

**PENGARUH MEDIA DASAR DAN ZAT PENGATUR TUMBUH BAP PADA
PERBANYAKAN MIKRO *Pinus merkusii***

*Influence of basal medium and plant growth regulators BAP on micropropagation
technique for Pinus merkusii*

I.L.G. Nurtjahjaningsih

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar Km. 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta 55582
Telp. (0274) 895954, 896080, Fax. (0274) 896080

ABSTRACT

Micropropagation technique is applied to produce large number of plants. Juvenile explants and culture medium are two crucial factors that influence the success. The aims of this study were to determine culture medium that was most effective to induce shoot and to produce plantlets from embryo culture of Pinus merkusii. Screening of five cytokines and five basal medium were carried out. Then, explants were cultured on the best cytokine and basal medium for plant regeneration. The results showed that BAP was the best cytokine type; LP and GD medium were the best medium compositions for shoots induction. GD medium supplemented by high concentration BAP showed the best medium for shoots induction. Solid GD medium containing 0,25 μ M BAP was effective for multiple shoots. Liquid GD medium without plant hormone was the best composition for shoots elongation. Half strength of GD medium without plant hormone gave the best result for rooting.

Key Words : Pinus merkusii, micropropagation, LP media, GD media, BAP

ABSTRAK

Teknik perbanyakan secara mikro diaplikasikan untuk menghasilkan tanaman dalam jumlah banyak. Eksplan yang juvenil dan media kultur merupakan dua faktor penting yang berpengaruh pada keberhasilan teknik tersebut. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui media kultur yang paling efektif untuk menginduksi tunas dan menghasilkan tanaman baru pada kultur embrio *Pinus merkusii*. Seleksi media tumbuh dilakukan terhadap sitokinin dan medium dasar yang paling sesuai untuk induksi tunas. Untuk regenerasi tanaman, eksplan ditanam pada jenis sitokinin dan medium dasar yang paling sesuai berdasarkan hasil seleksi media. Hasil menunjukkan bahwa BAP merupakan jenis sitokinin yang paling sesuai, sedangkan LP atau GD merupakan komposisi medium yang paling baik untuk induksi tunas. Medium GD dengan penambahan BAP pada konsentrasi tinggi (2,5-10 μ M) merupakan media yang paling efektif untuk induksi tunas. Sedangkan, medium GD dengan penambahan BAP pada konsentrasi rendah (0,25 μ M) menunjukkan medium yang paling baik untuk perbanyakan tunas.

Medium GD cair tanpa penambahan zat pengatur tumbuh merupakan komposisi yang paling baik untuk pemanjangan tunas. Medium 1/2 GD tanpa penambahan ZPT memberikan hasil yang terbaik untuk pembentukan akar.

Kata Kunci : *Pinus merkusii*, teknik perbanyak tanaman secara mikro, medium LP, medium GD, BAP

I. PENDAHULUAN

Teknik perbanyak vegetatif secara mikro atau kultur jaringan digunakan untuk berbagai tujuan. Dibandingkan dengan pembiakan vegetatif secara konvensional, kelebihan teknik ini adalah menghasilkan tanaman baru dalam jumlah banyak dalam waktu singkat (Maruyama dkk., 2003; Xie dan Hong, 2001). Sehingga untuk pembangunan hutan klonal keberhasilan teknik ini sangat diperlukan. Manfaat teknik kultur jaringan yang lain adalah kelebihannya dalam mengisolasi jaringan yang sehat dari jasad renik penyebab penyakit melalui kultur meristem (Llyod dan McCown, 1981). Teknik ini juga ditempuh untuk memuliakan tanaman melalui bioteknologi dengan tujuan rekayasa genetik (Taniguchi dkk., 1996).

Pinus merkusii merupakan satu-satunya jenis Pinus yang tersebar secara alami di Indonesia (Cooling, 1968). Kayu *P. merkusii* digunakan untuk furnitur, batang korek api, sedangkan yang paling nyata mendatangkan devisa negara adalah produksi resin dan terpentin dimana kandungannya mempunyai sifat yang spesifik dibandingkan dengan *P. merkusii* yang ada di Thailand and Filipina. Hutan tanaman untuk jenis ini tersebar hampir di seluruh Indonesia untuk tujuan komersial maupun rehabilitasi lahan. Selain itu,

strategi pemuliaan untuk jenis ini sudah dimulai sejak tahun 70-an (Soeseno, 1988). Untuk menjamin ketersediaan bibit dalam jumlah cukup, berbagai teknik pembiakan vegetatif seperti stek, grafting, cangkok sedang diupayakan, sedangkan teknik kultur jaringan sedang dirintis sebagai metode alternatif dalam pembiakan vegetatif.

Teknik kultur jaringan pada jenis konifer telah banyak dilaporkan. Banyak penelitian menunjukkan bahwa asal eksplan dan perlakuan media kultur merupakan faktor penting dalam keberhasilan teknik ini (Gamborg dkk., 1976), selain faktor genetik (Miguel dkk., 2004; Liesebach dan Naujoks, 2004). Pada dasarnya semua sel mempunyai sifat totipotensi yaitu kemampuan regenerasi sel menjadi individu baru. Namun, salah satu permasalahan yang dihadapi pada jenis konifer adalah kemampuan regenerasi sel yang sangat terbatas kecuali bagian tanaman yang masih bersifat juvenil seperti embrio (Silveira dkk., 2004). Selain itu, komposisi medium yang sesuai untuk jenis gymnosperm berbeda dengan jenis angiosperm (Bornman, 1983). Karena banyak faktor yang berpengaruh pada keberhasilan teknik ini maka seleksi terhadap protokol dipandang dapat menghemat waktu dan biaya (Jang dan Tainter, 1991).

