

**MIKROPROPAGASI *Curcuma xanthorrhiza* Roxb.
PADA BENTUK MEDIA DAN KOMBINASI ZPT**

SKRIPSI

Oleh:
EVI MUAKHIROH



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
MALANG**

2011

**MIKROPROPAGASI *Curcuma xanthorrhiza* Roxb.
PADA BENTUK MEDIA DAN KOMBINASI ZPT**

Oleh:
EVI MUAKHIROH
0610420016-42

SKRIPSI
Disampaikan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1)

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
MALANG**

2011

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Penelitian : MIKROPROPAGASI *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. PADA
BENTUK MEDIA DAN KOMBINASI ZPT

Nama Mahasiswa : EVI MUAKHIROH

NIM : 0610420016-42

Jurusan : Budidaya Pertanian

Program Studi : Hortikultura

Menyetujui : Dosen Pembimbing

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Dr. Ir. Moch. Dawam Maghfoer, MS.

NIP. 19570714 198103 1 004

Ir. Sukindar, MS.

NIP. 19540407 198610 1 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan,

Dr. Ir. Agus Suryanto, MS.

NIP. 19550818 198103 1 008

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan,

MAJELIS PENGUJI

Penguji I,

Penguji II,

Prof. Dr. Ir. Tatik Wardiyati, MS.
NIP. 19460201 197701 2 001

Ir. Sukindar, MS.
NIP. 19540407 198610 1 001

Penguji III,

Penguji IV,

Dr. Ir. Moch. Dawam Maghfoer, MS.
NIP. 19570714 198103 1 004

Dr. Ir. Nurul Aini, MS.
NIP. 19601012 198601 2 001

Tanggal Lulus:

RINGKASAN

Evi Muakhiroh. 0610420016-42. Mikropropagasi *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. Pada Bentuk Media dan Kombinasi ZPT. Dibawah Bimbingan Dr. Ir. Moch. Dawam Maghfoer, MS. sebagai Pembimbing Utama dan Ir. Sukindar, MS. sebagai Pembimbing Pendamping

Indonesia merupakan salah satu pusat keanekaragaman hayati, khususnya tanaman obat-obatan. Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan salah satu jenis tanaman obat asli Indonesia yang dibutuhkan dalam jumlah banyak oleh hampir semua pabrik jamu tradisional. Perkiraan kebutuhan akan temulawak pada tahun 2008 dikisarkan mencapai 37.568 ton (Pribadi, 2009). Padahal dari 465.257 ton total produksi biofarmaka, temulawak baru berkontribusi di kisaran 23.000 ton (Anonymous^a, 2010). Kenyataan ini memperlihatkan bahwa produksi temulawak masih belum mampu memenuhi permintaan pasar. Untuk itu perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan kuantitas temulawak. Salah satu cara untuk mendapatkan bibit dalam jumlah banyak dalam waktu yang singkat adalah dengan memperbanyak tanaman secara kultur jaringan. Dalam metode perbanyakan melalui kultur jaringan, pertumbuhan dan perkembangan eksplan dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya bentuk media dan zat pengatur tumbuh. Bentuk media yang digunakan berperan dalam pembentukan tunas dan akar *plantlet in vitro*. Sedangkan zat pengatur tumbuh berpengaruh dalam pembentukan pucuk, pemanjangan pucuk dan pembentukan akar.

Penelitian bertujuan untuk mendapatkan teknik mikropropagasi temulawak terbaik dengan menguji media dan kombinasi ZPT. Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini ialah (1) adanya interaksi antara media dan kombinasi ZPT terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan temulawak secara *in vitro*, (2) media cair akan menghasilkan jumlah tunas lebih banyak daripada media padat, dan (3) kombinasi ZPT (NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm) akan memberikan jumlah tunas terbanyak.

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai November 2010 di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Alat yang digunakan dalam penelitian ini, meliputi: alat-alat gelas: gelas beaker, gelas ukur, erlenmeyer, petridish, batang pengaduk, botol kultur; alat-alat *dissecting set*: *scalpel* dan pinset; alat sterilisasi: *Laminair Air Flow Cabinet* (LAFC), autoklaf, oven, lampu spiritus, dan penyemprot alkohol (*hand sprayer*); Penggojog (*shaker*); timbangan analitik; pipet tetes; pipet ukur; pH meter; larutan buffer; timer; lemari pendingin; rak kultur; kamera digital; TL 40 Watt; kertas label; kompor listrik; tissue; tissue steril; korek api; kertas; plastik penutup; gelang karet; cup kertas; kertas grafik; penggaris dan alat tulis. Bahan tanam (eksplan) yang digunakan dalam penelitian ini ialah *plantlet* temulawak klon Jember hasil perbanyakan *in vitro* di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Media yang

digunakan ialah media dasar Murashige and Skoog (MS), sukrosa 30 g.L⁻¹, caseinhydrolysate 0,05 g. L⁻¹, agar 0,67 g.L⁻¹, serta zat pengatur tumbuh NAA (*Naphthelene Acetic Acid*) 0,5 ppm dan BA (*Benzyl Adenin*). Bahan lain yang digunakan ialah alkohol (70% dan 96%), aquades steril, HCl 1N, NaOH 1N dan spiritus. Metode percobaan yang digunakan ialah RAL yang disusun secara faktorial dengan 2 faktor: (1) media (padat dan cair) dan (2) kombinasi ZPT; NAA 0,5 ppm dan BA (0,5; 1 dan 1,5 ppm). Dari kedua faktor, diperoleh 6 kombinasi perlakuan dan diulang sebanyak 4 kali. Setiap ulangan terdiri dari 3 botol kultur yang masing-masing berisi 2 eksplan.

Pengamatan per hari meliputi: persentase eksplan hidup (%), persentase eksplan terkontaminasi (%) dan inisiasi perkembangan eksplan (kalus, embrio atau organ). Pengamatan per minggu meliputi: jumlah tunas (per eksplan) , jumlah akar (per eksplan) dan jumlah daun (per eksplan). Pengamatan akhir pada 6 mss meliputi: panjang tunas (cm) per eksplan dan panjang akar (cm) per eksplan. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA) dan uji F pada taraf 5%. Apabila terdapat perbedaan, maka akan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada taraf 5%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi antara media dan kombinasi ZPT hanya terdapat pada variabel pengamatan panjang akar. Peningkatan konsentrasi BA sampai 1,5 ppm yang dikombinasikan dengan NAA 0,5 ppm pada media cair menghasilkan panjang akar lebih tinggi yaitu sebesar 3,78 cm. Perlakuan media berpengaruh nyata pada variabel inisiasi akar, jumlah tunas, jumlah akar, jumlah daun dan panjang tunas, sedangkan perlakuan kombinasi ZPT berpengaruh nyata pada variabel inisiasi akar, jumlah tunas dan jumlah akar. Perlakuan media cair menghasilkan jumlah tunas (4,03 tunas) lebih banyak dibandingkan perlakuan media padat (3,30 tunas). Sedangkan perlakuan kombinasi ZPT NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm menghasilkan jumlah tunas terbanyak dibandingkan perlakuan lain yaitu sebesar 4,33 tunas.

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Lumajang pada tanggal 13 Juni 1988 sebagai anak ke empat dari enam bersaudara dari pasangan Bapak Sugeng dan Ibu Mu'awanah.

Penulis memulai pendidikan akademik di TK Muslimat NU Pasirian Lumajang (1991-1994) dan melanjutkan ke MI Nurul Islam Pasirian Lumajang (1994-2000). Sekolah menengah pertama diselesaikan di MTs N Lumajang dan lulus pada tahun 2003 dan lulus dari MAN Lumajang pada tahun 2006. Pada tahun 2006, penulis melanjutkan studi strata satu (S-1) Program Studi Hortikultura Jurusan Budidaya Pertanian melalui jalur Seleksi Penerimaan Mahasiswa Baru (SPMB).



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan hidayah dan rahmatNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Mikropropagasi *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. Pada Bentuk Media dan Kombinasi ZPT”** yang diajukan sebagai salah satu syarat dalam rangka menyelesaikan studi di Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.

Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Dr. Ir. Moch. Dawam Maghfoer, MS. dan Ir. Sukindar, MS. atas bimbingan dan saran-saran yang sudah diberikan. Kepada Prof. Dr. Ir. Tatik Wardiyati, MS. atas arahan serta kepercayaan untuk melaksanakan penelitian ini. Kepada Dr. Ir. Agus Suryanto, MS. selaku Ketua Jurusan, serta semua pihak terkait yang telah meluangkan waktu dan tenaga dalam penyelesaian skripsi ini.

Penghargaan yang sedalam-dalamnya penulis sampaikan kepada Ibu, Bapak, beserta keluarga besar atas doa, kepercayaan serta dukungan yang senantiasa penulis rasakan, juga kepada Prof. Dr. Kyai H. Achmad Mudlor, SH. beserta keluarga atas percikan ilmu pengetahuan dan semangat spiritual yang setiap hari beliau berikan.

Akhirnya, segala kritik dan saran akan selalu penulis harapkan dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang berkesempatan membacanya.

Malang, Januari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|----------------|
| RINGKASAN | i |
| RIWAYAT HIDUP | iii |
| KATA PENGANTAR..... | iv |
| DAFTAR ISI..... | v |
| DAFTAR GAMBAR..... | vi |
| DAFTAR TABEL | vii |
| | |
| I. PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Tujuan Penelitian | 2 |
| 1.3 Hipotesis..... | 2 |
| | |
| II. TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Deskripsi Tanaman Temulawak..... | 3 |
| 2.2 Kultur Jaringan pada Famili Zingiberaceae | 5 |
| 2.3 Peranan Media pada Kultur Jaringan | 7 |
| 2.3 Peranan Zat Pengatur Tumbuh pada Kultur Jaringan | 8 |
| | |
| III. METODE | |
| 3.1 Tempat dan Waktu | 10 |
| 3.2 Alat dan Bahan..... | 10 |
| 3.3 Metode Penelitian..... | 11 |
| 3.4 Pelaksanaan penelitian | 12 |
| 3.5 Pengamatan | 15 |
| 3.6 Analisis Data | 16 |
| | |
| IV. HASIL DAN PEMBAHASAN | |
| 4.1 Hasil | 17 |
| 4.2 Pembahasan..... | 23 |
| | |
| V. KESIMPULAN DAN SARAN | |
| 5.1 Kesimpulan | 31 |
| 5.2 Saran..... | 31 |
| | |
| DAFTAR PUSTAKA | |
| LAMPIRAN | |



DAFTAR GAMBAR

| No. | Teks | Halaman |
|------------|---|----------------|
| 1. | Eksplan temulawak sebelum dipotong (a) dan sesudah dipotong (b) | 15 |
| 2. | Eksplan yang mengalami browning | 17 |
| 3. | Eksplan terkontaminasi pada media padat (a) dan media cair (b) | 18 |

Lampiran

| | | |
|----|---|----|
| 4. | Denah percobaan pada media padat (a) dan media cair (b) | 41 |
| 5. | <i>Plantlet</i> temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT pada 6 mss | 45 |



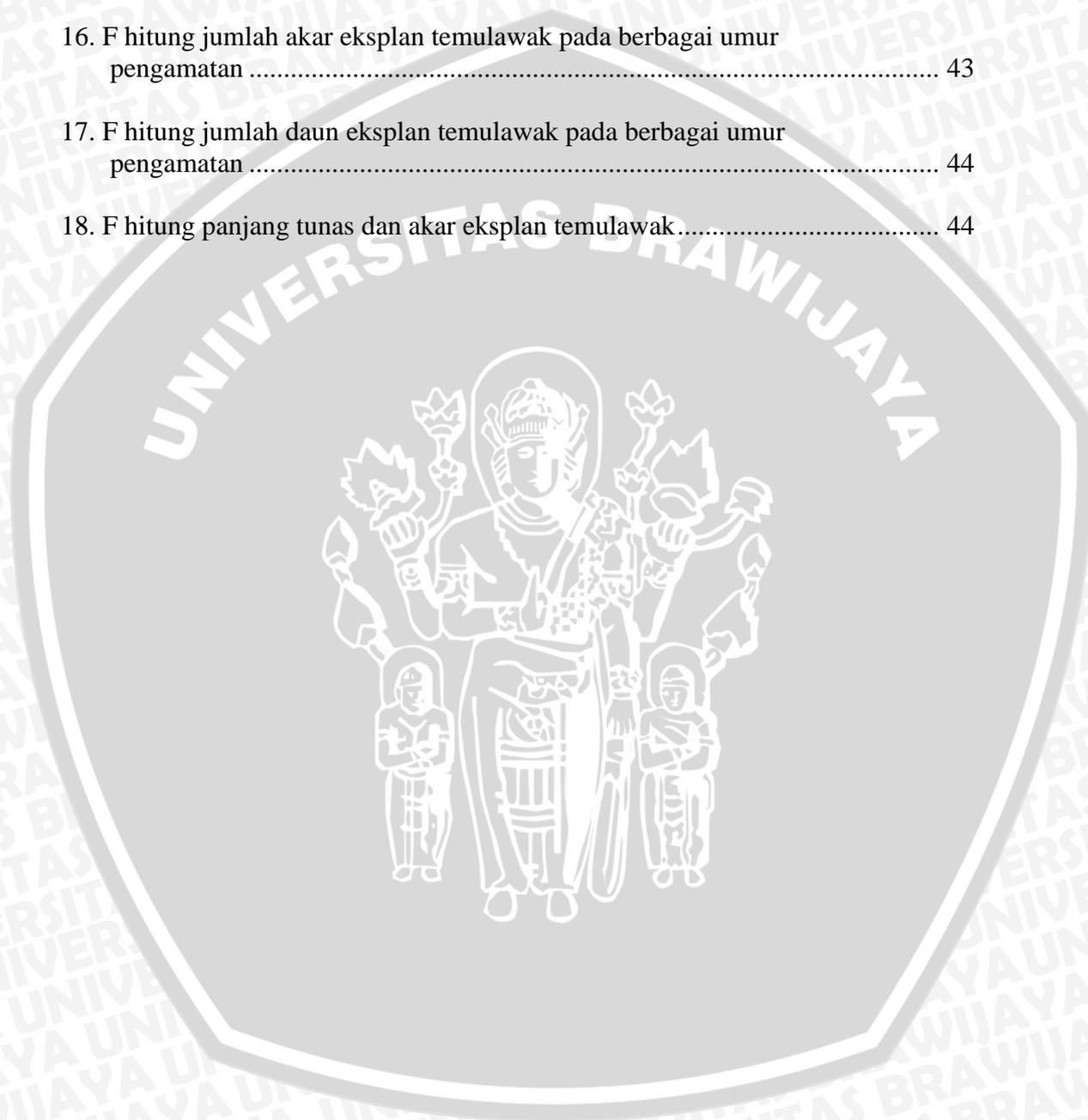
DAFTAR TABEL

| No. | Teks | Halaman |
|-----|---|---------|
| 1. | Komposisi pati pada rimpang temulawak (Afifah dan Tim, 2004) | 4 |
| 2. | Efek farmakologis zat aktif yang terkandung dalam rimpang temulawak (Afifah dan Tim, 2004) | 5 |
| 3. | Satuan kombinasi perlakuan media dan kombinasi ZPT pada mikropropagasi temulawak secara <i>in vitro</i> | 12 |
| 4. | Persentase eksplan temulawak hidup akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT | 17 |
| 5. | Persentase eksplan temulawak bebas kontaminasi akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT | 18 |
| 6. | Inisiasi perkembangan (hss) eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT | 19 |
| 7. | Jumlah tunas eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi PT pada berbagai umur pengamatan | 20 |
| 8. | Jumlah akar eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT pada berbagai umur pengamatan | 21 |
| 9. | Jumlah daun eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT pada berbagai umur pengamatan | 22 |
| 10. | Panjang tunas (cm) eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT pada 6 mss | 22 |
| 11. | Panjang akar (cm) eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT pada 6 mss | 23 |

