi tinggi menghambat poliferasi kalus dan pada konsentrasi rendah merangsang terjadinya morfogeneis, sehingga pada konsentrasi 2 ppm respon terbentuknya kalus sedikit lebih lambat daripada konsentrasi 1,5 ppm 2,4-D.

Sesuai dengan penelitian Mustafa (2012), yang menyatakan bahwa konsentrasi paling baik untuk menginduksi kalus pada tanaman tebu adalah 1,5 ppm 2,4-D.

Pembentukan kalus pada eksplan melalui kultur *in vitro* terjadi secara acak dan tidak merata. Pembentukan kalus terjadi melalui tiga tahap perkembangan yaitu induksi, pembelahan sel, dan diferensiasi sel (Zulkarnain, 2011). Kalus tumbuh disekitar irisan daun. Kalus yang terbentuk pada eksplan disebabkan karena sel-sel yang kontak dengan medium menjadi meristematik dan menjadi aktif membelah seperti jaringan penutup luka sebagai respon terhadap pelukaan (Desriatin, 2010). Mula-mula terjadi pembentangan dinding sel dan terjadi penyerapan air sehingga sel akan membengkak selanjutnya terjadi pembelahan sel dan terbentuk kalus (Sitorus, 2011).

Berat kalus yang dihasilkan pada kultur jaringan tergantung pada kecepatan sel-sel membelah diri, memperbanyak diri yang dilanjutkan dengan pembesaran sel. Kecepatan sel membelah diri dipengaruhi adanya kombinasi auksin dan sitokinin tertentu dalam konsentrasi tertentu tergantung pada tanamannya, selain itu juga tergantung faktor-faktor dari luar seperti intensitas cahaya dan temperatur (Trimulyono, 2004). Zat pengatur tumbuh 2,4-D juga memberikan pengaruh sangat nyata terhadap berat kalus pada masing-masing konsentrasinya, karena auksin mendorong terjadinya elongasi sel yang diikuti dengan pembesaran sel dan meningkatnya berat basah kalus. Oleh karena itu peningkatan berat basah pada kalus yang berbeda pada masing-masing konsentrasi juga disebabkan oleh penyerapan air oleh sel tersebut.

Berat basah kalus terbesar ditunjukkan pada pemberian 0,5 ppm 2,4-D yaitu sebesar 1,71 gram, dilanjutkan pada konsentrasi 1 ppm, 1,5 ppm dan 2 ppm berturut-turut sebesar 1,21 gram, 0,99 gram, dan 0,82 gram. Berat terendah pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D yaitu sebesar 0,38 gram yang merupakan berat eksplan karena tidak mampu menginduksi terbentuknya kalus, ditunjukkan pada Tabel 4.2. Berdasarkan uji DMRT dapat disimpulkan bahwa konsentrasi paling baik untuk memperoleh berat kalus maksimal adalah pada konsentrasi 0,5 ppm. Ini berarti bahwa pada konsentrasi tersebut kebutuhan zat pengatur tumbuhnya

terpenuhi sehingga sel-sel dapat berpoliferasi secara maksimal sehingga mengalami pembelahan secara optimal.

Menurut Sitorus (2011), bahwa pembelahan yang terjadi secara optimal pada akhirnya akan meningkatkan berat basah kalus. Auksin (2,4-D) memberikan pengaruh terhadap perkembangan sel karena auksin dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel. Selain itu, auksin juga dapat merubah aktivitas enzim-enzim yang berperan dalam sintesis komponen-komponen dinding sel dan menyusunnya kembali menjadi dinding sel yang utuh sehingga berpengaruh terhadap berat sel (Trimulyono, 2004).

Pengamatan yang dilakukan terhadap persentase terbentuknya kalus pada eksplan dilakukan pada 3 MST dan 6 MST. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa variasi konsentrasi yang digunakan (0 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, 2 ppm 2,4-D) berpengaruh terhadap persentase eksplan yang berkalus. Kalus yang terbentuk setelah 3 minggu masa tanam menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1,5 ppm dapat menginduksi terbentuknya kalus pada eksplan yang ditanam dengan rata-rata sebesar 100%. Tabel 4.3 menunjukkan persentase terbesar selanjutnya adalah pada konsentrasi 2 ppm dan 0,5 ppm 2,4-D yaitu sebesar 60% dan 40%, sedangkan pada konsentrasi 1 ppm dan 0 ppm 0% karena tidak terbentuk kalus pada permukaan eksplannya. Perbandingan pada 3 MST dan 6 MST (Tabel 4.3) menunjukkan terjadinya peningkatan persentase kalus yaitu pada konsentrasi 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm, dan 2 ppm 2,4-D mampu menginduksi kalus sebesar 100%, artinya eksplan yang ditanam pada media dengan konsentrasi 2,4-D tersebut mampu menginduksi terbentuknya kalus akan tetapi kecepatan pembentukan kalus pada tiap konsentrasi berbeda-beda. Ukuran kalus yang muncul pada eksplan juga berbeda-beda pada setiap perlakuan hal tersebut dikarenakan masing-masing kalus memiliki daya kepekaan yang berbeda-beda terhadap media yang berbeda serta adanya pengaruh zat pengatur tumbuh yang diberikan (Trimulyono, 2004).

Penggunaan zat pengatur tumbuh dapat merangsang cepat pertumbuhan dan perkembangan tanaman pada kondisi normal, sedangkan apabila tidak

menggunakan zat pengatur tumbuh pertumbuhan tanaman akan lambat utamanya tanaman yang dikembangbiakkan secara vegetatif (Trisna, 2013). Masing-masing konsentrasi memberikan respon kalogenesis yang berbeda. Hal ini disebabkan didalam eksplan terdapat hormon endogen. Hormon endogen tersebut juga mampu memacu sel untuk berkembang dan memperbanyak diri tetapi waktu yang dibutuhkan cenderung lama (Nisak, 2012). Berdasarkan tabel 4.3 dapat dibuktikan bahwa pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara *in vitro* dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi dari zat pengatur tumbuh yang ada dalam eksplan baik endogen maupun eksogen yang diserap dari media.

Salah satu fase untuk mendapatkan individu baru pada teknik kultur jaringan tanaman adalah kalogenesis. Kalogenesis merupakan respon awal yang ditandai dengan terbentuknya kalus pada bagian tepi eksplan (bagian pelukaan) bagian atas maupun bagian bawah yang bersentuhan dengan media. Kalus akan lebih cepat terbentuk pada bagian abaksial daun, hal ini berkaitan dengan proses pengambilan nutrisi medium oleh eksplan. Penyerapan unsur hara akan lebih baik karena terjadi kontak secara langsung antara media dengan bagian abaksial daun (Nisak, 2012). Kalus yang muncul pada bagian yang terluka terjadi akibat rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi lukanya. Pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi dari adanya respon terhadap luka dan suplai hormon alamiah atau buatan dari luar kedalam eksplan.