Beberapa tulisan melaporkan bahwa keberhasilan seleksi protokol tergantung pada eksplan dan media tumbuh seperti komposisi media, jenis maupun konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) (Tuskan dkk., 1990), serta kedekatan secara taksonomi (Abdullah dkk., 1987; Vaario dkk., 1999). Namun, karena respon jaringan terhadap media tumbuh sangat bervariasi pada masing-masing individu pohon, modifikasi media tumbuh sering dilakukan (Bhatia dkk., 2004). Informasi awal mengenai teknik kultur jaringan *P. merkusii* belum banyak dilaporkan. Sehingga, seleksi terhadap media tumbuh masih perlu dilakukan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menetapkan jenis media dasar dan sitokinin yang paling efektif untuk mendapatkan plantlet *P. merkusii*. Penelitian ini diharapkan bisa digunakan sebagai informasi dasar untuk mengembangkan bibit melalui kultur jaringan maupun memuliaan mutu genetik *P. merkusii* melalui transformasi genetik.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan Tanaman

Embrio yang digunakan sebagai bahan kultur berasal dari biji yang diperoleh dari penyerbukan terbuka di kebun benih *P. merkusii* di Jember, Jawa Timur. Biji tersebut merupakan campuran dari beberapa pohon plus yang ada di kebun benih tersebut.

B. Memecah dormansi biji dan sterilisasi eksplan

Untuk memecahkan dormansi dan mempermudah pemisahan embrio dari endospermnya, biji direndam dalam 7% hydrogen peroxide (H_2O_2) selama 10 menit. Kemudian biji dibilas

menggunakan air mengalir sampai bersih dari H_2O_2 dan direndam dalam air destil selama 24 jam.

Setelah 24 jam biji direndam, sterilisasi biji dilakukan dalam 7% H_2O_2 selama 10 menit dan dibilas dengan air destilasi steril sampai bersih. Sterilisasi ini dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* (laminar). Embrio dikeluarkan dari dalam endospermnya dengan cara memisahkan kulit biji dari endosperm. Setelah itu endosperm dibuka dan embrio dikeluarkan dari endosperm dan ditanam pada media kultur.

C. Media dan kondisi kultur

1. Seleksi media tumbuh

Seleksi media tumbuh dilakukan terhadap jenis sitokinin dan media dasar yang paling sesuai.

a. Jenis sitokinin

Untuk mengetahui jenis sitokinin dan konsentrasi yang paling sesuai untuk embrio *P. merkusii*, eksplan ditumbuhkan pada medium dasar GD (Tabel 1) dan masing-masing ditambahkan 5 jenis sitokinin yaitu 4-CPPU, BAP, TDZ, 2-iP dan Zeatin, masing-masing pada konsentrasi 0,0; 2,5; 5,0; 7,5 dan 10,0 μM . Media dipadatkan menggunakan 0,3% agar (Merck). Sterilisasi medium dilakukan menggunakan autoclave pada suhu 121° C selama 20 menit. Kemudian medium dituang ke wadah petri dish sebanyak ± 25 ml. Setelah medium dingin, petri dish ditutup dan direkatkan menggunakan parafilm. Kultur diinkubasi pada suhu 25° C dibawah lampu 5,000 lux selama 16 jam/ hari.

Jumlah tunas yang terinduksi dihitung setelah 2 minggu kultur. Analisa varian (ANOVA) dilakukan untuk mengetahui

pengaruh jenis dan konsentrasi sitokinin terhadap jumlah tunas. Apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap parameter yang diukur, dilanjutkan dengan uji LSD. ANOVA dan uji LSD dilakukan menggunakan program SPSS versi 11.

b. Media dasar

Untuk mengetahui medium dasar yang paling sesuai untuk medium kultur, eksplan ditumbuhkan pada medium dasar antara lain: media LP (Arnold dan Eriksson, 1977), GD (Gresshoff dan Doy, 1972), SH (Schenk dan Hildebrandt, 1972), WPM (Lloyd dan McCrown, 1981) dan MS (Murashige dan Skoog, 1962). Komposisi nutrisi untuk masing-masing medium disajikan pada Tabel 1. Ke dalam masing-masing medium ditambahkan jenis sitokinin yang paling sesuai (diperoleh pada percobaan 1a) pada konsentrasi 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 μM . Media dipadatkan dengan agar 0,3% (Merck). Sterilisasi media menggunakan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit. Medium dituang ke dalam petri dish sebanyak 25 ml. Petri dish ditutup dan dirapatkan dengan Parafilm. Kultur diinkubasi pada suhu 25° C dibawah lampu 5,000 lux selama 16 jam/ hari.

Jumlah tunas baru dihitung setelah 2 minggu kultur. ANOVA dilakukan untuk mengetahui pengaruh medium dasar dan konsentrasi BAP terhadap jumlah tunas. Apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap parameter yang diukur, dilanjutkan dengan uji LSD.

Kemudian eksplan disub-kultur ke medium tahap perbanyak tunas.

2. Perbanyak tunas

Tahap perbanyak dilakukan pada medium GD dengan penambahan BAP pada konsentrasi

1/10 dari konsentrasi sebelumnya, yaitu 0, 0,25; 0,5; 0,75 dan 1,0 μM . Kemudian medium dituang ke botol brisk sebanyak 25 ml. Media dipadatkan menggunakan agar 0,3% (Merck). Sterilisasi medium dilakukan menggunakan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit. Kultur diinkubasi pada suhu 25° C dibawah lampu 5,000 lux selama 16 jam/ hari.

Jumlah tunas baru dihitung setelah 1 bulan kultur. ANOVA dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi BAP terhadap jumlah tunas. Apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap parameter yang diukur, dilanjutkan dengan uji LSD.

Kemudian eksplan disub-kultur ke medium tahap pemanjangan tunas.