Lampiran

| | | |
|-----|--|----|
| 12. | Komposisi media Murashige and Skoog (MS) modifikasi pada mikropropagasi temulawak (<i>Curcuma xanthorhiza</i> Roxb.)..... | 35 |
| 13. | Jumlah eksplan mati dan terkontaminasi | 42 |
| 14. | F hitung perkembangan eksplan..... | 43 |

| | |
|---|----|
| 15. F hitung jumlah tunas eksplan temulawak pada berbagai umur pengamatan | 43 |
| 16. F hitung jumlah akar eksplan temulawak pada berbagai umur pengamatan | 43 |
| 17. F hitung jumlah daun eksplan temulawak pada berbagai umur pengamatan | 44 |
| 18. F hitung panjang tunas dan akar eksplan temulawak..... | 44 |



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu pusat keanekaragaman hayati, khususnya tanaman obat-obatan. Temulawak (*Curucuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan salah satu jenis tanaman obat asli Indonesia yang dibutuhkan dalam jumlah banyak oleh hampir semua pabrik jamu tradisional. Perkiraan kebutuhan akan temulawak pada tahun 2008 dikisarkan mencapai 37.568 ton (Pribadi, 2009). Padahal dari 465.257 ton total produksi biofarmaka, temulawak baru berkontribusi di kisaran 23.000 ton (Anonymous, 2010^a). Kenyataan ini memperlihatkan bahwa produksi temulawak masih belum mampu memenuhi permintaan pasar.

Seiring dengan permintaan yang terus meningkat terhadap temulawak, maka timbul kekhawatiran terhadap jumlah bahan baku yang tersedia. Hal ini disebabkan penggunaan tanaman obat tidak diimbangi dengan pembudidayaan dan pelestarian plasma nutfahnya (Yuliani, 2001). Sampai saat ini, budidaya tanaman temulawak belum intensif dengan manajemen penanaman yang kurang baik (Wardiyati *et al.*, 2010), sehingga belum mencukupi permintaan konsumen. Faktor penting dalam pengembangan tanaman adalah penyediaan bibit bermutu, seragam, bebas penyakit, dengan jumlah yang cukup dan tepat waktu (Hutami dan Purnamaningsih, 2003). Perbanyakan secara konvensional kurang efisien karena tingkat perbanyakan tanaman rendah, sedangkan perbanyakan tanaman melalui kultur *in vitro* terbukti dapat mempercepat penggandaan bibit dalam skala besar sesuai dengan kebutuhan. Salah satu keunggulan perbanyakan tanaman melalui kultur *in vitro* adalah sangat dimungkinkan mendapatkan bahan tanam dalam jumlah besar dalam waktu singkat (Priyono, 2000; Santoso dan Sandi 2003). Untuk itu, perlu dilakukan penelitian secara *in vitro* mengenai perbanyakan temulawak tersebut.

Hasil penelitian Wardiyati *et al.* (2010) menyebutkan bahwa temulawak klon Jember mempunyai bobot rimpang tertinggi daripada klon-klon lain dengan kandungan kurkumin sebesar 0.59% per gram. Berdasarkan hal tersebut, maka

klon Jember dapat dijadikan sebagai langkah awal untuk memulai perbanyakan temulawak secara komersial melalui kultur *in vitro*.

Dalam metode perbanyakan melalui kultur *in vitro*, pertumbuhan dan perkembangan eksplan dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya bentuk media dan zat pengatur tumbuh. Bentuk media yang digunakan berperan dalam pembentukan tunas dan akar *plantlet in vitro*. Ziv (1986, dalam Marlin, 2003) melaporkan bahwa proliferasi dan pertumbuhan tunas akan lebih baik bila diinduksi dengan mengkulturkan eksplan pada media cair. Akan tetapi, dengan menggunakan media padat, ternyata lebih mampu meregenerasi *plantlet* jahe daripada dengan media cair (Marlin, 2003). Selain bentuk media, zat pengatur tumbuh juga berpengaruh dalam pembentukan pucuk, pemanjangan pucuk dan pembentukan akar. Marlin (2005) menyatakan bahwa pemberian BAP 3-4 ppm dan NAA 3 ppm merupakan kombinasi terbaik untuk meregenerasi *plantlet* jahe gajah secara *in vitro*. Arniputri *et al.* (2003) juga menyatakan bahwa penambahan 1,5 ppm IAA dan 4 ppm BAP memberikan penampakan yang bagus pada pertumbuhan dan perkembangan eksplan kunir putih. Sedangkan penambahan 2 ppm BAP juga memberikan hasil yang baik pada perbanyakan temu putih secara *in vitro* (Miachir *et al.* 2004). Sampai saat ini penelitian tentang perbanyakan temulawak secara *in vitro* masih terbatas, sehingga perlu dilakukan penelitian terkait dengan bentuk media dan konsentrasi zat pengatur tumbuh.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian bertujuan untuk mendapatkan teknik mikropropagasi temulawak terbaik dengan menguji media dan kombinasi ZPT.

1.3 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini antara lain: (1) adanya interaksi antara media dan kombinasi ZPT terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan temulawak secara *in vitro*, (2) media cair akan menghasilkan jumlah tunas lebih banyak daripada media padat, dan (3) kombinasi ZPT (NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm) akan memberikan jumlah tunas terbanyak.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tanaman Temulawak

Temulawak termasuk dalam divisi Spermatophyta, subdivisi Angiospermae, kelas Monocotyledoneae, bangsa Scitamineae, suku atau family Zingiberaceae, marga Curcuma dan spesies *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. (Afifah dan Tim, 2004). Spesies lain dari kerabat dekat temulawak adalah temu ireng (*C. aeruginosa* ROXB.), temu putih (*C. zedoaria* ROSC.) dan temu kunyit (*C. domestica* VAL.) (Rukmana, 2006), dan satu famili dengan anggota temu-temuan lainnya, yakni kencur (*Kaempferia galanga*), lengkuas (*Lenguas galanga*), dan jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) (Afifah dan Tim, 2004).

Temulawak merupakan terna tahunan, berbatang semu, berwarna hijau dan coklat gelap. Tinggi batangnya antara 1,5 sampai 2,0, paling tinggi dibanding kerabat-kerabat semarganya. Batangnya tersusun atas upih-upih daun seperti halnya upih-upih daun pada pisang, tumbuh tegak, lurus dan berumpun. Daunnya berbentuk seperti mata lembing jorong agak melonjong (*oblong elliptic*), panjang daun sekitar 50-55 cm, dan lebarnya ± 18 cm. Telapak daunnya berwarna hijau tua, bergaris-garis coklat, lebarnya antara 1 cm sampai 2,5 cm, berbintik-bintik hijau muda. Di sisi kiri kanan tulang daun biasanya ada tanda semacam pita memanjang yang warnanya merah keunguan. Punggung daunnya berwarna pudar dan berkilat (Afifah dan Tim, 2004).

Berdasarkan pengamatan di berbagai daerah di Indonesia, temulawak umumnya mulai berbunga sekitar 2-4 bulan setelah musim penghujan tiba (Afifah dan Tim, 2004). Warna bunga umumnya kuning dengan kelopak bunga kuning tua, serta pangkal bunganya berwarna ungu. Panjang tangkai bunga ± 3 cm dan rangkaian bunga (*inflorescentia*) mencapai 1,5 m. Dalam satu ketiak terdapat 3-4 bunga (Rukmana, 2006).

Rukmana (2006) menyatakan bahwa sistem perakaran tanaman temulawak termasuk akar serabut. Akar-akarnya melekat dan keluar dari rimpang induk. Panjang akar sekitar 25 cm dan letaknya tidak beraturan. Akar temulawak terdiri dari umbi akar yang berbentuk bulat telur (silinder pusat berwarna kuning tua dan

kulit berwarna kuning muda), dengan garis diameter sampai 6 cm. Rimpang temulawak terdiri dari rimpang induk (empu) dan rimpang anakan (cabang). Rimpang induknya berbentuk bulat seperti telur dan berwarna kuning tua atau coklat kemerahan. Bagian dalamnya berwarna jingga kecokelatan. Dari rimpang induk ini keluar rimpang kedua yang lebih kecil. Arah pertumbuhannya ke samping, berwarna lebih muda dengan bentuk bermacam-macam, jumlahnya sekitar 3-7 buah (Afifah dan Tim, 2004).

Rimpang temulawak mengandung zat kuning kurkumin, minyak atsiri, pati, protein, lemak (*fixed oil*), selulosa dan mineral (Afifah dan Tim, 2004). Selain itu, juga mengandung beberapa senyawa kimia, antara lain minyak atsiri fellandrian dan turmerol, kamfer, glukosida, foluymetik karbinol, dan kurkumin (Anonymous, 2010^b). Kandungan senyawa kimia temulawak yang paling banyak manfaatnya ialah pati, kurkuminoid dan minyak atsiri. Ketiga senyawa tersebut tidak hanya digunakan sebagai sumber bahan baku obat tetapi juga sebagai bahan baku pangan dan industri. Komposisi pati temulawak secara umum disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi pati pada rimpang temulawak (Afifah dan Tim, 2004)

| No. | Komponen | Besaran |
|-----|-------------|-----------|
| 1. | Abu | 0,37% |
| 2. | Protein | 1,52% |
| 3. | Lemak | 1,35% |
| 4. | Serat Kasar | 0.80% |
| 5. | Karbohidrat | 79,965% |
| 6. | Kurkumin | 15,00 ppm |
| 7. | K | 11,45 ppm |
| 8. | Na | 6,38 ppm |
| 9. | Ca | 19,07 ppm |
| 10. | Mg | 12,72 ppm |
| 11. | Fe | 6,68 ppm |
| 12. | Mn | 0,82 ppm |
| 13. | Cd | 0,02 ppm |

Temulawak telah terbukti dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Hal ini berkaitan dengan kandungan minyak atsiri dan kurkumin yang terdapat di dalam rimpang temulawak. Beberapa manfaat temulawak antara lain digunakan

sebagai anti-inflamasi, antijamur, hepatitis, (Afifah dan Tim, 2004), serta anti hepototoksik, antioksidan dan antikanker (Anonymous, 2010^b). Secara umum, efek farmakologis zat aktif yang terkandung dalam rimpang temulawak disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Efek farmakologis zat aktif yang terkandung dalam rimpang temulawak (Afifah dan Tim, 2004)

| No. | Nama Zat Aktif | Efek Farmakologi |
|-----|--|---|
| 1. | Germakron | Anti-inflamasi (antiperadangan), dan penghambat oedema (pembengkakan) |
| 2. | p-toluilmetillkarbinol dan seskuiterpen d-kamper | Meningkatkan produksi dan sekresi empedu |
| 3. | Turneron | Antimikroba (antibiotik) |

2.2 Kultur Jaringan Pada Famili Zingiberaceae

Kultur jaringan tanaman adalah teknik budidaya sel, jaringan dan organ tanaman dalam suatu lingkungan yang terkendali dan dalam keadaan aseptik atau bebas mikroorganisme (Santoso dan Sandi, 2001). Salah satu bentuk aplikasi teknik kultur jaringan adalah perbanyakan tanaman atau disebut mikropropagasi. Zulkarnain (2009) menyatakan bahwa tahapan dalam proses mikropropagasi antara lain pemilihan bahan tanaman yang sesuai, kultur aseptik, penggandaan pucuk, pembentukan akar dan penanaman pada kondisi *in vivo*.

Pada umumnya, perbanyakan tanaman secara *in vitro* pada famili Zingiberaceae menggunakan eksplan mata tunas rimpang (Arniputri *et al.*, 2003; Hutami dan Purnamaningsih, 2003; Marlin, 2005). Eksplan merupakan salah satu sumber kontaminasi dalam kultur *in vitro*. Sedangkan rimpang merupakan bagian tanaman yang rentan terhadap penyakit, karena bahan tanaman yang kontak dengan tanah berpeluang besar terkontaminasi mikroorganisme yang penyebab utamanya adalah jamur dan bakteri (Zulkarnain, 2009). Oleh karena itu, sterilisasi pada bahan tanam merupakan langkah awal yang penting untuk mendapatkan kultur yang aseptik.

Sterilisasi eksplan dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai bahan setrililan. Sterilisasi yang dilakukan oleh Hutami dan Purnamaningsih (2003) pada

temu mangga adalah eksplan terlebih dahulu dicuci bersih dan disterilisasi dengan Benlate dan dikocok selama $\pm \frac{1}{2}$ jam, kemudian direndam alkohol 70% selama 5 menit, sunklin 30% selama 10 menit, sunklin 20% 10 menit, lalu dicuci dengan aquades steril 5 kali, direndam dengan Betadine, setelah itu baru ditanam. Selanjutnya, Marlin (2003) cukup dengan menggunakan sodium hypochlorite 10% dan alkohol 70%. Sedangkan Bakti *et al.* (2005) menggunakan NaOCl 5,25%, air steril dan HgCl₂ pada sterilisasi jahe.