Gunawan (1988), menyatakan bahwa 2,4-D merupakan jenis auksin yang mempunyai potensi tinggi untuk menumbuhkan kalus. 2,4-D juga efektif untuk memacu pembentukan kalus karena aktifitasnya yang kuat untuk memacu proses diferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus (Winarto, 2010). Mekanisme kerja auksin mendorong pembelahan sel yaitu dengan cara mempengaruhi dinding sel. Induksi auksin akan mengaktifasi pompa proton pada membran plasma sehingga menyebabkan pH pada bagian dinding sel lebih rendah. Pompa proton yang aktif tersebut akan memutuskan ikatan hidrogen diantara serat selulosa dinding sel sehingga menyebabkan dinding sel mudah merenggang akibatnya tekanan dinding sel akan menurun dan dengan demikian terjadilah pelenturan sel. pH rendah ini juga dapat mengaktifasi enzim tertentu

pada dinding sel yang dapat mendegradasi bermacam-macam protein pada dinding sel yang lunak dan lentur sehingga terjadi pemanjangan, pembesaran dan pembelahan sel (Purmitasari, 2012).

Kalus yang terbentuk pada permukaan eksplan diamati morfologinya. Morfologi kalus yang diamati meliputi warna dan tekstur kalus, pengamatan terhadap morfologi kalus dilakukan pada 7 MST. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa warna kalus pada masing-masing konsentrasi terdapat perbedaan. Penentuan warna kalus pada penelitian ini dengan mencocokkan warna kalus yang terbentuk pada eksplan dengan skala warna pada buku *Munsell Color Charts for Plants Tissues*. Konsentrasi 0 ppm tidak terbentuk kalus sehingga tidak diperoleh warna kalus, sedangkan pada konsentrasi 0,5 ppm mampu menginduksi kalus dengan warna yang ditunjukkan pada angka 2,5 GY 8/6, pada konsentrasi 1 ppm ditunjukkan dengan angka 2,5 GY 6/6, pada konsentrasi 1,5 ppm juga ditunjukkan dengan angka 2,5 GY 7/8, dan pada konsentrasi 2 ppm warna kalus yang dihasilkan ditunjukkan dengan angka 2,5 GY 5/6 yang ditunjukkan pada Gambar 4.2. Secara umum warna kalus yang dihasilkan adalah kuning kehijauan sampai kecoklatan.

Kalus yang diperoleh dari media inisiasi pertama dengan menggunakan 2,4-D berwarna kuning kecoklatan yang merupakan warna awal kalus pada saat dipindahkan ke dalam media perlakuan BAP 0,5 ppm. Tekstur kalus yang dihasilkan pada pemberian 2,4-D adalah remah karena mudah terpisah menjadi bagian-bagian yang kecil dan mengandung banyak air. Warna kalus mengalami perubahan setelah ditumbuhkan pada media dengan pemberian BAP 0,5 ppm menjadi kuning kehijauan sampai kecoklatan serta tekstur kalus yang dihasilkan juga lebih kompak. Perubahan warna kalus menjadi coklat (browning) dalam kultur jaringan terjadi karena akumulasi polifenol oksidase yang disintesis oleh jaringan dalam kondisi teroksidasi ketika sel dilukai (Khumaida, 2013). Menurut Wattimena (1988), senyawa-senyawa fenol dapat menghambat pembelahan sel, pembesaran sel dan pertumbuhan.

Kalus yang dihasilkan pada perlakuan awal yaitu pemberian 2,4-D bertekstur remah, dalam hal ini auksin memiliki peran terhadap pembentukan

kalus remah. 2,4-D menstimulasi pemanjangan sel dengan cara penambahan plastisitas dinding sel menjadi longgar, sehingga air dapat masuk ke dalam dinding sel dengan cara osmosis dan sel mengalami pemanjangan. Oleh karena itu, kalus yang remah mengandung banyak air karena belum mengalami lignifikasi dinding sel, serta antara kumpulan sel yang satu dengan yang lain relatif mudah untuk dipisahkan (Nisak, 2012).

4.2.2 Induksi Tunas

Respon eksplan pada media dengan penambahan BAP mempunyai tekstur yang lebih kompak. Menurut Amin (2007), Kalus dikatakan kompak apabila antara sel atau kumpulan sel yang lain tidak mudah dipisahkan dan bertekstur keras. Tekstur kalus yang kompak merupakan efek dari sitokinin dan auksin yang mempengaruhi potensial air di dalam sel. Auksin akan melonggarkan serat-serat dinding sel, sehingga dinding sel lebih fleksibel dan nutrisi yang terkandung dalam medium akan masuk secara difusi. Hal ini akan terus berlangsung sampai potensial air dan potensial osmotik seimbang dan sel menjadi turgid. Sel turgid dengan adanya penambahan sitokinin akan mempengaruhi pembelahan dan pemanjangan sel sehingga pembentukan dinding sel semakin cepat dan kalus menjadi kompak. Sitokinin (BAP) yang ditambahkan juga berperan dalam pembelahan sel dan sintesis protein. Pemacuan pembelahan sel dan sintesis protein oleh BAP menyebabkan sel berproliferasi, akibatnya volume sel bertambah sehingga menyebabkan berat kalus yang dihasilkan juga mengalami penambahan (Trimulyono, 2004).

Kalus yang dihasilkan dari perlakuan pertama dilakukan subkultur kedalam media MS dengan menggunakan zat pengatur tumbuh BAP 0,5 ppm untuk meregenerasikan kalus yang diperoleh sehingga membentuk tunas. BAP merupakan sitokinin yang paling efektif untuk merangsang penggandaan tunas (Kasutjaningati, 2013). Kecepatan kalus beregenerasi menjadi tunas lebih menguntungkan karena proses pertumbuhan tunas menjadi lebih awal dan dapat memperpendek masa kultur. Zat pengatur tumbuh juga menjadi salah satu faktor penentu keberhasilan proses diferensiasi sel dan jaringan tanaman yang

dikulturkan. Untuk meningkatkan keberhasilan regenerasi dan pembentukan tunas, zat pengatur tumbuh yang sering digunakan dari golongan sitokinin yaitu BAP dan kinetin. Penambahan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin dan giberelin juga digunakan untuk mempercepat pembentukan akar dan memperpanjang tunas (Sukmadjaja, 2011).

Sukmadjaja (2011), juga menjelaskan bahwa lama periode kultur menentukan keberhasilan regenerasi tunas yang berasal dari kalus. Kalus akan berhenti membelah dan mengalami kematian setelah berumur lebih dari 60 hari. Kalus yang mengalami kemunduran kualitas ditandai dengan berkurangnya kecepatan pertambahan ukuran kalus dan terjadi perubahan warna kalus menjadi coklat atau hitam sehingga kalus tidak dapat beregenerasi menjadi tunas. Oleh karena itu kalus yang diregenerasikan pada penelitian ini adalah kalus yang berumur 42 hari. Tunas merupakan calon vegetatif tanaman yang berupa kuncup. Kuncup tersebut akan berkembang menjadi daun ataupun bunga. Pembentukan tunas pada kultur *in vitro* lebih sering diinduksi lebih dahulu dibandingkan dengan akar terkait dengan mekanisme fotosintesis kultur berlangsung secara optimal (Hartanti, 2012).