3. Pemanjangan tunas

Medium untuk tahap pemanjangan tunas menggunakan medium GD cair tanpa penambahan ZPT. Medium dituang ke dalam Erlenmeyer 250 ml, sebanyak 25-30 ml. Sterilisasi medium menggunakan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit. Selama kultur, medium kultur di-shaker dengan kecepatan rendah. Sub-kultur dilakukan setiap 1 minggu selama 1 bulan menggunakan komposisi medium yang sama. Kultur diinkubasi pada suhu 25° C dibawah lampu 5,000 lux selama 16 jam/ hari.

ANOVA dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi BAP yang telah diberikan sebelumnya terhadap panjang tunas setelah 1 bulan kultur. Apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap parameter yang diukur, dilanjutkan dengan uji LSD. Eksplan kemudian disub-kultur ke medium tahap perakaran.

4. Perakaran

Medium tahap perakaran menggunakan 3 medium perlakuan yaitu 1/2 medium GD padat tanpa ZPT, 1/2 medium GD padat dengan

penambahan 0,2 μ M IBA dan arang aktif, 1/2 medium GD cair tanpa ZPT dalam fluorite. Medium tersebut dituang ke tabung reaksi sebanyak 10 ml. Sterilisasi medium mengguna-

Tabel 1. Komponen bahan kimia pada masing-masing media dasar

No.	Bahan Kimia	Media dasar				
		LP	GD	SH	WPM	MS
		(mg / L)				
1	Elemen Makro					
	NH ₄ NO ₃	400			400	1,650
	(NH ₄) ₂ SO ₄		200			
	NH ₄ H ₂ PO ₄			300		
	KNO ₃	1,800	1,000	2,500		1,900
	KCl		300			
	K ₂ SO ₄				990	
	CaCl ₂ .2H ₂ O		150	200	96	440
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	1,200			556	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	360	250	400	370	370
	KH ₂ PO ₄	270			170	170
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O		90			
	Na ₂ HPO ₄		30			
2	Elemen Mikro					
	MnSO ₄ .H ₂ O	1	11,79	10	22,3	22,3
	ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6	3	1	8,6	8,6
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02	0,25	0,1		0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02	0,25	0,1	0,25	0,025
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25	0,1	0,25	0,25
	KI	0,03	0,75	1		0,83
	H ₃ BO ₃	6,2	3	5	6,2	6,2
	FeSO ₄ .7H ₂ O	30	27,8	15	27,8	27,8
	Na ₂ -EDTA	40	37,3	20	37,3	37,3
3	Vitamin					
	Nicotinic acid		0,1	5	0,5	0,5
	Pyridoxine-HCl		0,1	0,5	0,5	0,5
	Thiamine-HCl	0,4	1	5	1	0,1
	Myo-Inositol	1,000	10	100	100	100
	L-Glycine				2	2
4	Karbohidrat					
	Sucrose	20	20	30	20	30

kan autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit. Kultur diinkubasi pada suhu 25° C dibawah lampu 5,000 lux selama 16 jam/ hari.

ANOVA dilakukan untuk mengetahui pengaruh medium perakaran terhadap jumlah dan panjang akar setelah 1 bulan kultur.

Kemudian plantlet disub-kultur ke perlakuan aklimatisasi.

5. Aklimatisasi

Plantlet yang berasal dari media perakaran dicuci menggunakan air yang mengalir untuk membersihkan agar. Kemudian, plantlet ini ditanam pada media aklimatisasi yang terdiri dari *vermiculite* dengan wadah pot plastik yang ditutup dengan tutup plastik transparan (Gambar 3). Pot-pot tersebut diletakkan dalam bak plastik berukuran besar dan disimpan pada suhu 25° C dengan pencahayaan yang cukup. Untuk menjaga kelembaban, medium disiram 2 kali seminggu. Setelah waktu 5-7 hari, tutup plastik transparan dibuka sedikit demi sedikit, dan tutup dibuka secara keseluruhan setelah 1 bulan di suhu ruang.

Kemudian plantlet dipindahkan ke kondisi lapangan. Pengamatan terhadap kemampuan hidup plantlet dilakukan setelah 1 bulan di lapangan.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

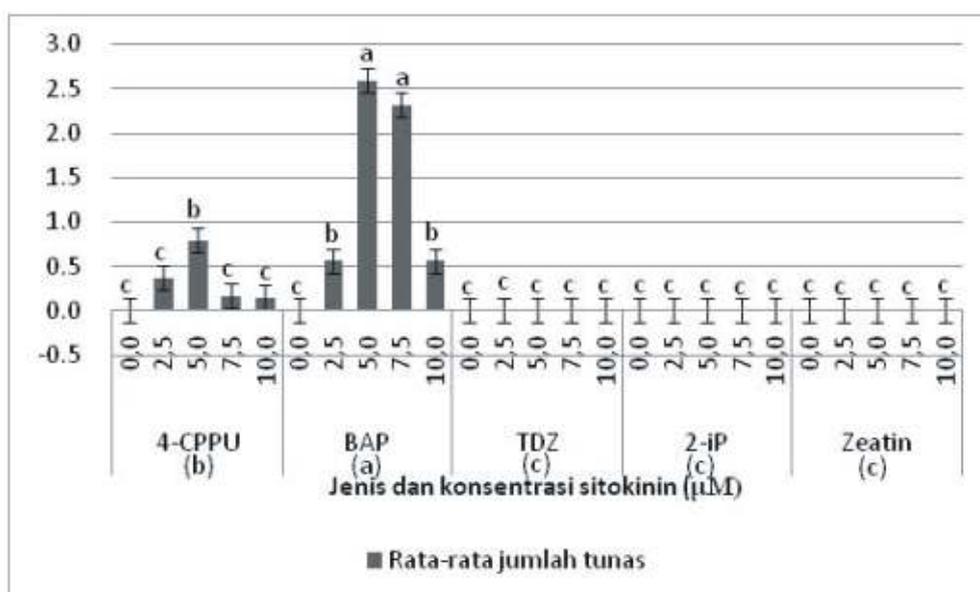
A. Hasil

1. Seleksi media tumbuh

1a. Jenis sitokinin

Respon eksplan terhadap media ini ditandai dengan perubahan warna embrio dari putih menjadi kemerahan setelah 5 hari pada media kultur. Warna merah ini berubah menjadi kehijauan setelah 7 hari kultur dan membentuk kalus yang berwarna kehijauan setelah 10 hari kultur. Kalus yang terinduksi tersebut menjadi tunas.