Dalam metode perbanyakan melalui kultur *in vitro*, pertumbuhan dan perkembangan eksplan dipengaruhi oleh jenis media dasar dan zat pengatur tumbuh. Media MS merupakan jenis media dasar yang paling sering dipakai dalam perbanyakan tanaman karena memiliki kandungan garam-garam yang lebih tinggi daripada media lain, disamping kandungan nitratnya juga tinggi (Zulkarnain, 2009). Hal ini ditunjukkan pada beberapa perbanyakan tanaman obat (Bakti *et al.* 2005; Chirangini *et al.* 2005; Marlin, 2005; Miachir *et al.* 2004; Rout *et al.* 2001) bahwa penggunaan media dasar MS memberikan hasil yang baik. Akan tetapi, semakin tinggi kandungan unsur yang terdapat di dalam media, maka juga dapat menjadi pemicu pertumbuhan mikroorganisme penyebab kontaminasi. Untuk itu, penting dilakukan sterilisasi pada media yaitu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C, tekanan 15 psi, selama 20 menit (Chirangini *et al.*, 2005; Marlin, 2005).

Zat pengatur tumbuh juga berpengaruh dalam pembentukan pucuk, pemanjangan pucuk dan pembentukan akar pada perbanyakan tanaman secara *in vitro*. Marlin (2005) menyatakan bahwa pemberian BAP 3-4 ppm dan NAA 3 ppm merupakan kombinasi terbaik untuk meregenerasi *plantlet* jahe gajah secara *in vitro*. Penambahan 1,5 ppm IAA dan 4 ppm BAP juga memberikan penampakan yang bagus pada pertumbuhan dan perkembangan eksplan kunir putih (Arniputri *et al.*, 2003). Sedangkan penambahan 2 ppm BAP juga memberikan hasil yang baik pada perbanyakan temu putih secara *in vitro* (Miachir *et al.*, 2004).

2.3 Peranan Media pada Kultur Jaringan

Media dalam kultur jaringan mengandung bahan-bahan esensial dan komponen pengoptimal. Bahan esensial terdiri atas garam-garam anorganik, sumber karbon dan energi, vitamin dan zat pengatur tumbuh tanaman. Sedangkan komponen lain yang berperan untuk optimalisasi pertumbuhan diantaranya N-organik, asam organik, substrat kompleks, arang aktif dan lain-lain (Santoso dan Sandi, 2003).

Gunawan (1988, dalam Sugiri, 2005) mengemukakan bahwa pada umumnya media kultur jaringan dibedakan menjadi media dasar dan media perlakuan. Komposisi media dasar mengandung hara esensial baik makro maupun mikro, sumber energi dan vitamin yang jumlah dan macamnya tergantung dari penemunya. Komposisi media perlakuan merupakan komposisi media tambahan yang dapat berupa vitamin, senyawa organik kompleks atau zat pengatur tumbuh (Sugiri, 2005). Oleh karena itu, tidak ada media yang berlaku secara menyeluruh untuk tanaman. Akan tetapi, media dasar MS merupakan media yang paling luas penggunaannya, karena mengandung garam yang tinggi.

Berdasarkan bentuknya, media tanam dibagi menjadi dua macam yaitu media padat dan media cair. Bentuk media cair mempunyai keuntungan bahwa kontak eksplan dengan media adalah maksimum, hanya aerasi perlu diperbaiki dengan penggojokan media dan pemakaian botol kultur yang bentuknya dapat mempertinggi aerasi sebagai tempat media kultur. Sedangkan media padat mempunyai keuntungan agar eksplan tidak tenggelam dalam media. Pembuatan media dalam bentuk padat diperlukan bahan pematat atau bahan bahan pengental, bahan yang sering dipakai dan berhasil baik adalah agar, phytigel dan gelatin (Sugiri, 2005), dengan konsentrasi antara 0,6-1,0% w/v (Zulkarnain, 2009).

Bentuk media yang digunakan berperan dalam pembentukan tunas dan akar pada *plantlet in vitro*. Pada umumnya, media padat digunakan dalam berbagai perbanyakan tanaman (Hidayat, 2007; Kurnianingsih *et al.*, 2009; Miachir, *et al.*, 2004; Wijaya *et al.*, 2006; Yunus, 2007). Arrilaga *et al.* (1992, dalam Sugiri, 2005) melaporkan bahwa terjadi beda nyata pada perlakuan kekentalan media

(antara media padat dan media cair) dan komposisinya, khususnya formulasi garam atau unsur hara. Selanjutnya, Ziv (1986, dalam Marlin, 2003) melaporkan bahwa proliferasi dan pertumbuhan tunas akan lebih baik bila diinduksi dengan mengkulturkan eksplan pada media cair. Akan tetapi, dengan menggunakan media padat, ternyata lebih mampu meregenerasi *plantlet* jahe daripada dengan menggunakan media cair (Marlin, 2003).

2.4 Peranan Zat Pengatur Tumbuh pada Kultur Jaringan

Zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan (Zulkarnain, 2009). Oleh karena itu, keberadaannya sangat diperlukan di dalam jaringan tanaman untuk melangsungkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Dalam kultur jaringan, keberadaan hormon dan zat pengatur tumbuh sangat dibutuhkan secara mutlak, karena pertumbuhan dan perkembangan *plantlet* ditentukan oleh interaksi serta keseimbangan antara ZPT yang ditambahkan dalam media. Wardiyati (1998) menyatakan bahwa tipe morphogenesis yang terjadi dalam kultur jaringan bergantung pada rasio dan konsentrasi auksin dan sitokinin yang terdapat dalam media. Inisiasi akar embriogenesis dan kalus terjadi bila rasio auksin/sitokinin tinggi, sedangkan inisiasi tunas terjadi bila rasio auksin/sitokinin rendah.

Auksin umum digunakan untuk memacu pembentukan kalus, terutama akar, memacu embriogenesis somatik dan memacu pertumbuhan tunas pucuk dari kultur tunas (Wardiyati, 1998). Pierik (1997, dalam Zulkarnain, 2009) menyatakan bahwa pada umumnya auksin meningkatkan pemanjangan sel, pembelahan sel, dan pembentukan akar adventif. Jenis auksin yang umum dipakai dalam media kultur jaringan adalah IAA (1 *H-indole-3-acetic acid*), IBA (1*H-indole-3-butyric acid*), 2,4 D (2,4-*dichloro-phenoxy acetic acid*) dan NAA (1-*naphtalene acetic acid*) (Wardiyati, 1998).

Sitokinin merupakan nama kelompok hormon tumbuhan yang sangat penting sebagai pemacu pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur jaringan

(Santoso dan Sandi, 2003). Wardiyati (1998) lebih jelas menyatakan bahwa fungsi sitokinin adalah untuk menstimulir pembelahan sel, memacu pembentukan tunas, perbanyak tunas samping dan menghambat pembentukan akar, serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sama halnya dengan kinetin (6-furfurylaminopurine) (Zulkarnain, 2009). Kyte (1983, dalam Zulkarnain, 2009) menyatakan bahwa selain meningkatkan pembelahan sel dan inisiasi pucuk, sitokinin terlibat pula di dalam kontrol perkecambahan biji, mempengaruhi absisi daun dan transport auksin, memungkinkan bekerjanya giberelin dengan menghilangkan penghambat tumbuh, serta menunda penuaan.

Santoso dan Sandi (2003) menyatakan bahwa sitokinin sintetik yang umum digunakan dalam kegiatan kultur jaringan adalah: kinetin (*6-furfurylaminopurine*), BAP atau BA (*6-benzylaminopurine/ 6-benzyladenin*), PBA (SD 8339) (*6-Benzylamino-9-(2-tetrahydropyranyl)-9H-purine*), 2CL4PU (*N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-penylurea*), 2,6CL-4PU (*N-(2,6-chloro-4-pyridyl)-N'-penylurea*), thidiazuron (*N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-penylurea*), dan yang paling banyak dipakai adalah kinetin, benziladenin (BA atau BAP) dan zeatin (Zulkarnain, 2009).

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi auksin dan sitokinin yang ditambahkan ke dalam media berpengaruh terhadap saat inisiasi, jumlah dan panjang akar maupun tunas. Saat tumbuh akar tercepat diperoleh Marlin (2005) dengan menambahkan 0 ppm BAP dan 5 ppm NAA ke dalam media kultur jahe. Saat tumbuh tunas tercepat diperoleh dengan menambahkan 1 ppm BAP dan 1 ppm NAA pada kultur jahe (Marlin, 2005). Jumlah tunas terbanyak diperoleh Miachir *et al.* (2004) pada perlakuan 2 ppm BAP dan 0 ppm NAA. Sedangkan Marlin (2005) membutuhkan 4 ppm BAP dan 3 ppm NAA untuk memperoleh jumlah tunas terbanyak pada jahe.

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya mulai bulan Juni sampai November 2010.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, meliputi: alat-alat gelas; gelas beeker (15 mL, 20 mL, 150 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL), gelas ukur (10 mL dan 100 mL), erlenmeyer (100 mL), petridish, batang pengaduk, botol kultur; alat-alat *dissecting set*: *scalpel* dan pinset; alat sterilisasi: *Laminair Air Flow Cabinet* (LAFC) type H.S.079S, autoklaf model No.1925x, oven merk Heracus type T 5042, lampu spiritus, dan penyemprot alkohol (*hand sprayer*); *Shaker* (penggojog) merk Heles CR-45; timbangan analitik merk Mettler AE 200; pipet tetes; pipet ukur (10 mL); pH meter type HI 96107; larutan buffer; timer; lemari pendingin; rak kultur; kamera digital; lampu TL 40 Watt; kertas label; kompor listrik; tissue; tissue steril; korek api; kertas; plastik penutup; gelang karet; cup kertas; kertas grafik; penggaris dan alat tulis.

Bahan tanam (eksplan) yang digunakan dalam penelitian ialah *plantlet* temulawak klon Jember hasil perbanyakan *in vitro* di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Bahan yang digunakan sebagai media tanam ialah senyawa kimia pada media dasar Murashige and Skoog (MS) (Lampiran 1), sukrosa 30 g.L⁻¹, caseinhydrolysate 0,05 g. L⁻¹, agar 0,67 g.L⁻¹, serta zat pengatur tumbuh NAA (*Naphthelene Acetic Acid*) dan BA (*Benzyl Adenin*). Bahan lain yang digunakan ialah alkohol (70% dan 96%), aquades steril, HCl 1N, NaOH 1N dan spiritus.

3.3 Metode Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

3.3.1 Tahap Persiapan Eksplan

Pada tahap ini dilakukan subkultur berulang terhadap *plantlet* temulawak hasil perbanyakan *in vitro* sebelumnya hingga mencapai jumlah eksplan yang dibutuhkan dalam tahap percobaan tanpa menggunakan rancangan percobaan.

3.3.2 Tahap Percobaan

Tahap percobaan dilakukan untuk menguji interaksi antar perlakuan pada pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Eksplan didapatkan dari hasil biakan *in vitro* sebelumnya (hasil kegiatan pada tahap 3.3.1). Penelitian disusun menurut Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan menggunakan dua faktor.

Faktor pertama adalah media tanam MS (A) yang terdiri dari 2 level:

1. a_1 : Media Padat (dengan agar)
2. a_2 : Media Cair (tanpa agar)

Faktor kedua adalah kombinasi ZPT (NAA dan BA). Dalam penelitian, konsentrasi BA digunakan sebagai perlakuan, sedangkan NAA ditambahkan ke dalam media dengan konsentrasi yang sama, yaitu 0,5 ppm tiap perlakuan.

Konsentrasi BA (B) terdiri dari 3 level:

1. b_1 : 0,5 ppm
2. b_2 : 1 ppm
3. b_3 : 1,5 ppm

Dari kedua faktor tersebut, maka didapatkan 6 satuan kombinasi perlakuan sebagaimana tersaji pada Tabel 3. Sedangkan denah percobaan disajikan pada Lampiran 3.

Tabel 3. Satuan kombinasi perlakuan media dan kombinasi ZPT pada mikropropagasi temulawak secara *in vitro*

| Faktor | Media Tanam (A) | | |
|----------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Taraf | a ₁ | a ₂ |
| Kombinasi ZPT (B) | b ₁ | a ₁ b ₁ (A) | a ₂ b ₁ (D) |
| | b ₂ | a ₁ b ₂ (B) | a ₂ b ₂ (E) |
| | b ₃ | a ₁ b ₃ (C) | a ₂ b ₃ (F) |

Kombinasi perlakuan tersebut diulang sebanyak 4 kali. Setiap ulangan terdiri dari 3 botol kultur dan tiap botol berisi 2 eksplan. Sehingga, jumlah total eksplan ialah 144 eksplan.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian pada tahap persiapan eksplan dan tahap percobaan masing-masing terdiri dari kegiatan sebagai berikut:

3.4.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat bertujuan untuk meminimalkan adanya kontaminasi yang disebabkan oleh jamur dan bakteri. Alat-alat *dissecting set* (*scalpel* dan pinset), alat-alat dari gelas (petridish, botol kultur) dan logam dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih beberapa kali kemudian dikeringanginkan. Sterilisasi botol kultur dan erlenmeyer dilakukan dalam oven pada suhu 80⁰C selama 5 jam. Alat-alat gelas, logam dan petridish dibungkus dengan kertas, kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121⁰C dengan tekanan 15 psi selama 30 menit. Kemudian semua alat-alat yang akan dimasukkan ke dalam LAFC disemprot dengan alkohol 70%. alat-alat *dissecting set* (pinset dan *scalpel*) dan petridish dengan alkohol 96% dan dibakar dengan nyala api spiritus setiap kali akan digunakan di LAFC.

3.4.2 Pembuatan Media Tanam

Langkah awal adalah pembuatan larutan induk (stok) yang terdiri dari larutan induk: makro, mikro, vitamin, Fe-EDTA dan ZPT (NAA dan BA). Pembuatan larutan induk bertujuan untuk menghemat pekerjaan menimbang bahan yang berulang-ulang. Untuk membuat satu liter media kultur dengan

konsentrasi yang sesuai dengan perlakuan, maka dilakukan pengenceran larutan induk dengan air mineral hingga mencapai volume yang diinginkan.

Media tanam pada penelitian dibagi menjadi dua macam, yaitu media pada tahap persiapan eksplan dan pada tahap percobaan. Media pada tahap percobaan dibagi menjadi dua bagian yaitu media padat dan media cair. Sehingga terdapat tiga macam media biakan.

3.4.2.1 Pembuatan Media Tanam pada Tahap Persiapan Eksplan

Larutan makro, mikro, Fe-EDTA, vitamin, sukrosa, casein hidrolisate, NAA dan BA berdasarkan perhitungan larutan pada tahap persiapan eksplan (Lampiran 2a) dimasukkan kedalam gelas beeker 1000 mL, diaduk dan dilarutkan dengan aquades sampai volume menjadi 1000 mL.