Perbandingan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin menentukan tinggi tanaman dan jumlah tunas yang dihasilkan (Rahayu, 2013). Hasil analisis terhadap kedinian tunas pada Tabel 4.5 menunjukkan bahwa pemberian BAP berpengaruh nyata terhadap kedinian tunas. Respon tercepat kemunculan tunas pada konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dengan rata-rata waktu 19,2 hari, dilanjutkan pada konsentrasi 1 ppm 2,4-D yaitu 24,8 hari dan respon terlama pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D selama 30,2 hari, sedangkan pada konsentrasi 1,5 dan 2 ppm 2,4-D tidak mampu menginduksi tunas disajikan pada Gambar 4.4. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan George (2008), bahwa keberadaan hormon auksin yang tinggi dapat menghambat kerja sitokinin sehingga menyebabkan proses pembentukan tunas terhambat dan memicu pertumbuhan kalus dan menginisiasi terbentuknya akar. Sehingga pada konsentrasi 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D tidak terbentuk tunas karena konsentrasinya lebih tinggi daripada konsentrasi BAP yang digunakan yaitu 0,5 ppm.

Kombinasi perlakuan antara 2,4-D dan BAP menghasilkan jumlah eksplan bertunas dan berakar yang berbeda. Terbentuknya tunas menunjukkan keberhasilan regenerasi eksplan yang diinokulasi pada media kultur jaringan. Jumlah tunas juga menjadi faktor terpenting dalam multiplikasi tanaman pada kultur jaringan. Jumlah tunas diindikasikan sebagai keberhasilan dalam multiplikasi. Semakin banyak tunas yang terbentuk, dapat dilakukan multiplikasi kultur untuk mendapatkan tunas-tunas baru dalam jumlah yang semakin banyak juga (Hanizah, 2013). Pada penelitian ini pengamatan terhadap jumlah tunas dilakukan setelah 7 MST kalus yang disubkultur kedalam media BAP 0,5 ppm. Pemberian BAP kedalam media MS juga berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah tunas yang muncul pada permukaan kalus. Rata-rata tunas terbanyak muncul pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D yaitu sebanyak 9 tunas. Jumlah rata-rata terbanyak selanjutnya yaitu pada konsentrasi 0,5 ppm dan 1 ppm 2,4-D dengan jumlah tunas sebanyak 3 tunas dan 1 tunas. Respon paling lambat yaitu pada konsentrasi 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D karena kalus tidak mampu membentuk tunas (Gambar 4.4). Sehingga konsentrasi 0 ppm 2,4-D adalah konsentrasi paling baik untuk multiplikasi tunas dengan kombinasi 0,5 ppm BAP, karena BAP lebih memicu pembentukan tunas dan pembelahan sel namun cenderung menghambat pembentukan akar. Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hanizah (2013) dimana pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D dan 3 ppm BAP mampu menginduksi tunas pada eksplan buah naga sebesar 5,38 tunas. Hal tersebut membuktikan bahwa sitokinin sangat efektif untuk menginisiasi tunas secara langsung maupun tidak langsung.

Trisna (2013) menjelaskan, bahwa tanaman dapat menyerap nutrisi termasuk zat pengatur tumbuh dari semua permukaan sel tanaman. Penyerapan yang terjadi pada hampir semua permukaan tanaman menyebabkan kompetensi sel atau jaringan untuk tumbuh dan berkembang membentuk organ baru lebih besar sehingga pembentukan tunas dan daun lebih banyak. Zat pengatur tumbuh yang digunakan berperan sebagai biokatalisator yang mempercepat sintesis berbagai senyawa didalam sel tanaman dan meningkatkan kapasitas tanaman

dalam mempergunakan cadangan yang tersedia dalam pembentukan organ tanaman baru.

Salah satu indikator terbentuknya tunas adalah munculnya daun. Daun merupakan tempat terjadinya asimilasi, dimana bahan-bahan anorganik dari dalam tanah akan mengalami proses metabolisme menjadi bahan-bahan organik tanaman dalam bentuk energi tumbuh (Trisna, 2013). Rata-rata jumlah daun pada Tabel 4.5 yang terbentuk pada tunas terlihat bahwa jumlah daun terbanyak dimiliki pada jumlah tunas terbanyak yaitu 0 ppm 2,4-D yang menghasilkan jumlah daun sebanyak 29,8 daun. Jumlah terbanyak kedua yaitu pada konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dengan jumlah daun 10,6 daun, dan jumlah daun paling sedikit pada konsentrasi 1 ppm 2,4-D yaitu 4,2 daun. Pada konsentrasi 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D tidak terdapat daun karena tidak ada tunas yang muncul pada kalus. Hal ini dikarenakan konsentrasi auksin (2,4-D) lebih tinggi daripada konsentrasi sitokinin (BAP) yang mengakibatkan induksi tunas terhambat sehingga penambahan BAP dalam media MS berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah daun pada eksplan. Yelnititis (1999), menyatakan bahwa penambahan sitokinin dapat mendorong meningkatnya jumlah dan ukuran daun.

Pertumbuhan yaitu proses penambahan massa yang meliputi ukuran dan volume yang irreversibel. Penambahan tinggi tunas dapat digunakan sebagai indikator pola laju pertumbuhan tanaman selama kultur. Pemberian BAP berpengaruh nyata terhadap tinggi tunas. Hasil analisis pada Tabel 4.5 menunjukkan bahwa rata-rata tinggi tunas tertinggi adalah pada konsentrasi 0 ppm 2,4-D yaitu 1,33 cm, dilanjutkan pada konsentrasi 0,5 ppm dan 1 ppm 2,4-D secara berurutan yaitu sebesar 1,02 cm dan 0,84 cm, sedangkan pada konsentrasi 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D tidak menghasilkan tunas.

Pangamatan terhadap persentase terbentuknya tunas dilakukan pada 4 MST dan 8 MST. Hasil yang diperoleh pada 4 MST yaitu eksplan yang betunas hanya pada konsentrasi 0 ppm dan 0,5 ppm 2,4-D dengan persentase 40% dan 20% (Tabel 4.7). Rata-rata persentase tunas pada 8 MST mengalami peningkatan, khususnya pada konsentrasi 0 ppm, 0,5 ppm dan 1 ppm 2,4-D, sedangkan pada konsentrasi 1,5 ppm dan 2 ppm 2,4-D tetap 0% karena sampai pada akhir

pengamatan tidak ditemukan adanya tunas yang muncul pada permukaan kalus. Peningkatan paling besar terdapat pada konsentrasi 0 ppm dan 1 ppm 2,4-D yaitu sebesar 60%, pada 0,5 ppm mengalami peningkatan sebesar 40%. Sehingga konsentrasi 0 ppm 2,4-D menjadi konsentrasi optimum untuk menginduksi tunas pada kalus, karena semua eksplan pada konsentrasi tersebut muncul tunas.

Warna dan tekstur kalus merupakan indikasi dimulainya respon organogenesis. Kalus akan terus menerus berpoliferasi membentuk jaringan dasar yang bersifat meristematis dan akan berdiferensiasi ke bentuk yang lebih spesifik. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Penambahan zat pengatur tumbuh sitokinin dan stimulus cahaya menyebabkan protoplas yang terdapat didalam jaringan dasar tersebut berdiferensiasi menjadi plastid yang mengandung klorofil, sehingga kalus berubah menjadi berwarna hijau. Kalus yang berwarna hijau mengandung klorofil merupakan tempat munculnya tunas (Fatmawati, 2010). Perbedaan kemampuan jaringan menyerap unsur hara dan zat pengatur tumbuh dalam media dapat mengakibatkan kalus yang dihasilkan tidak embriogenik yang ditandai dengan tekstur kalus yang cenderung kompak (Ibrahim, 2010).