Efektivitas sterilisasi eskplan ditandai dengan rendahnya persen kontaminasi (hampir 0%) sampai akhir pengamatan, sehingga dapat disimpulkan bahwa teknik sterilisasi yang



Grafik 1. Pengaruh jenis dan konsentrasi sitokinin terhadap jumlah tunas yang terinduksi

dilakukan cukup baik untuk eksplan embrio *P. merkusii*.

Dari kelima jenis sitokinin yang diuji, hanya 4-CPPU dan BAP yang mampu menginduksi tunas, sedangkan eksplan tidak memberikan respon terhadap perlakuan TDZ, 2-iP dan Zeatin (Grafik 1). Selain itu, BAP secara nyata menginduksi tunas lebih baik dibandingkan 4-CPPU.

Baik pada perlakuan BAP maupun 4-CPPU, penambahan jenis sitokinin ini berpengaruh nyata terhadap jumlah tunas. BAP pada konsentrasi 5,0 dan 7,5 μM menginduksi tunas paling banyak.

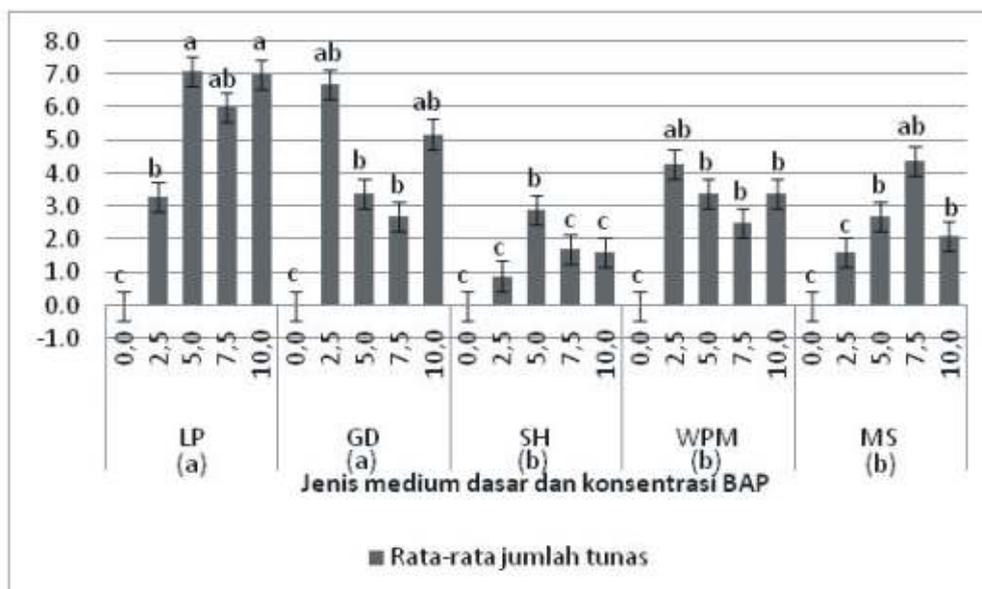
1b. Medium dasar

Komposisi nutrisi dalam medium dasar berpengaruh secara nyata terhadap inisiasi tunas (Grafik 2). Jumlah tunas baru lebih banyak terinduksi pada medium LP dan GD dibandingkan pada medium SH, WPM dan MS. Sedangkan pengaruh medium LP dan GD terhadap jumlah tunas tidak berbeda nyata.

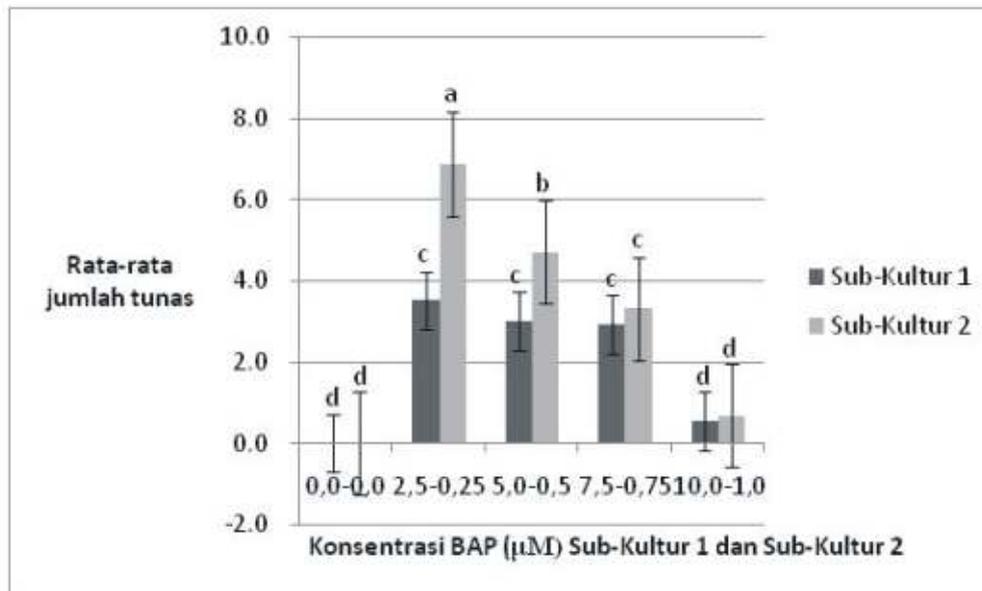
Penambahan BAP memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah tunas yang terinduksi. Namun pada kisaran konsentrasi yang diuji (2,5-10 μM) tidak memberikan perbedaan yang nyata.