Kemudian larutan diukur pH sampai 5,8 (pengaturan pH menggunakan HCl 1N dan NaOH 1N). Selanjutnya, larutan dipanaskan diatas kompor listrik sampai mendidih dan ditambahkan agar sebanyak 6,7 g dan diaduk hingga merata. Setelah itu, media dimasukkan kedalam botol kultur yang masing-masing berisi 15 mL, ditutup plastik, diikat karet gelang dan diberi label.

3.4.2.2 Pembuatan Media Tanam pada Tahap Percobaan Perlakuan Padat

Larutan makro, mikro, Fe-EDTA, vitamin, sukrosa, casein hidrolisate, dan NAA 0,5 ppm berdasarkan perhitungan larutan pada media padat (Lampiran 2b) dimasukkan kedalam gelas beeker 300 mL, diaduk dan dilarutkan dengan aquades sampai volume menjadi 300 mL. Kemudian, larutan tersebut dibagi menjadi tiga (masing-masing 100 mL), dimasukkan ke dalam gelas beeker 200 mL dan diberi label b1, b2 dan b3.

Sebanyak 0,9 mL (0,5 ppm) BA dimasukkan ke dalam gelas ukur 100 mL dan dilarutkan dengan aquades sampai volume menjadi 80 mL. Kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam larutan label b1. BA 1 ppm dan 1,5 ppm (b2 dan b3) diperlakukan sama seperti BA 0,5 ppm. Setelah itu, masing-masing larutan diukur pH sampai 5,8 (pengaturan pH menggunakan HCl 1N dan NaOH 1N). Selanjutnya, larutan dipanaskan diatas kompor listrik sampai mendidih dan ditambahkan agar masing-masing sebanyak 1,206 g dan diaduk hingga merata.

Setelah itu, media dimasukkan kedalam botol kultur yang masing-masing berisi 15 mL, ditutup plastik, diikat karet gelang dan diberi label.

3.4.2.3 Pembuatan Media Tanam pada Tahap Percobaan Perlakuan Cair

Larutan makro, mikro, Fe-EDTA, vitamin, sukrosa, casein hidrolisate, dan NAA 0,5 ppm berdasarkan perhitungan larutan pada media cair (Lampiran 2c) dimasukkan kedalam gelas beaker 600 mL, diaduk dan dilarutkan dengan aquades sampai volume menjadi 600 mL. Kemudian, larutan tersebut dibagi menjadi tiga (masing-masing 200 mL), dimasukkan ke dalam gelas beaker 300 mL dan diberi label b1, b2 dan b3.

Sebanyak 1,2 mL (0,5 ppm) BA dimasukkan ke dalam gelas ukur 100 mL dan dilarutkan dengan aquades sampai volume menjadi 40 mL. Kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam larutan label b1. BA 1 ppm dan 1,5 ppm (b2 dan b3) diperlakukan sama seperti BA 0,5 ppm. Setelah itu, masing-masing larutan diukur pH sampai 5,8 (pengaturan pH menggunakan HCl 1N dan NaOH 1N). Selanjutnya, media dimasukkan kedalam erlenmeyer 100 mL yang masing-masing berisi 20 mL, ditutup plastik, diikat karet gelang dan diberi label.

3.4.3 Sterilisasi Media

Botol-botol kultur yang sudah berisi media disterilkan didalam autoklaf pada tekanan 15 psi suhu 121°C selama 30 menit. Setelah selesai, disimpan dalam ruangan kultur dengan suhu 23⁰-28⁰ C. Media dapat digunakan setelah kurang lebih 3 x 24 jam untuk mengetahui apakah media tersebut terkontaminasi atau tidak.

3.4.4 Sterilisasi *Laminair Air Flow Cabinet* (L AFC)

L AFC disemprot dengan alkohol 70% dan disterilisasi dengan sinar UV selama 1 jam. Selanjutnya, alat-alat *dissecting set: scalpel* dan pinset dimasukkan kedalam L AFC dengan cara disemprot alkohol 70% terlebih dahulu. Ketika L AFC digunakan maka sinar UV dimatikan dan blower dihidupkan.

3.4.5 Inokulasi dan Pemeliharaan Eksplan

Eksplan dipotong-potong di atas petridish dengan ukuran 0,5 cm atau ± 2 mm dari pangkal tunas dan ± 2 mm dari pangkal akar (Gambar 1). Kemudian ditanam dalam media tanam sesuai tahapan dan perlakuan. Eksplan pada perlakuan media padat diatur pada rak-rak kultur bertingkat, sedangkan pada perlakuan media cair diatur pada *shaker* (penggojog) 120 rpm. Pada tingkat rak diberi penyinaran TL 40 Watt dengan intensitas 1.000 Lux. Selanjutnya eksplan diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 22⁰C dan kelembaban ruang 70%.



Gambar 1. Eksplan temulawak sebelum dipotong (a) dan sesudah dipotong (b)

3.4.6 Subkultur

Subkultur ialah memindahkan eksplan dari media lama ke media baru. Subkultur dilakukan apabila eksplan mengalami kontaminasi sebagai upaya untuk menyelamatkan eksplan, atau apabila pertumbuhan eksplan tampak terhenti sebagai indikasi bahwa nutrisi dalam media sudah tidak mencukupi lagi bagi pertumbuhan eksplan. Pada penelitian, subkultur dilakukan maksimal 4 minggu sekali, dengan memindahkan eksplan ke dalam media sesuai tahapan dan perlakuan.

3.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan untuk mendapatkan data kuantitatif terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan pada tahap percobaan interaksi media dan kombinasi ZPT. Pengamatan dilakukan sehari setelah subkultur sampai

eksplan berumur 6 mss (minggu setelah sub kultur) yang didasarkan pada pengamatan secara visual, meliputi:

1. Persentase eksplan hidup (%), dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{jumlah eksplan hidup}}{\text{jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

2. Persentase eksplan terkontaminasi (%), dihitung dengan rumus:

$$\frac{\text{jumlah eksplan terkontaminasi}}{\text{jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

3. Inisiasi perkembangan eksplan, diamati setiap hari sampai terbentuk kalus, embrio atau organ (tunas, akar dan daun)
4. Jumlah tunas per eksplan, pengamatan dilakukan pada umur 7, 14, 21, 28, 35 dan 42 hss
5. Jumlah akar per eksplan, pengamatan dilakukan pada umur 7, 14, 21, 28, 35 dan 42 hss
6. Jumlah daun per eksplan, pengamatan dilakukan pada umur 7, 14, 21, 28, 35 dan 42 hss
7. Panjang tunas (cm) per eksplan, pengamatan dilakukan pada umur 42 hss dengan cara mengeluarkan eksplan dari botol dan mengukur masing-masing panjang tunas mulai bagian pangkal bawah sampai ujung tunas tertinggi kemudian dirata-rata dengan jumlah tunas yang tumbuh
8. Panjang akar (cm) per eksplan, pengamatan dilakukan pada umur 42 hss dengan cara mengeluarkan eksplan dari botol dan mengukur masing-masing panjang akar pada setiap eksplan kemudian dirata-rata dengan jumlah akar yang tumbuh

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA) dan uji F pada taraf 5%. Apabila terdapat perbedaan, dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada taraf 5%.

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Persentase Eksplan Hidup

Berdasarkan Tabel 4 dapat dilihat jumlah akhir eksplan yang hidup dan bebas kontaminasi sebesar 134 eksplan (93,06 %). Pada Tabel 4, dapat dilihat bahwa selain terkontaminasi, terdapat eksplan yang mati sebanyak 1 eksplan (0,69%). Eksplan yang mati disebabkan pencoklatan (browning) dan terdapat pada perlakuan media cair dengan kombinasi NAA 0,5 ppm + BA 0,5 ppm.



Gambar 2. Eksplan yang mengalami browning

Tabel 4. Persentase eksplan temulawak hidup pada perlakuan media dan kombinasi ZPT

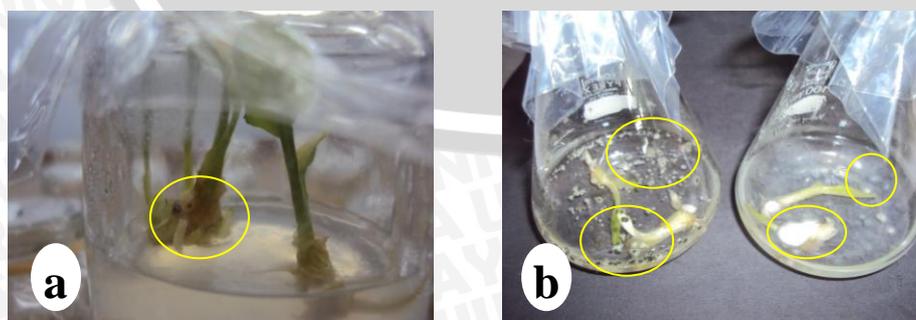
| Perlakuan | Jumlah Eksplan: | | | |
|---------------------------------|-----------------|--------------|----------------|---------------|
| | Awal | Mati | Terkontaminasi | Hidup |
| Media padat vs 0,5 NAA + 0,5 BA | 24 | 0 | 0 | 24 |
| Media padat vs 0,5 NAA + 1 BA | 24 | 0 | 2 | 22 |
| Media padat vs 0,5 NAA + 1,5 BA | 24 | 0 | 1 | 23 |
| Media cair vs 0,5 NAA + 0,5 BA | 24 | 1 | 4 | 19 |
| Media cair vs 0,5 NAA + 1 BA | 24 | 0 | 0 | 24 |
| Media cair vs 0,5 NAA + 1,5 BA | 24 | 0 | 2 | 22 |
| Jumlah Total | 144 | 1 | 9 | 134 |
| Persentase | 100% | 0,69% | 6,25% | 93,06% |

4.1.2 Persentase Eksplan Terkontaminasi

Persentase eksplan terkontaminasi pada perlakuan media dan kombinasi ZPT disajikan pada Tabel 5. Berdasarkan Tabel 5, jumlah akhir eksplan yang bebas dari kontaminasi sampai 6 msi sebesar 135 eksplan (93,75 %). Kontaminasi hanya disebabkan oleh jamur dengan nilai total sebesar 9 eksplan (6,25 %), sedangkan kontaminasi bakteri tidak terjadi sampai umur 6 mss. Kontaminasi oleh jamur terlihat jelas pada media dan eksplan yang diselimuti oleh spora berwarna hitam dan putih (Gambar 3). Kontaminasi terjadi pada beberapa perlakuan, antara lain: perlakuan media padat dengan kombinasi NAA 0,5 ppm + BA 1 ppm (2 eksplan), perlakuan media padat dengan kombinasi NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm (1 eksplan), perlakuan media cair dengan kombinasi NAA 0,5 ppm + BA 0,5 ppm (4 eksplan) dan perlakuan media cair dengan kombinasi NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm (2 eksplan).

Tabel 5. Persentase eksplan temulawak bebas kontaminasi pada perlakuan media dan kombinasi ZPT

| Perlakuan | Jumlah Eksplan: | | | |
|---------------------------------|-----------------|----------------|---------|-------------------|
| | Awal | Terkontaminasi | | Bebas Kontaminasi |
| | | Jamur | Bakteri | |
| Media padat vs 0,5 NAA + 0,5 BA | 24 | 0 | 0 | 24 |
| Media padat vs 0,5 NAA + 1 BA | 24 | 2 | 0 | 22 |
| Media padat vs 0,5 NAA + 1,5 BA | 24 | 1 | 0 | 23 |
| Media cair vs 0,5 NAA + 0,5 BA | 24 | 4 | 0 | 20 |
| Media cair vs 0,5 NAA + 1 BA | 24 | 0 | 0 | 24 |
| Media cair vs 0,5 NAA + 1,5 BA | 24 | 2 | 0 | 22 |
| Jumlah Total | 144 | 9 | 0 | 135 |
| Persentase | 100% | 6,25% | 0% | 93,75% |



Gambar 3. Eksplan terkontaminasi pada media padat (a) dan media cair (b)

4.1.3 Inisiasi Perkembangan Eksplan

Hasil analisis ragam (Lampiran 5) menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara perlakuan media dan kombinasi ZPT terhadap seluruh variabel inisiasi perkembangan eksplan temulawak secara *in vitro*. Secara terpisah, perlakuan media dan kombinasi ZPT berpengaruh nyata hanya pada variabel inisiasi akar. Inisiasi perkembangan eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Inisiasi perkembangan (hss) eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT

| Perlakuan | Inisiasi Perkembangan Eksplan (hss): | | | | | |
|----------------------|--------------------------------------|--------|-------------|---------------|---------|-------|
| | Kalus | Embrio | Tunas Utama | Tunas Samping | Akar | Daun |
| Media: | | | | | | |
| Padat | 1,92 | 1,91 | 3,26 | 15,70 | 13,21 a | 23,54 |
| Cair | 1,79 | 2,11 | 2,56 | 14,40 | 17,49 b | 22,13 |
| BNT 5% | tn | tn | tn | tn | 2,14 | tn |
| Kombinasi ZPT (ppm): | | | | | | |
| 0,5 NAA + 0,5 BA | 1,84 | 1,64 | 2,82 | 15,96 | 12,80 a | 21,97 |
| 0,5 NAA + 1 BA | 1,63 | 2,17 | 2,55 | 14,52 | 15,36 a | 22,20 |
| 0,5 NAA + 1,5 BA | 2,10 | 2,22 | 3,35 | 14,66 | 17,93 b | 24,32 |
| BNT 5% | tn | tn | tn | tn | 3,21 | tn |

Keterangan: Angka-angka pada kolom yang sama dengan huruf sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT pada taraf 5%; tn= tidak berbeda nyata; hss= hari setelah subkultur. Data pengamatan inisiasi kalus dan inisiasi embrio dianalisa setelah dilakukan transformasi $(x + 0,5)^{1/2}$

Berdasarkan Tabel 6, dapat dijelaskan bahwa perlakuan media padat menghasilkan inisiasi akar lebih cepat dibandingkan perlakuan media cair. Sedangkan pada perlakuan kombinasi ZPT, konsentrasi BA 0,5 ppm dan BA 1 ppm yang dikombinasikan dengan NAA 0,5 ppm menghasilkan inisiasi akar lebih cepat dibandingkan konsentrasi BA 1,5 ppm yang dikombinasikan dengan NAA 0,5 ppm.