Pada tahap regenerasi tunas, kalus yang digunakan adalah kalus embriogenik yang dihasilkan dari perlakuan pertama yaitu dengan penggunaan zat pengatur tumbuh 2,4-D. Hal ini dilakukan berkaitan dengan struktur kalus yang menggambarkan kemampuan dan daya regenerasi kalus dalam membentuk organ tanaman. Kalus embriogenik mempunyai kemampuan lebih tinggi untuk membentuk organ (tunas, daun, dan akar) daripada kalus yang non embriogenik (Sukmadjaja, 2011). Kalus embriogenik pada umumnya ditandai dengan bentuknya yang friable, tidak berair, memiliki green spot dan berwarna kehijauan. Sedangkan kalus non embriogenik adalah kalus yang sulit untuk diregenerasikan dengan tanda-tanda berair, berwarna kuning pucat, dan tidak memiliki struktur globular (Sujatmiko, 2012). Kalus embriogenik dan kalus non embriogenik disajikan pada Tabel 4.6.

Diferensiasi kalus menjadi tunas diawali dengan pembentukan pusat aktivitas meristematik (meristemoid) pada kalus yang mengarah pada pembentukan organ (Ali, 2008). Berlainan dengan jalur embriogenesis somatik, kalus yang terbentuk selanjutnya membentuk unit yang menyerupai embrio (embrioid) yang memiliki dua calon meristem dan selanjutnya akan melewati tahap pendewasaan dan perkecambahan (Purnamaningsih, 2002).

Akar merupakan organ tanaman yang berfungsi untuk menyerap nutrisi (unsur hara) baik makro maupun mikro dari media tumbuh yang digunakan dalam proses tumbuh dan berkembangnya tanaman. Pembentukan akar pada kultur jaringan dapat terjadi secara langsung pada eksplan yang ditanam, baik dari jaringan maupun dari kalus apabila kedalam media tumbuh diberikan auksin yang mencukupi (Yuniastuti, 2010). Tunas yang muncul pada permukaan kalus tidak semuanya mampu menginduksi akar, hanya beberapa eksplan saja yang berakar. Eksplan dengan konsentrasi 0,5 ppm dan 1 ppm 2,4-D berhasil membentuk sistim perakaran (Gambar 4.8). Pengamatan dilakukan pada 8 MST dengan rata-rata akar yang terbentuk yaitu sebesar 20% ditunjukkan pada Tabel 4.8 Pada konsentrasi 0 ppm tunas yang dihasilkan tidak dapat menginduksi perakaran, sehingga terbukti bahwa keberadaan auksin (2,4-D) berperan sebagai penginduksi perakaran pada tunas.

Desriatin (2011) menjelaskan bahwa untuk menumbuhkan akar hanya diperlukan auksin tanpa sitokinin atau dengan sitokinin tetapi dalam konsentrasi rendah. Formulasi media induksi perakaran yang mengandung auksin sangat menentukan keberhasilan pembentukan akar pada tanaman yang dikulturkan secara *in vitro*. Auksin secara alami disintesis pada jaringan apikal meristem yang kemudian ditransportasikan secara basipetal ke bagian bawah untuk memacu pembentukan dan pertumbuhan akar (Sukmadjaja, 2011).

Ali (2007), juga menyatakan bahwa konsentrasi hormon pertumbuhan pada medium kultur jaringan sangat berperan dalam morfogenesis. Keseimbangan sitokinin dan auksin mengatur pertumbuhan pembentukan akar, tunas dan kalus pada kultur *in vitro*. Auksin dan sitokinin berperan dalam pertumbuhan tunas aksilar dan akar lateral. Oleh karena itu untuk mendapatkan hasil kultur jaringan

tembakau yang optimal diperlukan kombinasi komposisi ZPT berupa hormon auksin dan sitokinin yang tepat. Perbandingan auksin dan sitokinin yang digunakan dalam penelitian Ali (2007) dan Hendaryono (1994) adalah 2:3.

Konsentrasi auksin lebih rendah daripada sitokinin menyebabkan organogenesis mengarah pada pertumbuhan tunas, apabila auksin lebih tinggi daripada sitokinin maka organogenesis akan mengarah pada pembentukan akar (Fatmawati, 2010). Penelitian yang dilakukan pada eksplan yang diinokulasikan pada medium dengan penambahan BAP dan 0 ppm 2,4-D dapat menginduksi tunas Gambar 4.4. Hal ini menunjukkan bahwa sitokinin sangat efektif dalam memicu pertumbuhan tunas baik secara langsung maupun tidak langsung. Setiap eksplan mengandung hormon yang berbeda-beda sehingga masing-masing eksplan menunjukkan pembentukan organ yang berbeda pula. Hal ini semakin menegaskan bahwa komposisi zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap perbanyakan tanaman secara *in vitro*, baik pada tahap inisiasi kalus, poliferasi tunas, maupun pembentukan akar (Hartanti, 2012).

Salisbury (1991), mengatakan bahwa sitokinin mendorong pembelahan sel dalam kultur jaringan dengan cara mempersingkat waktu berlangsungnya fase S dalam siklus sel (dari G2 ke mitosis), hal ini terjadi karena sitokinin menaikkan laju sintesis protein. Beberapa protein tersebut berupa protein pembangun atau enzim yang dibutuhkan untuk mitosis. Dalam pembelahan sel sitokinin berperan dalam transisi fase G1 dan fase G2 M dengan meningkatkan aktifitas fosforilasi sel. Fase (G1 = Gap1) merupakan fase dimana pertumbuhan terjadi meningkatnya kuantitas organela dan meningkatnya volume sitoplasma. Setelah fase G1 siap maka sel akan segera memasuki fase S. Fase S adalah saat terjadinya sintesa DNA yang menghasilkan replikasi DNA yang identik dengan DNA induk. Fase S diikuti oleh fase G2 dimana sel mempersiapkan diri untuk melakukan mitosis. Sedangkan fase M adalah fase mitosis dimana terjadi pembelahan inti (pemisahan kromosom) dan pemisahan sitoplasma (Fatmawati, 2010).

Sitokinin berperan dalam metabolisme asam nukleat dan sintesis protein. Dengan perubahan metabolisme tersebut pada daerah tempat diberikannya sitokinin akan menyebabkan terjadinya penimbunan asam-asam amino, fosfat,

gula dan bahan-bahan lain (Wattimena, 1988). Regenerasi tunas dari kalus merupakan proses yang kompleks, karena dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya genotipe, tipe eksplan, dan keseimbangan zat pengatur tumbuh, dalam hal ini auksin dan sitokinin serta kondisi fisiologi kalus (Khumaida, 2013).



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan yaitu pengaruh konsentrasi hormon 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) terhadap induksi kalus daun tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) melalui kultur *in vitro* dapat disimpulkan bahwa :

1. Terdapat pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh terhadap induksi kalus tanaman tembakau (*N. tabacum* L.).
2. Konsentrasi optimal zat pengatur tumbuh 2,4-D yang memberikan induksi kalus terbaik adalah pada konsentrasi 1,5 ppm dengan waktu yang dibutuhkan yaitu 24,4 HST.
3. Konsentrasi optimal zat pengatur tumbuh 2,4-D yang memberikan induksi tunas terbaik adalah pada konsentrasi 0,5 ppm dengan waktu yang dibutuhkan yaitu 19,20 HST.