2. Perbanyakan tunas

Tunas baru tidak terinduksi pada medium GD tanpa BAP, baik pada sub kultur 1 maupun 2 (Grafik 3). Pada sub-kultur 1, banyaknya jumlah tunas pada kisaran konsentrasi BAP yang lebih rendah (2,5-7,5 μM) menunjukkan jumlah tunas yang lebih banyak dibanding pada konsentrasi tinggi (10,0 μM). Pada sub kultur 2, jumlah tunas menjadi semakin banyak pada konsentrasi BAP rendah (0,25 μM) dibandingkan konsentrasi yang lebih tinggi (0,5-1,0 μM) (Gambar 1). Selain itu, penambahan jumlah tunas dari sub kultur 1 ke sub kultur 2 menunjukkan perbedaan yang nyata pada konsentrasi BAP yang rendah (0,25-0,5 μM).



Grafik 2. Pengaruh jenis medium dasar dan konsentrasi BAP terhadap jumlah tunas yang terinduksi



Grafik 3. Pengaruh pengurangan konsentrasi BAP terhadap perbanyak jumlah tunas



Gambar 1. Tahap perbanyak pada medium GD dengan penambahan 0,25 μM BAP setelah 1 bulan kultur (Foto: ILG. Nurtjahjaningsih, 2002)

3. Pemanjangan tunas

Pengaruh medium GD tanpa penambahan ZPT terhadap panjang tunas ditunjukkan pada Grafik 4. Pada sub kultur 1, konsentrasi 0,25 dan 0,5 μM secara nyata menstimulus pemanjangan tunas lebih baik dibandingkan pada konsentrasi 0,75 dan 1,0 μM . Sedangkan pada sub kultur 2

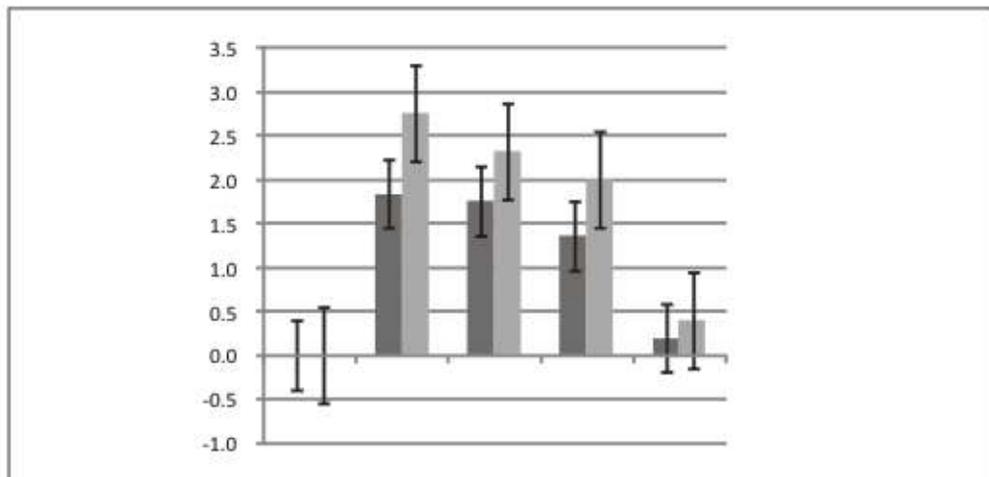
dimana eksplan yang berasal dari 0,25 μM disubkultur ke medium GD tanpa ZPT, tunas memanjang lebih baik dibandingkan pada konsentrasi lainnya.

4. Perakaran

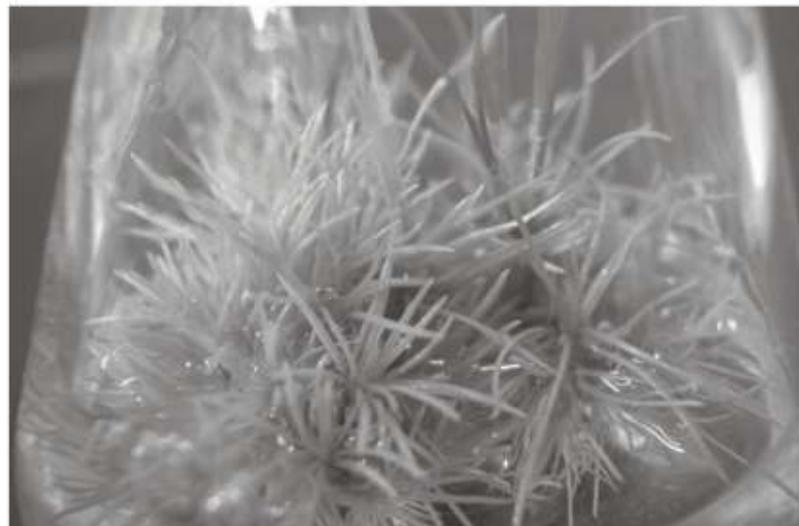
Frekuensi tunas yang berakar hanya terjadi pada medium 1/2 GD padat tanpa ZPT, sedangkan tunas tidak memberikan respon pada medium 1/2 GD padat dengan penambahan 0,2 μM IBA dan arang aktif dan 1/2 GD cair tanpa ZPT dan florite (Grafik 5). Pada dua media terakhir tersebut terjadi pembentukan kalus disekitar tunas sehingga akar gagal terinduksi.