4.1.4 Jumlah Tunas

Hasil analisis ragam (Lampiran 5) menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara perlakuan media dan kombinasi ZPT terhadap jumlah tunas eksplan temulawak secara *in vitro*. Secara terpisah, perlakuan media berpengaruh nyata pada umur pengamatan 5 dan 6 mss, sedangkan perlakuan kombinasi ZPT berpengaruh nyata pada umur pengamatan 4, 5 dan 6 mss. Jumlah tunas eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Jumlah tunas eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT pada berbagai umur pengamatan

| Perlakuan | Jumlah Tunas pada Berbagai Umur Pengamatan (mss): | | | | | |
|-----------------------------|---|------|------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Media: | | | | | | |
| Padat | 1,02 | 1,55 | 2,20 | 2,56 | 3,02 a | 3,30 a |
| Cair | 1,09 | 1,73 | 2,24 | 2,90 | 3,62 b | 4,03 b |
| BNT 5% | tn | tn | tn | tn | 0,10 | 0,14 |
| Kombinasi ZPT (ppm): | | | | | | |
| 0,5 NAA + 0,5 BA | 1,08 | 1,48 | 1,95 | 2,26 a | 2,56 a | 2,87 a |
| 0,5 NAA + 1 BA | 1,04 | 1,68 | 2,16 | 2,60 b | 3,34 b | 3,82 b |
| 0,5 NAA + 1,5 BA | 1,05 | 1,75 | 2,56 | 3,34 c | 4,06 c | 4,33 c |
| BNT 5% | tn | tn | tn | 0,09 | 0,15 | 0,21 |

Keterangan: Angka-angka pada kolom yang sama dengan huruf sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT pada taraf 5%; tn= tidak berbeda nyata; mss= minggu setelah subkultur.

Tabel 7 menunjukkan bahwa pada umur pengamatan 5 dan 6 mss, perlakuan media cair menghasilkan jumlah tunas lebih banyak dibandingkan perlakuan media padat. Sedangkan perlakuan kombinasi ZPT pada umur pengamatan 4, 5 dan 6 mss menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi BA sampai 1,5 ppm yang dikombinasikan dengan NAA 0,5 ppm dapat meningkatkan jumlah tunas.

4.1.5 Jumlah Akar

Hasil analisis ragam (Lampiran 5) menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara perlakuan media dan kombinasi ZPT terhadap jumlah akar per eksplan temulawak secara *in vitro*. Secara terpisah, perlakuan media berpengaruh

nyata pada umur pengamatan 5 dan 6 mss. Sedangkan perlakuan kombinasi ZPT berpengaruh nyata pada umur pengamatan 3, 4, 5 dan 6 mss. Jumlah akar eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT disajikan pada Tabel 8.

Perlakuan media padat pada umur pengamatan 5 dan 6 mss (Tabel 8) menghasilkan jumlah akar lebih banyak dibandingkan perlakuan media cair. Sedangkan perlakuan kombinasi ZPT pada umur pengamatan 3, 4, 5 dan 6 mss, menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi BA 0,5 ppm sampai 1,5 ppm yang dikombinasikan dengan NAA 0,5 ppm dapat menurunkan jumlah akar.

Tabel 8. Jumlah akar eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT pada berbagai umur pengamatan

| Perlakuan | Jumlah Akar pada Berbagai Umur Pengamatan (mss): | | | | | |
|----------------------|--|------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Media: | | | | | | |
| Padat | 0,99 | 1,22 | 1,85 | 3,13 | 4,24 b | 4,86 b |
| Cair | 0,77 | 0,98 | 1,50 | 2,61 | 3,88 a | 4,44 a |
| BNT 5% | tn | tn | tn | tn | 0,03 | 0,04 |
| Kombinasi ZPT (ppm): | | | | | | |
| 0,5 NAA + 0,5 BA | 0,96 | 1,18 | 2,12 c | 3,70 c | 4,54 c | 5,36 c |
| 0,5 NAA + 1 BA | 0,89 | 1,13 | 1,62 b | 2,62 b | 3,96 b | 4,35 b |
| 0,5 NAA + 1,5 BA | 0,80 | 0,99 | 1,30 a | 2,29 a | 3,68 a | 4,24 a |
| BNT 5% | tn | tn | 0,06 | 0,15 | 0,05 | 0,07 |

Keterangan: Angka-angka pada kolom yang sama dengan huruf sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT pada taraf 5%; tn= tidak berbeda nyata; mss= minggu setelah subkultur. Data pengamatan umur 1 dan 2 mss dianalisis setelah dilakukan transformasi $(x + 0,5)^{1/2}$

4.1.6 Jumlah Daun

Hasil analisis ragam (Lampiran 5) menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara perlakuan media dan kombinasi ZPT terhadap jumlah daun per eksplan temulawak secara *in vitro*. Secara terpisah, perlakuan media berpengaruh nyata pada umur pengamatan 4, 5 dan 6 mss. Sedangkan perlakuan kombinasi ZPT tidak berpengaruh nyata pada berbagai umur pengamatan. Jumlah daun eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT disajikan pada

Tabel 9. Pada umur pengamatan 4, 5 dan 6 mss, perlakuan media cair menghasilkan jumlah daun lebih banyak dibandingkan perlakuan media padat.

Tabel 9. Jumlah daun eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT pada berbagai umur pengamatan

| Perlakuan | Jumlah Daun pada Berbagai Umur Pengamatan (mss): | | | | |
|----------------------|--|------|--------|--------|--------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Media: | | | | | |
| Padat | 0,79 | 1,05 | 1,14 a | 1,57 a | 2,45 a |
| Cair | 0,76 | 1,15 | 1,61 b | 2,20 b | 3,15 b |
| BNT 5% | tn | tn | 0,05 | 0,08 | 0,05 |
| Kombinasi ZPT (ppm): | | | | | |
| 0,5 NAA + 0,5 BA | 0,75 | 1,11 | 1,60 | 2,26 | 2,95 |
| 0,5 NAA + 1 BA | 0,82 | 1,11 | 1,37 | 1,82 | 2,81 |
| 0,5 NAA + 1,5 BA | 0,75 | 1,08 | 1,17 | 1,54 | 2,65 |
| BNT 5% | tn | tn | tn | tn | tn |

Keterangan: Angka-angka pada kolom yang sama dengan huruf sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT pada taraf 5%; tn= tidak berbeda nyata; mss= minggu setelah subkultur. Data pengamatan umur 2 dan 3 mss dianalisis setelah dilakukan transformasi $(x + 0,5)^{1/2}$

Tabel 10. Panjang tunas (cm) per eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT pada 6 mss

| Perlakuan | Panjang Tunas (cm) per eksplan |
|----------------------|--------------------------------|
| Media: | |
| Padat | 3,31 a |
| Cair | 5,48 b |
| BNT 5% | 0,33 |
| Kombinasi ZPT (ppm): | |
| 0,5 NAA + 0,5 BA | 4,73 |
| 0,5 NAA + 1 BA | 4,32 |
| 0,5 NAA + 1,5 BA | 4,14 |
| BNT 5% | tn |

Keterangan: Angka-angka pada kolom yang sama dengan huruf sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT pada taraf 5%; tn= tidak berbeda nyata; mss= minggu setelah subkultur.

4.1.7 Panjang Tunas

Hasil analisis ragam (Lampiran 5) menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi antara perlakuan media dan kombinasi ZPT terhadap panjang tunas per eksplan temulawak secara *in vitro*. Perlakuan media berpengaruh nyata dan

terhadap panjang tunas eksplan temulawak. Panjang tunas eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT (Tabel 10), menunjukkan bahwa perlakuan media cair menghasilkan panjang tunas lebih tinggi dibandingkan perlakuan media padat.

4.1.8 Panjang Akar

Hasil analisis ragam (Lampiran 5) menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara perlakuan media dan kombinasi ZPT terhadap panjang akar eksplan temulawak secara *in vitro*. Panjang akar eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Panjang akar (cm) eksplan temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT pada 6 mss

| Media | Kombinasi ZPT (ppm): | | |
|--------|----------------------|----------------|------------------|
| | 0,5 NAA + 0,5 BA | 0,5 NAA + 1 BA | 0,5 NAA + 1,5 BA |
| Padat | 2,53 c | 2,11 b | 1,47 a |
| Cair | 3,03 d | 3,50 e | 3,78 f |
| BNT 5% | 0,16 | | |

Keterangan: Angka-angka pada kolom yang sama dengan huruf sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNT pada taraf 5%; mss= minggu setelah subkultur.

Peningkatan konsentrasi BA sampai 1,5 ppm pada media padat dapat menurunkan panjang akar. Sebaliknya, peningkatan konsentrasi BA sampai 1,5 ppm pada media cair dapat meningkatkan panjang akar. Jika dilihat antara perlakuan media yang berbeda pada tingkat kombinasi ZPT yang sama, menunjukkan bahwa perlakuan media cair menghasilkan panjang akar lebih tinggi dibandingkan perlakuan media padat.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Persentase Eksplan Hidup dan Terkontaminasi

Hasil penelitian menunjukkan, jumlah tanaman yang hidup dan bebas kontaminasi sampai 6 mss ialah 134 eksplan, karena 1 eksplan mati dan 9 eksplan terkontaminasi (Tabel 4). Berdasarkan hasil pengamatan (Gambar 2), eksplan yang mati berwarna coklat pada sekitar pangkal akar dan terjadi pada umur

pengamatan 3 mss (Lampiran 4). Diduga, warna coklat pada eksplan disebabkan oleh cekaman luka sehingga eksplan mengalami oksidasi yang menyebabkan sintesis senyawa fenolik. Hendaryono dan Wijayani (1994) menyatakan bahwa pencoklatan dapat terjadi karena pelukaan (pengirisan eksplan) dan juga karena rangsangan senyawa kimia yang membantu pembentukan senyawa phenol.

Kurkumin merupakan salah satu antioksidan fenolik yang terkandung di dalam rimpang temulawak. Kandungan kurkumin tersebut diduga menjadi penyebab pencoklatan dan penghambat pertumbuhan eksplan. Salah satu upaya untuk mencegah timbulnya warna coklat (browning) pada luka bekas potongan eksplan adalah dengan menggunakan arang aktif yang mampu menghilangkan pewarnaan dengan menyerap phenol dan *rendered oksodase* phenol dan menginaktifkan *peroksidase* (Hutami, 2006). Selain berfungsi sebagai pencegah browning, arang aktif juga mampu merangsang morfogenesis. Widiastoety dan Marwoto (2004) melaporkan bahwa penggunaan arang aktif 2 g.L⁻¹ ke dalam media kultur anggrek dapat meningkatkan pertumbuhan tinggi *plantlet*, luas daun dan jumlah akar yang terbentuk. Cara lain adalah dengan menggunakan *polyvinylpirolidone* (PVP) dengan konsentrasi 1 ppm yang cukup efektif menyerap senyawa toksik pada kultur pisang (Nisa dan Rodinah, 2005). Pada penelitian ini tidak digunakan arang aktif maupun PVP, sehingga memungkinkan terjadi pencoklatan pada eksplan dan berlanjut pada kematian jaringan.

Kontaminasi dalam kultur jaringan merupakan suatu hal yang wajar. Kontaminasi pada eksplan (bahan tanam) yang dikulturkan dapat terjadi karena adanya infeksi eksternal maupun internal. Pencegahan kontaminasi eksternal dapat dilakukan dengan sterilisasi permukaan bahan tanam dengan pencucian dan perlakuan kimiawi, sedangkan infeksi internal dapat dilakukan dengan menggunakan pestisida sistemik (Zulkarnain, 2009). Berdasarkan hasil pengamatan, didapatkan bahwa kontaminasi hanya disebabkan oleh jamur dengan persentase sebesar 6,25% (Tabel 5) dari total populasi. Nilai tersebut menunjukkan bahwa teknik sterilisasi yang digunakan sudah efektif.

Sterilisasi eksplan dilakukan pada saat awal penanaman eksplan. Pada penelitian ini, eksplan yang digunakan adalah *plantlet* steril hasil perbanyakan

mata tunas temulawak. Diasumsikan bahwa *plantlet* sebagai eksplan sudah dalam kondisi steril, sehingga tidak perlu dilakukan sterilisasi ulang. Akan tetapi, kontaminasi ternyata juga dapat terjadi pada kultur yang steril. Kontaminasi pada kultur yang steril diduga disebabkan oleh udara di dalam kultur dan jamur yang masih hidup di dalam jaringan tanaman. Zulkarnain (2009) menyatakan bahwa kontaminasi pada kultur yang steril dapat disebabkan oleh agen kontaminan yang telah bertahan di dalam jaringan sampai kondisi yang menguntungkan untuk pertumbuhannya.

Kontaminasi oleh jamur terlihat jelas pada media dan eksplan yang diselubungi oleh spora berwarna hitam dan putih (Gambar 3) yang mulai terlihat pada umur pengamatan 2 mss (Lampiran 4). Pada awalnya, eksplan dapat tumbuh dengan normal. Akan tetapi, kondisi *in vitro* yang mendukung pertumbuhan tanaman ternyata juga mampu mendorong pertumbuhan jamur lebih cepat. Pada akhirnya, eksplan mati karena terjadi persaingan penyerapan unsur hara yang terkandung di dalam media.

Selain dari bahan tanam, kontaminasi juga dapat disebabkan oleh media kultur, peralatan yang proses sterilisasinya kurang sempurna, dan berasal dari udara langsung yang masuk ke dalam kultur pada saat penanaman (Zulkarnain, 2009). Kandungan nutrisi yang di dalam media kultur juga dapat menjadi salah satu penyebab kontaminasi. Semakin diperkaya suatu media, maka tingkat kontaminasi juga akan semakin besar. Pada penelitian ini, media yang digunakan ialah media MS yang mengandung garam-garam mineral yang lebih tinggi dibandingkan media kultur yang lain, sehingga peluang terjadinya kontaminasi juga semakin tinggi. Santoso dan Sandi (2003) melaporkan bahwa media MS mempunyai tingkat resiko kontaminan yang lebih besar dari media Kudzon dan VW.

4.2.2 Pengaruh Perlakuan Media dan Kombinasi ZPT Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan Temulawak Secara In Vitro

Hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi antara media dan kombinasi ZPT hanya terdapat pada variabel panjang akar (Tabel 11), sedangkan pada

variabel-variabel yang lain tidak terjadi interaksi. Peningkatan konsentrasi BA pada media padat menurunkan panjang akar, sebaliknya peningkatan konsentrasi BA pada media cair dapat meningkatkan panjang akar. Diduga peningkatan konsentrasi BA pada media cair akan semakin mendukung kerja NAA dalam meningkatkan pembesaran sel akar. Dalam penelitian ini, konsentrasi BA tertinggi adalah 1,5 ppm dan termasuk ke dalam konsentrasi rendah. Penggunaan BA pada konsentrasi rendah terbukti mampu meningkatkan panjang akar eksplan kunir putih (Arniputri *et al.*, 2003) dan eksplan jahe (Marlin, 2005).