5.2 Saran

1. Dalam mengetahui pengaruh pemberian 2,4-D terhadap tanaman tembakau sebaiknya menggunakan variasi konsentrasi yang lebih tinggi untuk mengetahui batas optimal 2,4-D dalam menginduksi kalus.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A., S. Naz, F.A. Siddiqui, and J. Iqbal. 2008. Rapid Clonal Multiplication of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) Trough Callogenesis and Organogenesis. *Pak. J. Bot.* 4(11) : 123-138.
- Amin, dkk. 2007. Induksi Kalus dari Daun Nilam Kultivar Lhoksemauwe, Sidikalang, dan Tapaktuan dengan 2,4-D. *Zuriat.* 18 (2).
- Anggraeni, T. D. A., E. Sulistyowati., dan R. D. Purwati. 2012. Pengaruh Komposisi Media dan Sumber Eksplan Terhadap Induksi Kalus, Perkecambahan, dan Pertumbuhan Tunas Embrio Somatik Jarak Pagar. *Buletin Tanaman Tembakau, Serat & Minyak Industri.* 4(2) : 76–84. ISSN 2085-6717.
- Anonim. 2014. <http://www.forestryimages.org> / [13 Desember 2014]
- Anonim. 2014. <http://ipmworld.umn.edu/chapterswareherb2,4-D/> [13 Desember 2014]
- Anonim. 2015. [http:// plantandsoil.unl.edu](http://plantandsoil.unl.edu) [10 April 2015]
- Anonim. 2014. [http:// www.phytotechlab.com](http://www.phytotechlab.com) [6 Maret 2015]
- Arianto., B. Zainudin., dan U. B. Mirni. 2013. Induksi Kalus Dua Klon Kakao (*Theobroma cacao* L.) Unggul Sulawesi Pada Berbagai Konsentrasi 2,4 Dichlorophenoxy Acetic Acid Secara *In Vitro*. *e-J. Agrotekbis.* 1 (3) : 211-22.
- Arimasetiowati, R., dan F. Ardiyani. 2012. Pengaruh Penambahan Auxin Terhadap Pertunasan dan Perakaran Kopi Arabika Perbanyak Somatik Embriogenesis. *Pelita Perkebunan.* 28(2) : 82-90.
- Campbell. 2005. *Biologi Edisi Kelima Jilid 3*. Jakarta: Erlangga.
- Desriatin, N. L. 2010. Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh IAA dan Kinetin terhadap Morfogenesis pada Kultur *In Vitro* Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum* L. var. *Prancak-95*). *Kultur Jaringan Tembakau*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

- Djajadi. 2013. Tembakau Cerutu Besuki-NO: Pengembangan Areal dan Permasalahannya di Jember Selatan. *Perspektif*. 7 (1) : 1412-8004.
- Fang, J. Y., A. Wetten., R. A. Gyamfi., M. Wilkinson., dan C. R. Lopez. 2009. Use of Secondary Somatic Embryos Promotes Genetic Fidelity in Cryopreservation of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Agricultural and Food Science*. 18 : 152-159.
- Fatmawati, T. A., T. Nurhidayati, dan N. Jadid. 2010. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh IAA dan BAP pada Kultur Jaringan Tembakau *Nicotiana tabacum* L. VAR. Prancak 95. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Fitri, M. S., Z. Thomy., dan E. Harnelly. 2012. *In-Vitro* Effect of Combined Indole Butyric Acid (IBA) and Benzil Amino Purine (BAP) on the Planlet Growth of *Jatropha curcas* L. *Jurnal Natural*. 12 (1) : 1-5.
- Gaj, M. D. 2001. Direct Somatic Embryogenesis as a rapid and Efficient System for *In Vitro* Regeneration of *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Cell and Organ Culture*. 64 : 39-46.
- George, E. F., M. A. Hall dan G. D. Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. *Springer*. Wageningen.
- George, E.F. dan P.H. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. England: Eastern Press.
- Gunawan, L. W. 1988. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Laboratorium Kultur Jaringan. Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi. IPB : Bogor.
- Hanizah, R., I. Mahadi., dan S. Wulandari. 2013. Pengaruh 2,4-D dan BAP Terhadap Multiplikasi Tunas Eksplan Buah Naga (*Hylocereus costaricensis*) Melalui Teknik Kultur Jaringan Secara *In Vitro*.
- Hartanti M. F., T. Nurhidayati, M. Muryono. 2012. *Budidaya Tanaman Tembakau (Nicotiana Tabacum. L. Var. Prancak 95) pada Cekaman Kekeringan Polyethylene Glycol (PEG) secara in Vitro*. Jurnal dari Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam ITS Surabaya.
- Hendaryono, Daisy dkk. 1994. *Teknik Kultur Jaringan : Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman Secara Vegetatif-Modern*. Kanisius : Yogyakarta.

- Ibrahim, M. S. D., O. Rostiana., N. Khumaida. 2010. Pengaruh Umur Eksplan Terhadap Keberhasilan Pembentukan Kalus Embriogenik Pada Kultur Meristem Jahe (*Zingiber Officinale* Rosc). *Jurnal Littri*. 16 (1) : 37-42. ISSN 0853-8212.
- Ibrahim, M. S. D., Rr. S. Hartati., Rubiyo., A. Purwito., dan Sudarsono. 2013. Direct and Indirect Somatic Embryogenesis on Arabica Coffee (*Coffea arabica*). *Ind. J. Agric. Sci.* 14 (2) : 79-86.
- Kasutjjaningati, dan D. Boer. 2013. Mikropropagasi Pisang Mas Kirana (*Musa acuminata* L.) Memanfaatkan BAP dan NAA Secara *In-Vitro*. *Jurnal Agroteknos*. 3 (1) : 60-64. ISSN: 2087-7706.
- Khumaida, N., dan A. R. Fauzi. 2013. Induksi Tunas Ubi Kayu (*Mannihot esculenta* Crantz.) var. Adira 2 Secara *In vitro*. *J. Agron. Indonesia*. 41 (2) : 133-139.
- Malik, S. I., H. Rashid., T. Yasmin., dan N. M. Minhas. 2003. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on Callus Induction from Mature Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seeds. *Int. J. Agri. Biol.* 6 (1).
- Maryani, Y., dan Zamroni. 2005. Penggandaan Tunas Krisan Melalui Kultur Jaringan. *Ilmu Pertanian*. 12 (1) : 51-55.
- Matnawi, H. 1997. *Budi Daya Tembakau Bawah Naungan*. Yogyakarta : Kanisius.
- Mulyono, D. 2010. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Auksin: Indole Butiric Acid (IBA) dan Sitokinin: Benzil Amino Purine (BAP) dan Kinetin Dalam Elongasi Pertunasan Gaharu (*Aquilaria beccariana*). *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. 12 (1) : 1-7.
- Mustafa, G., dan M. S. Khan. 2012. Reproducible *In Vitro* Regeneration System for Purifying Sugarcane Clones. *African Journal of Biotechnology*. 11 (42) : 9961-9969. ISSN 1684-5315.
- 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. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 1 (1) : 1-6.