5. Aklimatisasi

Untuk aklimatisasi plantlet ditanam kedalam pot yang berisi vermikulit (Gambar 3). Plantlet tersebut dijaga pada suhu ruang selama 1 bulan dan lebih dari 90% keberhasilan hidup. Plantlet terlihat sehat, secara fenotipik tidak berbeda dengan bibit yang dihasilkan dari metode perbanyak lainnya (Gambar 4).



Grafik 4. Pengaruh medium GD cair tanpa ZPT terhadap panjang tunas



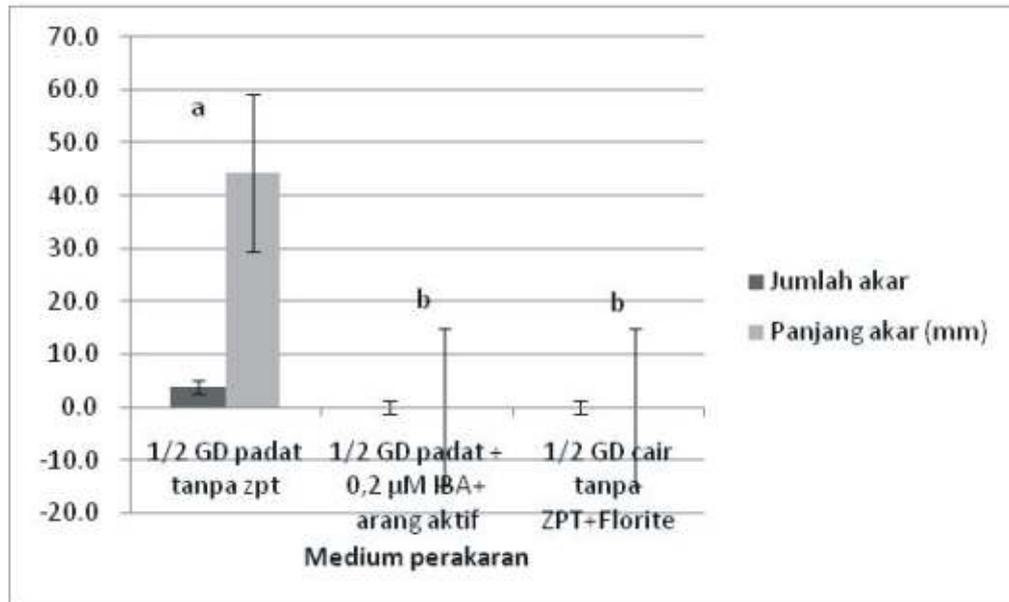
Gambar 2. Tunas yang berasal dari $0,25\mu\text{M}$ di subkultur pada medium GD cair tanpa ZPT
(Foto: ILG. Nurtjahjaningsih, 2002)



Gambar 3. Plantlet dalam pot plastik berisi vermikulit dengan tutup plastik transparan pada tahap aklimatisasi
(Foto: ILG. Nurtjahjaningsih, 2002)



Gambar 4. Plantlet *P. merkusii* yang akan dipindahkan dari kondisi terkontrol ke kondisi lapangan
(Foto: ILG. Nurtjahjaningsih, 2002)



Grafik 5. Pengaruh medium perakaran terhadap jumlah dan panjang akar

B. Pembahasan

1. Seleksi terhadap jenis sitokinin dan media dasar

Pemberian ZPT jenis sitokinin dalam media kultur dilakukan untuk memecah dormansi meristem tunas dan menstimulus pembelahan sel (Panaia dkk., 2004). Respon sel tanaman terhadap jenis phytohormon bervariasi dan bersifat spesifik tergantung pada fase pembelahan sel atau jenis eksplan yang digunakan (Takahashi dkk., 2004). Pada penelitian ini tunas terinduksi lebih efektif pada BAP dibanding 4-CPPU, sedangkan eksplan tidak memberikan reaksi pada perlakuan TZD, Zeatin dan 2-iP. BAP dan TDZ merupakan sitokinin sintesis yaitu jenis sitokinin yang tidak diproduksi oleh tanaman, sedangkan Zeatin dan 2-iP merupakan sitokinin alami yaitu termasuk dalam proses metabolisme dalam sel. Jenis sitokinin alami ini diduga kurang efektif dalam menstimulus pembentukan tunas baru dibandingkan sitokinin sintesis seperti BAP (Panaia dkk., 2004). Sehingga BAP lebih sering

digunakan untuk menginduksi tunas terutama pada jenis-jenis konifer karena sifatnya yang stabil terhadap suhu tinggi.

Medium dasar yang diuji pada penelitian ini merupakan medium dasar yang umum digunakan dalam teknik kultur jaringan baik jenis daun lebar maupun konifer. Hasil menunjukkan bahwa medium LP dan GD merupakan media paling efektif untuk menginduksi tunas pada *P. merkusii* dibandingkan media dasar SH, WPM dan MS. Medium GD memberikan hasil yang efektif pada kultur *P. echinata* dan *P. virginiana* (Jang dan Tainter, 1991). Beberapa literatur melaporkan bahwa konsentrasi NH_4 berperan dalam menginduksi tunas. Pada kultur *P. ponderosa*, hubungan rata-rata jumlah tunas yang terinduksi dan konsentrasi atau garam-garaman bersifat negatif, artinya jumlah tunas meningkat pada konsentrasi NH_4 atau garam yang rendah (Tuskan dkk., 1990). Bahkan jumlah tunas semakin meningkat pada setengah konsentrasi komposisi medium. Diantara kelima media yang diuji, medium GD