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan media memberikan pengaruh nyata pada beberapa variabel pengamatan, antara lain: inisiasi akar (Tabel 6), jumlah tunas (Tabel 7), jumlah akar (Tabel 8), jumlah daun (Tabel 9) dan panjang tunas (Tabel 10). Sedangkan pada variabel pengamatan inisiasi kalus, inisiasi embrio, inisiasi tunas, inisiasi tunas samping dan inisiasi daun (Tabel 6) tidak memberikan perbedaan yang nyata. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa secara umum bentuk media berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan eksplan temulawak secara *in vitro*.

Perlakuan media memberikan pengaruh nyata terhadap variabel inisiasi akar. Perlakuan media padat menghasilkan inisiasi akar pada 13,21 hss, sedangkan perlakuan media cair menghasilkan inisiasi akar pada 17,49 hss (Tabel 6). Inisiasi akar pada perlakuan media padat lebih cepat 4,28 hss dibandingkan perlakuan media cair. Secara nyata, hasil tersebut menunjukkan bahwa perlakuan media padat memberikan respon yang lebih baik dibandingkan perlakuan media cair pada pembentukan akar.

Akar merupakan organ penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman karena berfungsi menegakkan tanaman dan menghisap air beserta garam-garam mineral dari media tanam (Tjitrosomo, 1983). Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan media berpengaruh nyata terhadap jumlah akar pada 5 dan 6 mss. Perlakuan media padat menghasilkan jumlah akar (4,86 akar) lebih banyak dibandingkan perlakuan media cair (4,44 akar) (Tabel 8). Peningkatan jumlah akar diduga dipengaruhi oleh inisiasi akar pada perlakuan media padat yang lebih cepat daripada perlakuan media cair. Inisiasi akar yang

lebih cepat mengindikasikan bahwa pertumbuhan akar baik. Pertumbuhan akar yang baik memungkinkan penyerapan nutrisi yang baik pula, sehingga mampu menopang pertumbuhan dan perkembangan eksplan selanjutnya.

Berdasarkan hal tersebut, dapat diduga bahwa pada media dengan penambahan agar sebagai pematat, eksplan dapat tumbuh tegak dengan posisi stabil sehingga penyerapan nutrisi menjadi optimal. Hendaryono dan Wijayani (1994) menyatakan bahwa penggunaan media padat bertujuan menumbuhkan akar serta tunas sehingga eksplan dapat tumbuh menjadi *plantlet*. Sedangkan pada media tanpa penambahan agar, eksplan akan tenggelam di dalam media sehingga menyebabkan proses penyerapan nutrisi terhambat dan mengakibatkan pembentukan akar terhambat juga. Hasil penelitian Marlin (2003) melaporkan bahwa penggunaan media cair pada kultur jahe dapat menghambat pembentukan akar.

Perlakuan media berpengaruh nyata terhadap variabel jumlah tunas pada 5 dan 6 mss (Tabel 7). Pada tabel tersebut tampak bahwa perlakuan media cair menghasilkan jumlah tunas lebih banyak dibandingkan perlakuan media padat. Sesuai dengan hasil penelitian Prathanturarug *et al.* (2005) bahwa penggunaan media cair dapat meningkatkan jumlah tunas pada *preculture Curcuma longa*.

Pembentukan daun rata-rata terjadi pada awal minggu ke empat setelah subkultur. Daun yang dihitung merupakan daun yang telah terbuka sempurna. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan media berpengaruh nyata terhadap variabel jumlah daun pada 4, 5 dan 6 mss. Perlakuan media cair menghasilkan jumlah daun (3,15 helai) lebih banyak dibandingkan perlakuan media padat (2,45 helai) pada 6 mss (Tabel 9). Pada variabel panjang tunas, perlakuan media cair juga menghasilkan panjang tunas lebih tinggi dibandingkan perlakuan media padat yaitu sebesar 5,48 cm (Tabel 10) pada 6 mss.

Pertumbuhan tunas yang baik, diduga dapat memacu pertambahan panjang tunas dan jumlah daun. Peningkatan jumlah tunas diikuti oleh peningkatan jumlah daun dan panjang tunas. Semakin tinggi jumlah tunas yang terbentuk, maka semakin tinggi pula peluang pertambahan panjang tunas dan terbentuknya daun. Hasil penelitian Arniputri *et al.* (2003) menunjukkan bahwa peningkatan jumlah

tunas eksplan kunir putih diikuti dengan penambahan jumlah daun. Di samping itu, Sutarto *et al.* (2003) juga melaporkan bahwa peningkatan jumlah tunas pada eksplan jahe tidak hanya diikuti oleh penambahan panjang tunas, tetapi juga diikuti oleh penambahan jumlah daun.

Peningkatan jumlah tunas, jumlah daun dan panjang tunas pada perlakuan media cair diduga disebabkan oleh proses penggojogan yang dapat meningkatkan aerasi sehingga proses respirasi dapat berjalan dengan lancar dan pertumbuhan sel tanaman dapat meningkat. Pertumbuhan sel tanaman pada media cair akan meningkat karena sel tanaman tumbuh pada media yang homogen dan tidak mengandung derajat nutrisi. Keadaan ini akan menyebabkan permukaan eksplan menjadi lebih baik dalam berkontak dengan nutrisi dibandingkan dengan eksplan yang tumbuh di atas media padat. Eksplan yang ditumbuhkan pada media cair dapat menyerap nutrisi dari segala arah karena terjadi difusi dari segala arah (Hendaryono dan Wijayani, 1994), sehingga eksplan dapat tumbuh dan berkembang dengan optimal.

Perlakuan media tidak memberikan perbedaan yang nyata pada variabel inisiasi kalus, inisiasi embrio, inisiasi tunas, inisiasi tunas samping dan inisiasi daun. Pada awal pertumbuhan eksplan, penyerapan nutrisi diarahkan untuk pembentukan kalus dan embrio (Tabel 6). Diduga penyerapan nutrisi antar perlakuan tidak berbeda sehingga menyebabkan inisiasi kalus dan inisiasi embrio tidak berbeda nyata. Kemudian, pada pertumbuhan selanjutnya penyerapan nutrisi diduga hanya mengarah pada proses pembentukan akar. Setelah akar terbentuk, eksplan dapat menyerap nutrisi-nutrisi yang terkandung di dalam media dengan baik sehingga pertumbuhan selanjutnya dapat berjalan dengan baik. Hal ini terbukti pada rata-rata inisiasi perkembangan (Tabel 6), pembentukan akar yang lebih cepat secara nyata mampu mendorong pembentukan tunas samping dan daun. Pada saat penyerapan nutrisi untuk pembentukan tunas samping dan daun, diduga bahwa eksplan yang ditumbuhkan dalam media padat dan cair masing-masing mempunyai tingkat penyerapan nutrisi yang hampir sama, sehingga menyebabkan inisiasi tunas samping dan inisiasi daun tidak berbeda nyata antar perlakuan.

Kombinasi ZPT memberikan pengaruh yang nyata pada variabel inisiasi akar (Tabel 6), jumlah tunas (Tabel 7) dan jumlah akar (Tabel 8), sedangkan pada variabel inisiasi kalus, inisiasi embrio, inisiasi tunas, inisiasi tunas samping, inisiasi daun (Tabel 6), jumlah daun (Tabel 9) dan panjang tunas (Tabel 10) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Adanya perbedaan pada variabel-variabel tertentu menunjukkan bahwa secara umum penggunaan auksin jenis NAA yang dikombinasikan dengan sitokinin jenis BA berpengaruh pada pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Zulkarnain (2009) menyatakan bahwa kombinasi auksin dan sitokinin dapat memacu morfogenesis tanaman.

Perlakuan kombinasi ZPT berpengaruh nyata terhadap variabel inisiasi akar (Tabel 6) dan jumlah akar pada 3, 4, 5 dan 6 mss (Tabel 8). Inisiasi akar tercepat dan jumlah akar tertinggi masing-masing diperoleh perlakuan NAA 0,5 ppm + BA 0,5 ppm sebesar 12,80 hss dan 5,36 akar. Pada Tabel 8, terlihat bahwa peningkatan jumlah akar diperoleh pada konsentrasi BA terendah yaitu 0,5 ppm sedangkan jumlah akar terendah diperoleh pada konsentrasi BA tertinggi yaitu 1,5 ppm. Diduga, peningkatan konsentrasi sitokinin pada media dapat menghambat pembentukan akar. Wardiyati (1988) menyatakan, salah satu fungsi sitokinin adalah menghambat pembentukan akar, sedangkan penambahan auksin bertujuan untuk memacu pembentukan kalus terutama akar. Semakin tinggi konsentrasi sitokinin yang digunakan, maka pertumbuhan akar semakin terhambat. Sesuai dengan penelitian Marlin (2005), bahwa penambahan BAP sampai 5 ppm akan menghambat pembentukan dan pertumbuhan akar eksplan jahe.

Pada variabel jumlah tunas, perlakuan NAA 0,5 ppm yang dikombinasikan dengan BA 1,5 ppm menghasilkan jumlah tunas lebih banyak dibandingkan dengan penggunaan NAA 0,5 ppm yang dikombinasikan dengan BA 1 ppm dan BA 0,5 ppm. Diduga, peningkatan konsentrasi sitokinin jenis BA akan meningkatkan jumlah tunas eksplan temulawak. Sitokinin merupakan senyawa turunan adenin yang memacu pembelahan sel pada sistem jaringan (Salisbury dan Ross, 1995), memacu pembentukan tunas dan menghambat pembentukan akar (Wardiyati, 1988). Peningkatan konsentrasi sitokinin akan meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman dan juga akan menyebabkan peningkatan

pada jumlah tunas. Hasil penelitian Prathanturarug *et al.* (2005) melaporkan bahwa penggunaan sitokinin jenis TDZ mampu meningkatkan jumlah tunas eksplan *Curcuma longa*. Pada penelitian lain, juga didapatkan bahwa penggunaan sitokinin jenis kinetin sampai 4,6 ppm mampu meningkatkan jumlah tunas pada induksi anthurium secara *in vitro* (Pratiwi *et al.*, 2009).

Perlakuan kombinasi NAA dan BA tidak berpengaruh pada variabel inisiasi kalus, inisiasi embrio, inisiasi tunas, inisiasi tunas samping, inisiasi daun, jumlah daun dan panjang tunas. Diduga, keadaan tersebut terjadi karena perbandingan konsentrasi NAA dan BA yang ditambahkan pada media terlalu rendah, sehingga tidak dapat maksimal dalam mendorong pembentukan akar. Wardiyati (1988) menyatakan, perbandingan auksin dan sitokinin yang digunakan mempengaruhi pertumbuhan tunas dan akar dalam kultur jaringan. Perbandingan antara auksin dan sitokinin yang tinggi akan mendorong pembentukan akar sedangkan perbandingan auksin dan sitokinin yang rendah akan mendorong pembentukan tunas. Zulkarnain (2009) menyatakan bahwa penambahan sitokinin pada media akan menghambat pembentukan akar, menghalangi pertumbuhan akar dan menghambat pengaruh auksin terhadap inisiasi akar.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Terdapat interaksi antara media dan kombinasi ZPT pada variabel panjang akar. Peningkatan konsentrasi BA sampai 1,5 ppm yang dikombinasikan dengan NAA 0,5 ppm pada media cair menghasilkan akar lebih panjang dibandingkan pada media padat. Panjang tunas tertinggi diperoleh media cair dengan NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm sebesar 3,78 cm.
2. Perlakuan media cair (4,03 tunas) menghasilkan jumlah tunas lebih banyak dibandingkan perlakuan media padat (3,30 tunas).
3. Perlakuan kombinasi ZPT NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm menghasilkan jumlah tunas terbanyak dibandingkan perlakuan lain yaitu sebesar 4,33 tunas.

5.2 Saran

Penggunaan media cair dengan NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm merupakan kombinasi terbaik untuk perbanyakan temulawak secara *in vitro*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan jumlah tunas lebih banyak dengan meningkatkan konsentrasi BA di atas 1,5 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, E. dan Tim Lentera. 2004. Khasiat dan Manfaat Temulawak: Rimpang Penyembuh Aneka Penyakit. Agromedia Pustaka. Jakarta. p. 1-14
- Anonymous. 2010^a. Stop Ekspor Produk Jadi, Mempertinggi Daya Saing. <http://www.suaramedia.com/ekonomi-bisnis/usaha-kecil-dan-menengah/17584-stop-ekspor-produk-jadi-mempertinggi-daya-saing.html> (Diakses pada tanggal 13 Maret 2010)
- _____. 2010^b. Temulawak Obat Hepatitis (Sakit Kuning). <http://www.indomedica.com/artikel/pengobatan-a-penyembuhan/99-temulawak-obat-hepatitis-sakit-kuning?format=pdf> (Diakses pada tanggal 13 Maret 2010)
- Arniputri, R. B., Praswanto dan D. Purnomo. 2003. Pengaruh Konsentrasi IAA dan BAP terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman Kunir Putih (*Kaempferia rotunda* L.) secara *In Vitro*. Agrosains 5 (2) : 48-51
- Bakti, C., G. A. Wattimena dan Witjaksono. 2005. Embriogenesis Somatik Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) pada Berbagai Zat Pengatur Tumbuh.
- Chirangini, P, S. K. Sinha and G. J. Sharma. 2005. *In Vitro* Propagation and Microrhizome Induction of *Kaempferia galanga* Linn. and *K. rotunda* Linn. Indian J. of Biotechnology 4: 404-408
- Hendaryono, D. P. S., dan A. Wijayani. 1994. Teknik Kultur Jaringan: Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman secara Vegetatif- Modern. Kanisius. Yogyakarta. p. 84-86
- Hidayat. 2007. Induksi Pertumbuhan Eksplan Endosperm Ulin dengan IAA dan Kinetine. Agritrop 26 (4): 147-152
- Hutami, S. 2006. Penggunaan Arang Aktif dalam Kultur *In Vitro*. Berita Biologi 8 (1): 83-89
- _____. dan R. Purnamaningsih. 2003. Perbanyak Klonal Temu Mangga (*Curcuma mangga*) melalui Kultur *In Vitro*. Buletin Plasma Nutfah 9 (1): 39-44
- Kurnianingsih, R., Marfuah dan I. Matondang. 2009. Pengaruh Pemberian BAP (6-Benzyl Amino Purine) pada Media Multiplikasi Tunas *Anthurium hookerii* Kunth. Enum. Secara *In Vitro*. Vis Vitalis 2 (2): 23-30