- Omar, G. F., F. H. Mohamed., K. T. Haensch., S. H. Sarg., dan M. M. Morsey. 2013. Somatic Embryo-Like Structures of Strawberry Regenerated *In Vitro* on Media Supplemented with 2,4-D and BAP. *Indian Journal of Eksperimental Biology*. 51 : 739-745.
- Plantamor. 2014. Klasifikasi Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). Serial online <http://www.plantamor.com> [14 Oktober 2014]
- Purba, H. I. 2009. *Pengaruh Jenis Media dan Konsentrasi Picloram Terhadap Induksi Embrio Somatik Manggis (Garcinia mangostana L.)*. Bogor: Program Studi Hortikultura Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Bul. Agrobio*. 5(2) : 51-58.
- Purwitasari, A, Tri., M. A. Alamsjah., dan B. S. Rahardja. 2012. Pengaruh Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (Asam-2,4-Diklorofenoksiasetat) Terhadap Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Marine and Coastal Science*. 1(2) : 61 – 70.
- Rahayu, S., Yulidar., dan I. Dwimahyani. 2013. Pengaruh BAP Terhadap Pertumbuhan Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) Hasil Iradiasi Dengan Sinar Gamma. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Nuklir*. PTNBR - BATAN : Bandung.
- Rianawati, S., A. Purwito., B. Marwoto., R. Kurniati., dan Suryanah. 2009. Embriogenesis Somatik dari Eksplan Daun Anggrek *Phalaenopsis* sp L. *J. Agron. Indonesia*. 37 (3) : 240 – 248.
- Salisbury, F. B dan C.W. Ross. 1992. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 3*. Bandung : ITB.
- Setyawati., Morisco., dan T.A. Prayitno. 2009. Pengaruh Ekstrak Tembakau Terhadap Sifat dan Perilaku Mekanik Laminasi Bambu Petung. *Forum Teknik Sipil*. (XIX/1) : 1021-1029.
- Silaban, M. M., J. Ginting., dan A. Barus. 2013. Respons Pertumbuhan Tembakau Deli (*Nicotiana tabacum* (L.)) pada Beberapa Jenis kapur dan Tanah di Sumatera Utara. *Jurnal Online Agroekoteknologi*. 1 (3) : 2337-6597.

- Sitorus, E. N., E. D. Hastuti., dan N. Setiari. 2011. Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) Secara *In Vitro* Pada Media Murashige & Skoog Dengan Konsentrasi Sukrosa Yang Berbeda. *Bioma*. 13 (1) : 1410-8801.
- Smiullah., F. A. Khan., Abdullah., R. Iftikhar., M. M. Raza., R. Aslam., G. Hammad., A. Ijaz, R. H. Masqood., dan U. Ijaz. 2013. Callogenesis and Organogenesis Studies in Some Accessions of *Saccharum officinarum* L. *Journal of Agricultural Science*. 5 (4) : ISSN 1916-9752.
- Suhara, C. dan T. Yulianti. 2009. Ketahanan Aksesi Plasma Nutfah Tembakau Cerutu terhadap Penyakit Lanas dan Busuk Batang Berlubang. *Tanaman Tembakau, Serat & Minyak Industri*. 1 (1) : 17-27.
- Sujatmiko, B., E. Sulistyaningsih., dan R. H. Murti. 2012. Studi Ketahanan Melon (*Cucumis melo* L.) terhadap Layu Fusarium Secara *In-Vitro* dan Kaitannya dengan Asam Salisilat. *Ilmu Pertanian*. 15 (2) : 1-18.
- Sukmadjaja, D., dan A. Mulyana. 2011. Regenerasi dan Pertumbuhan Beberapa Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) secara *In Vitro*. *Jurnal AgroBiogen*. 7(2) : 106-118.
- Suyitno Al. MS., dan V. Henuhili. 2011. Induksi Kalus dan Organogenesis Tanaman Ngu kilo (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) dengan 2,4-D dan Kombinasi NAA-Air Kelapa Secara *In Vitro*. Prosiding Seminar Nasional "Biology and Local Wisdom; Past Present and Future", *Jurdik Biologi*, MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta.
- Trimulyono, G., Solichatun., dan S. D. Marlina. 2004. Pertumbuhan Kalus dan Kandungan Minyak Atsiri Nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.) dengan Perlakuan Asam α -Naftalen Asetat (NAA) dan Kinetin. *Biofarmasi*. 2 (1) : 9-14. ISSN 1693-2242.
- Trisna, N., H. Umar., dan Irmasari. 2013. Pengaruh Berbagai Jenis Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Pertumbuhan Stump Jati (*Tectona grandis* L.F). *Warta Rimba*. 1 (1).
- Wattanawikkit, P., E. Bunn., K. Chayanarit., dan S. Tantiwiwat. 2011. Effect of Cytokinins (BAP and TDZ) and Auxin (2,4-D) on Growth and Development of *Paphiopedilum callosum*. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 45 (1) : 12-19.
- Wattimena, G. A. 1988. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: IPB Press.

- Wetter, L. R. 1991. *Metode Kultur Jaringan Tanaman Edisi Kedua*. Bandung : ITB.
- Winarto,B. 2010. Aplikasi 2,4-D dan TDZ dalam Pembentukan dan Regenerasi Kalus pada Kultur Anther Anthurium. *J. Hort.* 20 (1) : 1-9.
- Wulandari, S., I. Mahadi., dan R. Hanizah. 2013. Pengembangan Sumber Belajar Konsep Bioteknologi Berbasis Riset Pengaruh 2.4 D dan BAP Terhadap Multiplikasi Eksplan Buah Naga (*Hylocereus costaricensis*) Melalui Teknik Kultur Jaringan. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*.
- Yelnititis, N., Bermawie, dan Syafaruddin, 1999. Perbanyak Klon Lada Varietas Panniyur secara *In Vitro*. *Jurnal penelitian Tanaman Industri*. 5 (3): 109-114.
- Yuniastuti, E., Praswanto., dan I. Harminingsih. 2010. Pengaruh Konsentrasi BAP Terhadap Multiplikasi Tunas Anthurium (*Anthurium andraeanum* Linden) Pada Beberapa Media Dasar Secara *In Vitro*. *Caraka Tani*. XXV (1).
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta : Bumi Aksara.
- Zulkarnain, dan Lizawati. 2011. Proliferasi Kalus dari Eksplan Hipokotil dan Kotiledon Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) pada Pemberian 2,4-D. *Jurnal Natur Indonesia*. 14 (1) : 19-25. ISSN 1410-9.