memiliki konsentrasi NH_4 paling rendah diikuti oleh LP, WPM, SH dan MS (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa kultur *P. merkusii* memerlukan NH_4 dalam konsentrasi rendah. Namun demikian, pada beberapa kultur jenis konifer lainnya, hubungan tunas yang terinduksi dan konsentrasi NH_4 bersifat positif, artinya tunas terinduksi pada konsentrasi NH_4 yang tinggi (Bermudez dan Sommer, 1987; Chalupta dkk., 1976). Seperti pada kultur *P. lambertiana*, tunas terinduksi lebih banyak pada medium DCR dimana mempunyai konsentrasi NH_4 tinggi (Gupta dan Durzan, 1985). Elemen lain yang penting adalah vitamin: kisaran komposisi vitamin yang terkandung dalam medium LP dan GD merupakan salah satu alasan medium ini lebih baik dari medium lain yang dicobakan seperti yang dilaporkan oleh Bornman (1983). Selain itu, elemen kalsium (Ca) juga memegang peranan penting dalam meningkatkan persen hidup protoplasma, menstabilkan membran juga meningkatkan frekuensi pembelahan sel (Arnold dan Eriksson, 1977). Pada pengembangan medium LP pada kultur *Pisum sativum*, konsentrasi Ca yang rendah dalam medium harus diimbangi dengan kandungan Mg yang tinggi. Namun pada medium GD dimana konsentrasi Ca hampir seimbang dengan konsentrasi Mg juga memberikan hasil yang baik pada penelitian ini.

Sehingga dari hasil-hasil yang telah disebutkan di muka bisa disimpulkan bahwa kandungan hara dalam media menentukan pertumbuhan eksplan dan komposisi yang dibutuhkan berbeda untuk setiap sel tanaman.

2. Regenerasi tanaman

Hasil penelitian menunjukkan BAP mutlak dibutuhkan untuk menginisiasi tunas pada kultur embrio *P. merkusii*. Selain itu, kebutuhan BAP berbeda-beda tergantung pada tahapan pengembangan organ (organogenesis). Pada tahap induksi tunas, pemberian BAP secara nyata berpengaruh terhadap induksi tunas pada kisaran konsentrasi yang cukup tinggi (2,5-10,0 μM). Kisaran konsentrasi BAP yang tinggi tersebut merupakan perlakuan yang paling baik pada kultur jenis konifer yang lain seperti pada kultur *P. lambertiana* (2 μM) (Gupta dan Durzan, 1985), *Picea abies* (4 μM) (Verhagen dan Wann, 1989). Sedangkan pada tahap perbanyakan tunas, pengurangan konsentrasi BAP menjadi sepersepuluh konsentrasi sebelumnya (0,25-1,0 μM) mampu meningkatkan jumlah tunas baru. Pada kultur *Populus euphratica*, perbanyakan tunas dilakukan dengan penambahan BAP dalam konsentrasi rendah, sebaliknya eksplan mengalami vitrifikasi pada konsentrasi BAP yang tinggi (Watanabe dkk., 1999) bahkan jumlah tunas menurun pada kultur *Chamaecyparis pisifera* (Maruyama dkk., 2003). Selain itu, penelitian ini menunjukkan bahwa pemanjangan tunas dilakukan pada medium tanpa penambahan ZPT. Pemanjangan tunas sering dilakukan pada konsentrasi sitokinin yang rendah, seperti pada *P. brutia* (BAP = 0,05 mg/L) (Abdullah dkk., 1987). Selain itu, penelitian ini menunjukkan penggunaan medium cair terbukti menstimulus pemanjangan tunas. Peningkatan perbanyakan tunas juga diperoleh pada medium cair kultur *Allium sativum* (Kim dkk., 2003), *P. taeda* (Silveira dkk., 2004) dan jenis konifer lainnya (Gupta dan Timmis, 2005).

Beberapa jenis tanaman menunjukkan perakaran merupakan tahapan yang paling sulit diantara tahapan kultur lainnya (Ilan dkk., 1995). Faktor genetik diduga berpengaruh terhadap keberhasilan perakaran karena mempengaruhi aktivitas hormon endogenous dan metabolisme (Ilan dkk., 1995). Penelitian sebelumnya menunjukkan IBA mempunyai peran penting dalam perakaran (Jasrai dan Kannan, 1996). Selain itu, penelitian lain menunjukkan untuk induksi akar diperlukan stres lingkungan dari kondisi yang ideal kemudian dipindahkan ke dalam kondisi yang kurang ideal. Pada penelitian ini, untuk menginduksi akar stres lingkungan dilakukan pada pada setengah konsentrasi media GD tanpa ZPT, sedangkan media lain dengan penambahan IBA, arang aktif maupun forlita tidak mampu menginduksi akar. Setengah konsentrasi media dasar tanpa ZPT mampu menginisiasi pembentukan akar pada kultur *P. radiata* (Schestibratov dkk., 2003). Pada kultur *O. indicum*, perakaran diinduksi pada satu perempat konsentrasi media MS (Naomita dkk., 2004). Pada kultur *P. pinaster* stres dilakukan pada perlakuan IBA dengan konsentrasi tinggi (1 μ M) dapat merangsang pembentukan akar (Bornman, 1983).

Aklimatisasi merupakan fase penting untuk bibit yang berasal dari kultur jaringan. Sambungan pembuluh antara tunas dan akar yang harus terbentuk untuk mengalirkan unsur hara sering tidak kuat atau bahkan tidak terjadi sehingga mengakibatkan gagalnya fase aklimatisasi (Ilan dkk., 1995). Walaupun masih dalam jumlah yang sedikit, plantlet yang dihasilkan dalam penelitian tumbuh baik pada kondisi lapangan.