- Marlin. 2003. Regenerasi Planlet Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) dengan Pemberian Nitrogen pada Berbagai Bentuk Media Subkultur. J. Akta Agrosia 6 (1): 12-17
- _____. 2005. Regenerasi *In Vitro* Planlet Jahe Bebas Penyakit Layu Bakteri pada Berbagai Taraf Konsentrasi 6-Benzyl Amino Purine (BAP) dan 1-Naphthalene Acetic Acid (NAA). J. Ilmu Pertanian 7 (1): 8-14
- Miachir, J. I., V. L. M. Romani, A. F. de C. Amaral, M. O. Mello, O. J. Crotono and M. Melo. 2004. Micropropagation and Callogenesis of *Curcuma Zedoaria* Roscoe. Sci. Agric. Piracicaba, Braz. 61 (4): 427-432
- Nisa, C. dan Rodinah. 2005. Kultur Jaringan Beberapa Kultivar Buah Pisang (*Musa paradisiaca* L.) dengan Pemberian Campuran NAA dan Kinetin. Bioscientiae 2 (2): 23-36
- Prathanturarug, S., N. Soonthornchareonnon, W. Chuakul, Y. Phaidee and P. Saralamp. 2005. Rapid Micropropagation of *Curcuma longa* Using Bud Explants pre-cultured in Thidiazuron-Supplemented Liquid Medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80: 347-351
- Pratiwi, I., N. Khumaida dan D. Sukma. 2009. Penggunaan Jenis Media Dasar dan Kinetin untuk Induksi Organogenesis *Anthurium Gelombang Cinta* (*Anthurium plowmanii*) secara *In Vitro*. Makalah Seminar Departemen Agronomi dan Hortikultura. FP. IPB.
- Pribadi, E. R. 2009. Pasokan dan Permintaan Tanaman Obat Indonesia serta Arah Penelitian dan Pengembangannya. Perspektif 8 (1): 52-64
- Priyono. 2000. Perbanyak Abaca (*Musa textilis* Nee) melalui Kultur Mata Tunas secara *In Vitro*. J. Ilmu Pertanian 22 (2): 129-133
- Rout, G. R., S. K. Palai, and P. Das. 2001. Onset of *In Vitro* Rhizogenesis and Peroxidase Activity in *Zingiber officinale* (Zingiberaceae). Rev. Biol. Trop. 49 (3-4): 965-971
- Rukmana, R. 2006. Temulawak Tanaman Rempah dan Obat. Kanisius. Yogyakarta. pp. 32
- Salisbury, F. B. dan C. W. Ross. 1995. Fisiologi Tumbuhan. Jilid 3. Penerbit ITB. Bandung. p. 66
- Santoso, U. dan F. N. Sandi. 2003. Kultur Jaringan Tanaman. UMM Press. Malang. p. 89-97, 168-174

- Sugiri, A. 2005. Pembentukan Kalus Embrioid Kultur Ovary Pisang melalui Beberapa Komposisi Media Kultur.
http://www.rudycr.com/PPS702-ipb/10245/anton_sugiri.pdf (Diakses pada tanggal 26 April 2010)
- Sutarto, I., N. Supriatna dan Yuliasti. 2003. Penggunaan Media Alternatif pada Kultur *In Vitro* Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) Varietas Gajah. *Bul. Agron.* 31 (1): 1-7
- Tjitosomo, S. S. 1983. *Botani Umum I*. Angkasa. Bandung. p. 49
- Wardiyati, T. 1998. *Kultur Jaringan Tanaman Hortikultura*. Lembaga Penerbitan Fakultas Pertanian UB. Malang. p. 25-27
- _____, Y. Rinanto, T. Sunarni dan N. Azizah. 2010. Identifikasi Hasil dan Kurkumin pada *Curcuma xanthorrhiza* dan *Curcuma domestica* Hasil Koleksi di Jawa dan Madura. *J. Agrivita* 32 (1): 1-12
- Widiastoety, D dan B. Marwoto. 2004. Pengaruh Berbagai sumber Arang dalam Media Kultur *In Vitro* terhadap Pertumbuhan *Plantlet* *Oncidium*. *J. Hort.* 14 (1): 1-4
- Wijaya, A., Marlina dan H. Damayanti. 2006. Respon Embrio Panili (*Vanilla planifolia* Andrewa) yang Dikulturkan secara *In Vitro* terhadap Peningkatan Konsentrasi NAA (*Naphtaleneacetic Acid*). *Agritek* 14 (4): 801-806
- Yuliani, S. 2001. Prospek Pengembangan Obat Tradisional Menjadi Obat Fitofarmaka. *J. Litbang Pertanian* 20 (3): 1-7
- Yunus, A. 2007. Pengaruh IAA dan Kinetin terhadap Pertumbuhan Eksplan Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) secara *In Vitro*. *J. Akta Agrosia* (1): 53-58
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman Solusi Perbanyak Tanaman Budidaya*. Bumi Aksara. Jakarta. p. 45-51, 98-99

Lampiran 1. Komposisi media Murashige and Skoog (MS)

Tabel 12. Komposisi media Murashige and Skoog (MS) modifikasi pada mikropropagasi temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

| Nama stok | Senyawa dalam larutan stok | Konsentrasi dalam media MS (ppm) | Konsentrasi dalam larutan stok (ppm) |
|---------------------|---|----------------------------------|--------------------------------------|
| Unsur Makro (10 x) | NH ₄ NO ₃ | 1650 | 16500 |
| | KNO ₃ | 1900 | 19000 |
| | CaCl ₂ .2H ₂ O | 440 | 4400 |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 | 3700 |
| | KH ₂ PO ₄ | 170 | 1700 |
| Unsur Mikro (100 x) | H ₃ BO ₃ | 6,20 | 620 |
| | MnSO ₄ .7H ₂ O | 22,30 | 2230 |
| | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,6 | 860 |
| | KI | 0,83 | 83 |
| | Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O | 0,25 | 25 |
| | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,025 | 2,5 |
| | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,025 | 2,5 |
| | NaEDTA.2H ₂ O | 37,3 | 3730 |
| | FeSO ₄ .7H ₂ O | 27,8 | 2780 |
| Vitamin (100 x) | Glycine | 2 | 200 |
| | Myo-inositol | 1000 | 100000 |
| | Thiamine | 0,1 | 10 |
| | Pyridoxine | 0,5 | 50 |
| | Niasin | 0,5 | 50 |
| Sukrosa | Sukrosa | 30000 | Tidak dibuat stok |
| Zat Pengatur tumbuh | NAA | Sesuai perlakuan | 0,5 |
| | BA(b ₁) | | 0,5 |
| | BA(b ₂) | | 1 |
| | BA(b ₃) | | 1,5 |
| Tambahan | Casein Hydrolysate | 0.05 | Tidak dibuat stok |
| Agar | Agar (a ₁) | 6.700 | Tidak dibuat stok |
| | Agar (a ₂) | 0 | |

Lampiran 2. Perhitungan kebutuhan larutan

a) Perhitungan Kebutuhan Larutan Stok pada Tahap Persiapan Eksplan

Pada tahap ini, media yang dibuat sebanyak 1000 mL dengan volume media tiap botol 15 mL.

1) Kebutuhan Stok Makro

$$\begin{aligned}V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\V_1 \times 10 &= 1000 \text{ mL} \times 1/2 \text{ MS} \\V_1 &= \frac{1000 \text{ mL} \times 1/2 \text{ MS}}{10} \\&= 50 \text{ mL}\end{aligned}$$

2) Kebutuhan Stok Mikro

$$\begin{aligned}V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\V_1 \times 100 &= 1000 \text{ mL} \times 1 \text{ MS} \\V_1 &= \frac{1000 \text{ mL} \times 1 \text{ MS}}{100} \\&= 10 \text{ mL}\end{aligned}$$

3) Kebutuhan Stok Fe-EDTA

$$\begin{aligned}V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\V_1 \times 100 &= 1000 \text{ mL} \times 1/2 \text{ MS} \\V_1 &= \frac{1000 \text{ mL} \times 1/2 \text{ MS}}{100} \\&= 5 \text{ mL}\end{aligned}$$

4) Kebutuhan Stok Vitamin

$$\begin{aligned}V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\V_1 \times 100 &= 1000 \text{ mL} \times 1 \text{ MS} \\V_1 &= \frac{1000 \text{ mL} \times 1 \text{ MS}}{100} \\&= 10 \text{ mL}\end{aligned}$$

5) Kebutuhan Sukrosa

$$\begin{aligned}V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\C_1 \times 1000 \text{ mL} &= 1000 \text{ mL} \times 30 \text{ g} \\C_1 &= \frac{1000 \text{ mL} \times 30 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} \\&= 30 \text{ g}\end{aligned}$$

6) Kebutuhan Casein Hydrrolysate

$$\begin{aligned}V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\C_1 \times 1000 \text{ mL} &= 1000 \text{ mL} \times 0,05 \text{ g} \\C_1 &= \frac{1000 \text{ mL} \times 0,05 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} \\&= 0,05 \text{ g}\end{aligned}$$

7) Kebutuhan Agar

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ C_1 \times 1000 \text{ mL} &= 1000 \text{ mL} \times 6,7 \text{ g} \\ C_1 &= \frac{1000 \text{ mL} \times 6,7 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} \\ &= 6,7 \text{ g} \end{aligned}$$

8) Kebutuhan BA 1,5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 \text{ ppm} &= 1000 \text{ mL} \times 1,5 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{1000 \text{ mL} \times 1,5 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 15 \text{ mL} \end{aligned}$$

9) Kebutuhan NAA 0,5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 \text{ ppm} &= 1000 \text{ mL} \times 0,1 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{1000 \text{ mL} \times 0,1 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 10 \text{ mL} \end{aligned}$$

b) Perhitungan Kebutuhan Larutan Stok pada Perlakuan Media Padat

Volume media tiap botol ialah sebanyak 15 mL. Sehingga jumlah total media padat sebesar: 36 botol x 15 mL = 540 mL

Larutan utama:

1) Kebutuhan Stok Makro

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 10 &= 540 \text{ mL} \times 1 \text{ MS} \\ V_1 &= \frac{540 \text{ mL} \times 1 \text{ MS}}{10} \\ &= 54 \text{ mL} \end{aligned}$$

2) Kebutuhan Stok Mikro

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 &= 540 \text{ mL} \times 1 \text{ MS} \\ V_1 &= \frac{540 \text{ mL} \times 1 \text{ MS}}{100} \\ &= 5,4 \text{ mL} \end{aligned}$$

3) Kebutuhan Stok Fe-EDTA

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 &= 540 \text{ mL} \times 1 \text{ MS} \\ V_1 &= \frac{540 \text{ mL} \times 1 \text{ MS}}{100} \\ &= 5,4 \text{ mL} \end{aligned}$$

4) Kebutuhan Stok Vitamin

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 &= 540 \text{ mL} \times 1 \text{ MS} \\ V_1 &= \frac{540 \text{ mL} \times 1 \text{ MS}}{100} \\ &= 5,4 \text{ mL} \end{aligned}$$

5) Kebutuhan Sukrosa

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ C_1 \times 1000 \text{ mL} &= 540 \text{ mL} \times 30 \text{ g} \\ C_1 &= \frac{540 \text{ mL} \times 30 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} \\ &= 16,2 \text{ g} \end{aligned}$$

6) Kebutuhan Casein Hydrolysate

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ C_1 \times 1000 \text{ mL} &= 540 \text{ mL} \times 0,05 \text{ g} \\ C_1 &= \frac{540 \text{ mL} \times 0,05 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} \\ &= 0,027 \text{ g} \end{aligned}$$

7) Kebutuhan NAA 0,5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 \text{ ppm} &= 540 \text{ mL} \times 0,5 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{540 \text{ mL} \times 0,5 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 2,7 \text{ mL} \end{aligned}$$

Larutan perlakuan:

8) Kebutuhan Agar

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ C_1 \times 1000 \text{ mL} &= 180 \text{ mL} \times 6,7 \text{ g} \\ C_1 &= \frac{180 \text{ mL} \times 6,7 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} \\ &= 1,206 \text{ g} \end{aligned}$$

9) Kebutuhan BA 0,5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 \text{ ppm} &= 180 \text{ mL} \times 0,5 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{180 \text{ mL} \times 0,5 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 0,9 \text{ mL} \end{aligned}$$

10) Kebutuhan BA 1 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 \text{ ppm} &= 180 \text{ mL} \times 1 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{180 \text{ mL} \times 1 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 1,8 \text{ mL} \end{aligned}$$

11) Kebutuhan BA 1,5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 \text{ ppm} &= 180 \text{ mL} \times 1,5 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{180 \text{ mL} \times 1,5 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 2,7 \text{ mL} \end{aligned}$$

c) Perhitungan Kebutuhan Larutan Stok pada Perlakuan Media Cair

Volume media tiap botol ialah sebanyak 20 mL. Sehingga jumlah total media padat sebesar: 36 botol x 20 mL = 720 mL

Larutan utama:

1) Kebutuhan Stok Makro

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 10 &= 720 \text{ mL} \times 1 \text{ MS} \\ V_1 &= \frac{720 \text{ mL} \times 1 \text{ MS}}{10} \\ &= 72 \text{ mL} \end{aligned}$$

2) Kebutuhan Stok Mikro

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 &= 720 \text{ mL} \times 1 \text{ MS} \\ V_1 &= \frac{720 \text{ mL} \times 1 \text{ MS}}{100} \\ &= 7,2 \text{ mL} \end{aligned}$$

3) Kebutuhan Stok Fe-EDTA

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 &= 720 \text{ mL} \times 1 \text{ MS} \\ V_1 &= \frac{720 \text{ mL} \times 1 \text{ MS}}{100} \\ &= 7,2 \text{ mL} \end{aligned}$$

4) Kebutuhan Stok Vitamin

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 &= 720 \text{ mL} \times 1 \text{ MS} \\ V_1 &= \frac{720 \text{ mL} \times 1 \text{ MS}}{100} \\ &= 7,2 \text{ mL} \end{aligned}$$

5) Kebutuhan Sukrosa

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ C_1 \times 1000 \text{ mL} &= 720 \text{ mL} \times 30 \text{ g} \\ C_1 &= \frac{720 \text{ mL} \times 30 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} \\ &= 21,6 \text{ g} \end{aligned}$$