LAMPIRAN A. MATRIKS PENELITIAN

MATRIKS PENELITIAN

Judul	Rumusan Masalah	Jenis Data	Variabel	Indikator	Metode Penelitian	Hipotesis
<p>Pengaruh Konsentrasi Hormon 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) terhadap Induksi Kalus Daun Tembakau (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) melalui Kultur <i>In Vitro</i></p>	<p>3. Adakah pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau (<i>N. tabacum</i> L)?</p> <p>4. Berapakah konsentrasi optimal zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau (<i>N. tabacum</i> L.)?</p>	<p>1. Data primer dalam penelitian ini adalah hasil pengamatan yang dilakukan terhadap pengaruh hormon 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau.</p> <p>2. Data sekunder yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari internet, jurnal, berbagai buku yang mendukung lengkapnya informasi yang dibutuhkan.</p>	<p>1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ZPT yaitu 2,4-D yang digunakan adalah 0 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm dan 2 ppm.</p> <p>2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah induksi kalus yang terbentuk dari daun tembakau yang dikultur.</p> <p>3. Variabel terkendali dari penelitian ini adalah ukuran botol kultur, media MS (<i>Murashige and Skoog</i>), volume media, pH, suhu, cahaya, dan waktu pengamatan.</p>	<p>1. Waktu inisiasi kalus.</p> <p>2. Berat basah kalus.</p> <p>3. Persentase terbentuknya kalus.</p> <p>4. Morfologi kalus.</p>	<p>Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lebkap (RAL) dengan faktor tunggal, yaitu konsentrasi 2,4-D. setelah diperoleh data dianalisis dengan Analysis of varian (ANOVA) dan apabila terdapat yang signifikan dilanjutkan dengan uji <i>Duncan Multiple Range Test</i> (DMRT).</p>	<p>3. Terdapat pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau (<i>N. tabacum</i> L.).</p> <p>4. Konsentrasi optimal zat pengatur tumbuh 2,4-D terhadap induksi kalus tembakau (<i>N. tabacum</i> L.) adalah 1,5 ppm.</p>

Lampiran B. Komposisi Larutan Stok Media MS

Stok	Bahan Kimia	MS (mg/L)	Pengambilan (ml/L)	Penimbangan g/L (Pembuatan stok 1L)	
A	NH ₄ NO ₃	1650	20	82,5	
B	KNO ₃	1900	20	95	
C	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	10	44	
D	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	10	37	
	KH ₂ .4H ₂ O	170		17	
E	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	5	5,57	
	NaEDTA	37,3		7,45	
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3		4,46	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6		1,72	
F	H ₃ BO ₃	6,2	5	1,24	
	KI	0,83		0,166	
	NaMoO ₄ .H ₂ O	0,25		0,05	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025		0,005	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025		0,005	
	Mio-inositol	100		10	10
	Thiamine HCL	0,1			0,1
Vitamin	Nicotinic HCL	0,5	1	0,5	
	Pyridoxine HCL	0,5		0,5	
Sukrosa			30		
Agar			8		

Lampiran C. Kedinian Kalus**C.1 Data Pengamatan Kedinian Kalus**

Perlakuan (ppm)	Ulangan (U)					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	29	28	30	33	33	153	30,6
1	34	34	30	32	35	165	33
1,5	22	22	27	25	26	122	24,4
2	29	28	29	28	27	141	28,2
Total	114	112	116	118	121	581	
Rata-rata	22,8	22,4	23,2	23,6	24,2	116,2	

C.2 Sidik Ragam Kedinian Kalus

FK = 13502,44

Sumber Keragaman (SK)	Derajat Kebebasan (DB)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F-Hitung		F-Tabel	
						5%	1%
Perlakuan	4	3577,36	894,34	278,18	**	3,01	4,77
Ulangan	4	9,76	2,44	0,76	tn	3,01	4,77
Error (Galat)	16	51,44	3,22				
Total	24	3638,56					

Keterangan :

tn = tidak berpengaruh nyata, * = berpengaruh nyata, ** = berpengaruh sangat nyata

C.3 Uji Beda Duncan Kedinian Kalus

Perlakuan (ppm)	Rata-rata	1	0,5	2	1,5	0
		33	30,6	28,2	24,4	0
1	33	0				
0,5	30,6	2,4	0			
2	28,2	4,8	2,4	0		
1,5	24,4	8,6	6,2	3,8	0	
0	0	33	30,6	28,2	24,4	0
P		2	3	4	5	
SSR 5%		3	3,15	3,23	3,3	
DMRT 95%		2,41	2,53	2,59	2,65	
NOTASI ^{*)}		a	ab	b	c	d

^{*)} Keterangan : Huruf yang sama pada kolom notasi menunjukkan interaksi tidak berpengaruh nyata menurut uji Duncan pada taraf nyata 95%

Lampiran D. Berat Basah Kalus**D.1 Data Pengamatan Berat Basah Kalus**

Perlakuan (ppm)	Ulangan (U)					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
0	0,37	0,38	0,53	0,3	0,3	1,88	0,38
0,5	1,72	1,56	2,08	1,34	1,84	8,54	1,71
1	0,55	1,2	1,99	1,21	1,11	6,06	1,21
1,5	1,08	1,28	0,96	0,59	1,03	4,94	0,99
2	0,91	0,66	1,34	0,41	0,79	4,11	0,82
Total	4,63	5,08	6,9	3,85	5,07	25,53	
Rata-rata	0,926	1,016	1,38	0,77	1,014	5,106	

D.2 Sidik Ragam Berat Basah Kalus

FK = 26,071236

Sumber Keragaman (SK)	Derajat Kebebasan (DB)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F-Hitung		F-Tabel	
						5%	1%
Perlakuan	4	4,83	1,21	17,15	**	3,01	4,77
Ulangan	4	1,00	0,25	3,57	*	3,01	4,77
Error (Galat)	16	1,13	0,07				
Total	24	6,96					

Keterangan :

tn = tidak berpengaruh nyata, * = berpengaruh nyata, ** = berpengaruh sangat nyata

D.3 Uji Beda Duncan Berat Basah Kalus

Perlakuan (ppm)	Rata-rata	0,5	1	1,5	2	0
		1,71	1,21	0,99	0,82	0,38
0,5	1,71	0				
1	1,21	0,50	0			
1,5	0,99	0,72	0,22	0		
2	0,82	0,89	0,39	0,17	0,00	
0	0,38	1,33	0,84	0,61	0,45	0
P		2	3	4	5	
SSR 5%		3	3,15	3,23	3,3	
DMRT 95%		0,36	0,37	0,38	0,39	
NOTASI ^{*)}		a	b	bc	c	d

^{*)} Keterangan : Huruf yang sama pada kolom notasi menunjukkan interaksi tidak berpengaruh nyata menurut uji Duncan pada taraf nyata 95%

Lampiran F. Kedinian Tunas

F.1 Data Pengamatan Kedinian Tunas

Perlakuan (ppm)	Ulangan (B)					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
0	25	30	33	31	32	151	30,2
0,5	27	0	0	30	39	96	19,2
1	47	32	45	0	0	124	24,8
1,5	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
Total	99	62	78	61	71	371	
Rata-rata	19,8	12,4	15,6	12,2	14,2	14,84	

F.2 Sidik Ragam Kedinian Tunas

FK = 5505,64

Sumber Keragaman (SK)	Derajat Kebebasan (DB)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F-Hitung		F-Tabel	
						5%	1%
Perlakuan	4	3972,96	993,24	4,76	*	3,01	4,77
Ulangan	4	192,56	48,14	0,23	tn	3,01	4,77
Error (Galat)	16	3335,84	208,49				
Total	24	7501,36					

Keterangan :

tn = tidak berpengaruh nyata, * = berpengaruh nyata, ** = berpengaruh sangat nyata