6) Kebutuhan Casein Hyrdrolysate

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ C_1 \times 1000 \text{ mL} &= 720 \text{ mL} \times 0,05 \text{ g} \\ C_1 &= \frac{720 \text{ mL} \times 0,05 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} \\ &= 0,036 \text{ g} \end{aligned}$$

7) Kebutuhan NAA 0,5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 \text{ ppm} &= 720 \text{ mL} \times 0,5 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{720 \text{ mL} \times 0,5 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 3,6 \text{ mL} \end{aligned}$$

Larutan perlakuan:

1) Kebutuhan BA 0,5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 \text{ ppm} &= 240 \text{ mL} \times 0,5 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{240 \text{ mL} \times 0,5 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 1,2 \text{ mL} \end{aligned}$$

2) Kebutuhan BA 1 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 \text{ ppm} &= 240 \text{ mL} \times 1 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{240 \text{ mL} \times 1 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 2,4 \text{ mL} \end{aligned}$$

3) Kebutuhan BA 1,5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ V_1 \times 100 \text{ ppm} &= 240 \text{ mL} \times 1,5 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{240 \text{ mL} \times 1,5 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 3,6 \text{ mL} \end{aligned}$$

Lampiran 3. Gambar denah percobaan

| | | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| A2 ₍₂₎ | B1 ₍₁₎ | B2 ₍₃₎ | C4 ₍₁₎ | A4 ₍₃₎ | A1 ₍₃₎ |
| B2 ₍₂₎ | B3 ₍₁₎ | C1 ₍₂₎ | B1 ₍₂₎ | C3 ₍₁₎ | A2 ₍₃₎ |
| B2 ₍₁₎ | C1 ₍₃₎ | A1 ₍₂₎ | B4 ₍₁₎ | C4 ₍₂₎ | C2 ₍₂₎ |
| C3 ₍₂₎ | A3 ₍₃₎ | B4 ₍₂₎ | A1 ₍₁₎ | B1 ₍₃₎ | B3 ₍₂₎ |
| A3 ₍₂₎ | B3 ₍₃₎ | C2 ₍₁₎ | A2 ₍₁₎ | A3 ₍₁₎ | A4 ₍₂₎ |
| C4 ₍₃₎ | A4 ₍₁₎ | C3 ₍₃₎ | C1 ₍₁₎ | B4 ₍₃₎ | C2 ₍₃₎ |

(a)

| | | | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| D2 ₍₁₎ | F3 ₍₁₎ | D2 ₍₂₎ | E4 ₍₃₎ | F1 ₍₁₎ | D2 ₍₃₎ |
| D3 ₍₃₎ | F4 ₍₁₎ | D4 ₍₂₎ | F3 ₍₃₎ | D1 ₍₃₎ | D1 ₍₁₎ |
| E1 ₍₂₎ | E4 ₍₁₎ | D3 ₍₂₎ | F4 ₍₂₎ | D4 ₍₃₎ | E2 ₍₃₎ |
| F1 ₍₂₎ | E1 ₍₁₎ | F3 ₍₂₎ | E3 ₍₃₎ | F1 ₍₃₎ | F4 ₍₃₎ |
| E2 ₍₂₎ | E3 ₍₂₎ | F2 ₍₂₎ | E3 ₍₁₎ | F2 ₍₃₎ | E1 ₍₃₎ |
| D4 ₍₁₎ | D3 ₍₁₎ | D1 ₍₂₎ | E4 ₍₂₎ | F2 ₍₁₎ | E2 ₍₁₎ |

(b)

Gambar 4. Denah percobaan pada media padat (a) dan media cair (b)

A1₍₁₎

Keterangan: A : menunjukkan perlakuan
 1 : menunjukkan ulangan ke-1
 (1) : menunjukkan nomor botol ke-1

Lampiran 4. Data pengamatan eksplan mati dan terkontaminasi

Tabel 13. Jumlah eksplan mati dan terkontaminasi

| Perlakuan | Jumlah Awal Eksplan | Jumlah Eksplan Mati dan Terkontaminasi pada Umur Pengamatan (mss): | | | | | | Jumlah Akhir Eksplan |
|---------------|---------------------|--|----------|--------------|----------|----------|----------|----------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| a1b1 | 24 | - | - | - | - | - | - | 24 |
| a1b2 | 24 | - | - | - | - | 2 (J) | - | 22 |
| a1b3 | 24 | - | - | - | - | 1 (J) | - | 23 |
| a2b1 | 24 | - | 2 (J) | 1 (M); 2 (J) | - | - | - | 19 |
| a2b2 | 24 | - | - | - | - | - | - | 24 |
| a2b3 | 24 | - | 2 (J) | - | - | - | - | 22 |
| Jumlah | 144 | 0 | 4 | 3 | 0 | 3 | 0 | 134 |

Keterangan a1b1 : media padat dengan NAA 0,5 ppm + BA 0,5 ppm; a1b2 : media padat dengan NAA 0,5 ppm + BA 1 ppm; a1b3 : media padat dengan NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm; a2b1 : media cair dengan NAA 0,5 ppm + BA 0,5 ppm; a2b2 : media cair dengan NAA 0,5 ppm + BA 1 ppm; a2b3 : media cair dengan NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm; M: eksplan mati; J: eksplan terkontaminasi.



Lampiran 5. F hitung pada hasil analisis ragam setiap variabel pengamatan

Tabel 14. F hitung perkembangan eksplan

| SK | F hitung Inisiasi Perkembangan | | | | | | F Tabel | |
|-----------|--------------------------------|-----------------|----------------|------------------------|---------------|---------------|---------|------|
| | inisiasi kalus | inisiasi embrio | inisiasi tunas | inisiasi tunas samping | inisiasi akar | inisiasi daun | 5 % | 1 % |
| Perlakuan | 1,083 | 1,839 | 1,261 | 0,400 | 5,416** | 0,967 | 2,77 | 4,25 |
| Media (A) | 0,428 | 1,040 | 2,797 | 0,667 | 12,523** | 0,702 | 4,41 | 8,29 |
| ZPT(B) | 1,809 | 3,338 | 1,262 | 0,331 | 6,078** | 0,787 | 3,55 | 6,01 |
| AxB | 0,685 | 0,739 | 0,491 | 0,337 | 1,200 | 1,279 | 3,55 | 6,01 |
| KK (%) | 26,354 | 24,395 | 34,930 | 25,903 | 19,160 | 18,069 | | |

Keterangan: Bilangan pada berbagai variabel pengamatan tanpa didampingi tanda (*) menunjukkan tidak berbeda nyata, tanda (*) menunjukkan beda nyata pada taraf 5 % dan tanda (**) menunjukkan beda nyata pada taraf 5% berdasarkan uji F.

Tabel 15. F hitung jumlah tunas eksplan temulawak pada berbagai umur pengamatan

| SK | F hitung Jumlah Tunas pada Berbagai Umur Pengamatan (mss): | | | | | | F Tabel | |
|-----------|--|--------|--------|---------|----------|---------|---------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 5 % | 1 % |
| Perlakuan | 0,879 | 1,177 | 1,493 | 5,215** | 5,86** | 4,673** | 2,77 | 4,25 |
| Media (A) | 1,141 | 1,784 | 0,038 | 2,699 | 5,089* | 5,581* | 4,41 | 8,29 |
| ZPT(B) | 0,133 | 1,407 | 2,571 | 9,409** | 10,551** | 7,639** | 3,55 | 6,01 |
| AxB | 1,494 | 0,644 | 1,142 | 2,278 | 1,555 | 1,254 | 3,55 | 6,01 |
| KK (%) | 14,312 | 20,182 | 24,392 | 18,482 | 19,654 | 20,584 | | |

Keterangan: Bilangan pada berbagai umur pengamatan tanpa didampingi tanda (*) menunjukkan tidak berbeda nyata, tanda (*) menunjukkan beda nyata pada taraf 5 % dan tanda (**) menunjukkan beda nyata pada taraf 5% berdasarkan uji F; mss= minggu setelah subkultur.

Tabel 16. F hitung jumlah akar eksplan temulawak pada berbagai umur pengamatan

| SK | F hitung Jumlah Akar pada Berbagai Umur Pengamatan (mss): | | | | | | F Tabel | |
|-----------|---|--------|---------|----------|----------|----------|---------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 5 % | 1 % |
| Perlakuan | 0,685 | 0,572 | 3,987* | 5,151** | 5,531** | 7,713** | 2,77 | 4,25 |
| Media (A) | 2,521 | 1,822 | 4,160 | 3,888 | 5,284* | 5,141* | 4,41 | 8,29 |
| ZPT(B) | 0,439 | 0,455 | 7,587** | 10,406** | 10,879** | 15,314** | 3,55 | 6,01 |
| AxB | 0,012 | 0,063 | 0,300 | 0,527 | 0,306 | 1,397 | 3,55 | 6,01 |
| KK (%) | 37,756 | 38,529 | 25,298 | 22,416 | 9,237 | 9,631 | | |

Keterangan: Bilangan pada berbagai umur pengamatan tanpa didampingi tanda (*) menunjukkan tidak berbeda nyata, tanda (*) menunjukkan beda nyata pada taraf 5 % dan tanda (**) menunjukkan beda nyata pada taraf 5% berdasarkan uji F; mss= minggu setelah subkultur.

Tabel 17. F hitung jumlah daun eksplan temulawak pada berbagai umur pengamatan

| SK | F hitung Jumlah Daun pada Berbagai Umur Pengamatan (mss): | | | | | F Tabel | |
|-----------|---|--------|--------|--------|----------|---------|------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 5% | 1% |
| | Perlakuan | 1,469 | 0,557 | 2,135 | 2,463 | 3,110* | 2,77 |
| media (A) | 0,796 | 1,569 | 5,605* | 6,576* | 12,427** | 4,41 | 8,29 |
| ZPT(B) | 2,425 | 0,049 | 1,562 | 2,691 | 0,781 | 3,55 | 6,01 |
| AxB | 0,851 | 0,559 | 0,974 | 0,179 | 0,781 | 3,55 | 6,01 |
| KK (%) | 8,099 | 16,457 | 34,915 | 31,899 | 17,102 | | |

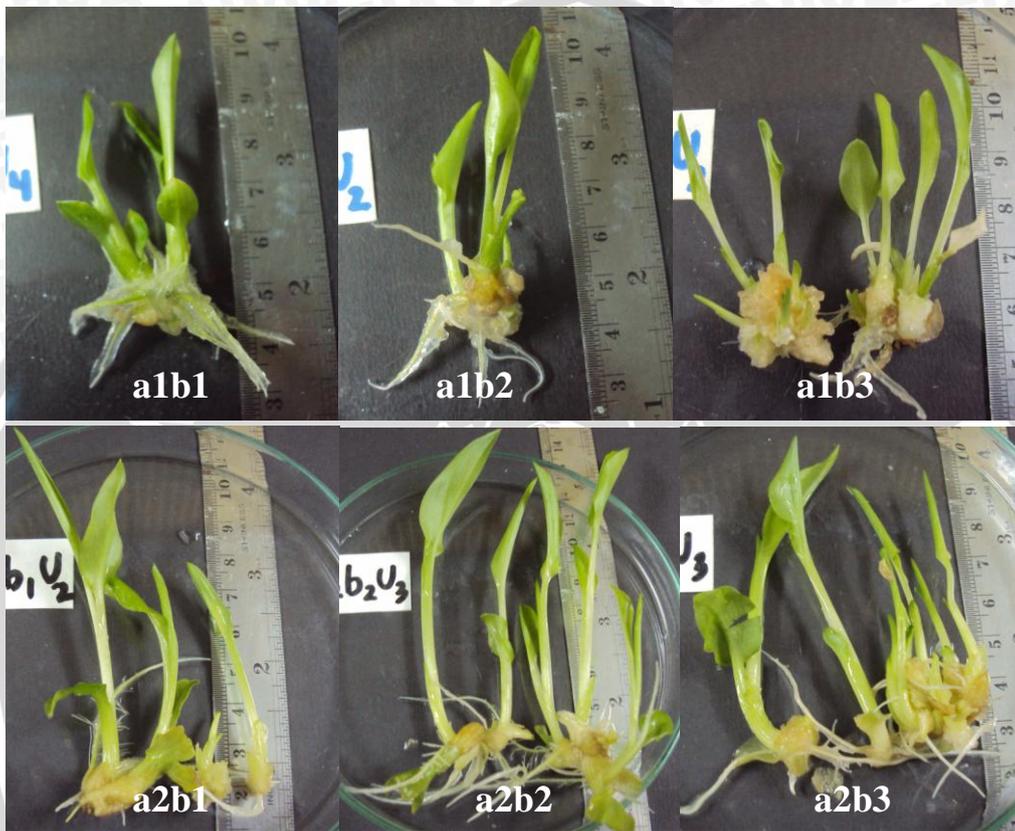
Keterangan: Bilangan pada berbagai umur pengamatan tanpa didampingi tanda (*) menunjukkan tidak berbeda nyata, tanda (*) menunjukkan beda nyata pada taraf 5 % dan tanda (**) menunjukkan beda nyata pada taraf 5% berdasarkan uji F; mss= minggu setelah subkultur.

Tabel 18. F hitung panjang tunas dan akar eksplan temulawak pada 6 mss

| SK | F hitung | | F Tabel | |
|-----------|---------------|--------------|---------|------|
| | Panjang Tunas | Panjang Akar | 5% | 1% |
| Perlakuan | 4,560** | 13,355** | 2,77 | 4,25 |
| media (A) | 20,594** | 51,710** | 4,41 | 8,29 |
| ZPT(B) | 0,535 | 0,326 | 3,55 | 6,01 |
| AxB | 0,569 | 7,206** | 3,55 | 6,01 |
| KK (%) | 26,594 | 17,335 | | |

Keterangan: Bilangan tanpa didampingi tanda (*) menunjukkan tidak berbeda nyata, tanda (*) menunjukkan beda nyata pada taraf 5 % dan tanda (**) menunjukkan beda nyata pada taraf 5% berdasarkan uji F; mss= minggu setelah subkultur.

Lampiran 6. Dokumentasi penelitian



Gambar 5. *Plantlet* temulawak akibat perlakuan media dan kombinasi ZPT pada 6 mss

Keterangan: a1b1 : media padat dengan NAA 0,5 ppm + BA 0,5 ppm; a1b2 : media padat dengan NAA 0,5 ppm + BA 1 ppm; a1b3 : media padat dengan NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm; a2b1 : media cair dengan NAA 0,5 ppm + BA 0,5 ppm; a2b2 : media cair dengan NAA 0,5 ppm + BA 1 ppm; a2b3 : media cair dengan NAA 0,5 ppm + BA 1,5 ppm.