F.3 Uji Beda Duncan Kedinian Tunas

Perlakuan (ppm)	Rata-rata	0	1	0,5	1,5	2
		30,2	24,8	19,2	0	0
0	30,2	0				
1	24,8	5,4	0			
0,5	19,2	11	5,6	0		
1,5	0	30,2	24,8	19,2	0	
2	0	30,2	24,8	19,2	0	0
P		2	3	4	5	
SSR 5%		3	3,15	3,23	3,3	
DMRT 95%		19,37	20,34	20,86	21,31	
NOTASI *)		a	ab	ab	b	b

*) Keterangan : Huruf yang sama pada kolom notasi menunjukkan interaksi tidak berpengaruh nyata menurut uji Duncan pada taraf nyata 95%

Lampiran G. Jumlah Tunas**G.1 Data Pengamatan Jumlah Tunas**

Perlakuan (ppm)	Ulangan (B)					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
0	8	13	6	10	8	45	9
0,5	7	0	0	4	2	13	2,6
1	1	2	2	0	0	5	1
1,5	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
Total	16	15	8	14	10	63	
Rata-rata	3,2	3	1,6	2,8	2	2,52	

G.2 Sidik Ragam Jumlah Tunas

FK = 158,76

Sumber Keragaman (SK)	Derajat Kebebasan (DB)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F-Hitung		F-Tabel	
						5%	1%
Perlakuan	4	285,04	71,26	19,74	**	3,01	4,77
Ulangan	4	9,44	2,36	0,65	*	3,01	4,77
Error (Galat)	16	57,76	3,61				
Total	24	352,24					

Keterangan :

tn = tidak berpengaruh nyata, * = berpengaruh nyata, ** = berpengaruh sangat nyata

G.3 Uji Beda Duncan Jumlah Tunas

Perlakuan (ppm)	Rata-rata	0	0,5	1	1,5	2
		9	2,6	1	0	0
0	9	0				
0,5	2,6	6,4	0			
1	1	8	1,6	0		
1,5	0	9	2,6	1	0	
2	0	9	2,6	1	0	0
P		2	3	4	5	
SSR 5%		3	3,15	3,23	3,3	
DMRT 95%		2,55	2,68	2,74	2,80	
NOTASI		a	b	b	b	b

*) Keterangan : Huruf yang sama pada kolom notasi menunjukkan interaksi tidak berpengaruh nyata menurut uji Duncan pada taraf nyata 95%

Lampiran H. Jumlah Daun**H.1 Data Pengamatan Jumlah Daun**

Perlakuan (ppm)	Ulangan (B)					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
0	26	51	28	23	21	149	29,8
0,5	34	3	0	12	4	53	10,6
1	3	7	11	0	0	21	4,2
1,5	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
Total	63	61	39	35	25	223	
Rata-rata	12,6	12,2	7,8	7	5	8,92	

H.2 Sidik Ragam Jumlah Daun

FK = 1989,16

Sumber Keragaman (SK)	Derajat Kebebasan (DB)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F-Hitung		F-Tabel	
						5%	1%
Perlakuan	4	3101,04	775,26	10,15	**	3,01	4,77
Ulangan	4	223,04	55,76	0,73	tn	3,01	4,77
Error (Galat)	16	1221,76	76,36				
Total	24	4545,84					

Keterangan :

tn = tidak berpengaruh nyata, * = berpengaruh nyata, ** = berpengaruh sangat nyata

H.3 Uji Beda Duncan Jumlah Daun

Perlakuan (ppm)	Rata-rata	0	0,5	1	1,5	2
		29,8	10,6	4,2	0	0
0	29,8	0				
0,5	10,6	19,2	0			
1	4,2	25,6	6,4	0		
1,5	0	29,8	10,6	4,2	0	
2	0	29,8	10,6	4,2	0	0
P		2	3	4	5	
SSR 5%		3	3,15	3,23	3,3	
DMRT 95%		11,72	12,31	12,62	12,90	
NOTASI ^{*)}		a	b	b	b	b

^{*)} Keterangan : Huruf yang sama pada kolom notasi menunjukkan interaksi tidak berpengaruh nyata menurut uji Duncan pada taraf nyata 95%

Lampiran I. Tinggi Tunas

I.1 Data Pengamatan Tinggi Tunas

Perlakuan (ppm)	Ulangan (B)					Total	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
0	0,65	2,08	1,47	1,25	1,2	6,65	1,33
0,5	1,72	0	0	1,3	2,1	5,12	1,02
1	0,7	2,3	1,2	0	0	4,2	0,84
1,5	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
Total	3,07	4,38	2,67	2,55	3,3	15,97	
Rata-rata	0,61	0,88	0,53	0,51	0,66	0,64	

I.2 Sidik Ragam Tinggi Tunas

FK = 10,20

Sumber Keragaman (SK)	Derajat Kebebasan (DB)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F-Hitung		F-Tabel	
						5%	1%
Perlakuan	4	7,41	1,85	3,64	*	3,01	4,77
Ulangan	4	0,42	0,11	0,21	tn	3,01	4,77
Error (Galat)	16	8,15	0,51				
Total	24	15,99					

Keterangan :

tn = tidak berpengaruh nyata, * = berpengaruh nyata, ** = berpengaruh sangat nyata

I.3 Uji Beda Duncan Tinggi Tunas

Perlakuan (ppm)	Rata-rata	0	0,5	1	1,5	2
		1,33	1,02	0,84	0	0
0	1,33	0				
0,5	1,02	0,31	0			
1	0,84	0,49	0,18	0		
1,5	0	1,33	1,02	0,84	0	
2	0	1,33	1,02	0,84	0	0
P		2	3	4	5	
SSR 5%		3	3,15	3,23	3,3	
DMRT 95%		0,96	1,01	1,03	1,05	
NOTASI ^{*)}		a	a	ab	b	b

^{*)} Keterangan : Huruf yang sama pada kolom notasi menunjukkan interaksi tidak berpengaruh nyata menurut uji Duncan pada taraf nyata 95%

Lampiran J. Persentase Terbentuknya Tunas**J.1 Tabel Persentase Terbentuknya Tunas 4 MST**

Perlakuan (D)	Pengulangan (B)					Rata-rata
	B1	B2	B3	B4	B5	
D0	100%	100%	0%	0%	0%	40%
D1	100%	0%	0%	0%	0%	20%
D2	0%	0%	0%	0%	0%	0%
D3	0%	0%	0%	0%	0%	0%
D4	0%	0%	0%	0%	0%	0%

J.2 Tabel Persentase Terbentuknya Tunas 8 MST

Perlakuan (D)	Pengulangan (B)					Rata-rata
	B1	B2	B3	B4	B5	
D0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
D1	100%	0%	0%	100%	100%	60%
D2	100%	100%	100%	0%	0%	60%
D3	0%	0%	0%	0%	0%	0%
D4	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Lampiran K. Persentase Eksplan Berakar**K.1 Tabel Persentase Eksplan Berakar 8 MST**

Perlakuan (D)	Pengulangan (B)					Rata-rata
	B1	B2	B3	B4	B5	
D0	0%	0%	0%	0%	0%	0%
D1	100%	0%	0%	0%	0%	20%
D2	0%	100%	0%	0%	0%	20%
D3	0%	0%	0%	0%	0%	0%
D4	0%	0%	0%	0%	0%	0%