IV. KESIMPULAN

Hasil seleksi terhadap media tumbuh menunjukkan bahwa BAP merupakan jenis sitokinin yang paling baik untuk induksi tunas, sedangkan medium LP dan GD merupakan medium dasar yang paling sesuai pada kultur embrio *P. merkusii*. Penambahan BAP memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah dan panjang tunas, untuk tahap induksi membutuhkan konsentrasi BAP yang relatif tinggi (BAP = 2,5-10,0 μ M), namun pada tahap perbanyakan tunas memerlukan konsentrasi yang rendah (BAP = 0,25 μ M), sedangkan pada tahap pemanjangan tunas tidak memerlukan penambahan ZPT (BAP = 0,0 μ M). Media perakaran yang paling sesuai adalah medium GD tanpa ZPT. Karena jumlah plantlet yang berakar masih sedikit, sehingga untuk penelitian selanjutnya pengembangan media untuk perakaran masih perlu dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A.A., Yeoman, M.M., Grace, J. (1987). Micropropagation of mature Calabrian pine (*Pinus brutia* Ten.) from fascicular buds. *Tree Physiology* **3**: 123-136.
- Arnold, S.V and Eriksson Tage (1977) A revised medium for growth of pea mesophyll protoplasts. *Phisiol. Plant.* **39**: 257 - 260
- Bermudez, P., Sommer, H.E. (1987) Factors affecting adventitious, bud induction in *Pinus elliottii* (Engelm.) embryos cultured in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **11**: 25-35
- Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T., Midmore, D. (2004) Tissue culture studies of tomato

- (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **4566PB**: 1-21
- Bornman, C.H. (1983). Possibilities and constraints in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies* in vitro. *Physiol. Plant* **57**: 5-16
- Chalupta, V., Durzan, D.J., Vithaysai, C. (1976). Growth and metabolism of cell and tissues of jack pine (*Pinus bankisana*) 2. Quantitative analysis of growth of callus from hypocotyls and radicles. *Canadian Journal of Botany* **54**: 446-455
- Cooling, E.N. (1968). Fast growing timber tree of the lowland tropics. No.4. CFI. *Pinus merkusii* Commonwealth Forestry Institute. Department of Forestry, University of Oxford. 169p.
- Gamborg, O.L., Murashige, T, Thorpe, T.A., Vasil, I.K. (1976). Plant tissue culture media. *In Vitro* **12 (7)**: 473-478
- Gresshoff PM, Doy CH (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* **107**: 161 - 170
- Gupta, P.K., Durzan, D.J. (1985). Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports* **4**: 177-179
- Gupta, P.K. Timmis, R. (2005). Mass propagation of conifer trees in liquid cultures-progress towards commercialization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **81**: 339-346
- Ilan, Avihai, Meira Ziv, Abraham H. Halevy (1995). Propagation and corm development of *Brodiaea* in liquid cultures. *Scientia Horticulturae* **63**: 101-112
- Jang, J.C and Tainter, F.H. (1991). Micro-propagation of shortleaf, Virginia and loblolly x shortleaf pine hybrids via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **25**: 61-67
- Jasrai, T.Y., Kannan, R.V. (1996). Micro-propagation of *Gmelina arborea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **46**: 269-271
- Kim, E.K., Hahn, E.J., Murthy, H.N., Paek, K.Y.(2003). High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* **73**: 231-236
- Liesebach, M., Naujoks, G. (2004). Approaches on vegetative propagation of difficult -to-root *Salix caprea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **79**: 239-247
- Llyod, G. McCown, B. (1981). Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *International Plant Prop. Soc. Proc.* **30**: 421-427
- Maruyama, E., Hosoi, Y., Ishii, K. (2003). Somatic embryo culture for propagation, artificial seed production, and conservation of sawara cypress (*Chamaecyparis pisifera* Sieb. Et Zucc.). *J. For. Res.* **8**: 1-8
- Miguel, C., Goncalves, S., Tereso, S., Marum, L., Maroco, J., Oliveira, M.M. (2004). Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated families of Portuguese plus tree of maritime pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**: 121-130
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473 - 497

- Naomita, V., Dalal, V., Rai, R. (2004). In vitro propagation of *Oroxylum indicum* Vent. a medically important forest tree. *J. For. Res.* **9**: 61-65
- Panaia, M., Senaratna, T., Dixon, K.W., Sivasithamparam, K. (2004). The role of cytokinins and thidiazuron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the Restionaceae. *Australian Journal of Botany* **52**: 257-265
- Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. G. Bot* **50**: 199-204
- Schestibratov, K.A., Mikhailov R.V. Dolgov, S.V. (2003). Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **72**: 139-146
- Silveira, V., Floh, E.I.S., Handro, W., Guerra, M.P. (2004) Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **76**: 53-60
- Soeseno, Oemi Hani'in. (1988). Genetic variation and improvement of *Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese. Dissertation. Gadjah Mada University. 266p.
- Takahashi, W., Sugawara, F., Yamamoto, N., Bando, E., Matsushita, J., Tanaka, O. (2004). Plant regeneration in *Actinidia polygama*, Miq. by leaf, stem, and petiole culture with zeatin, and from stem-derived calli on sucrose medium. *J. For. Res.* **9**: 85-88
- Taniguchi, T., Tabuchi, K., Yamaguchi, K., Fujisawa, Y. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acanthopanax sciadophylloides*. *J. For. Res.* **1**: 51-55
- Tuskan, G.A., Sargent, W.A., Rensema, T., Walla, J.A. (1990). Influence of plant growth regulators, basal media and carbohydrate levels on the in vitro development of *Pinus ponderosa* (Dougl. Ex Law.) cotyledon explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **20**: 47-52
- Vaario, L.M., Tanaka, M., Ide, Y. (1999). In vitro plantlet regeneration of *Abies firma* from germinated seedlings. *The Bulletin of the Tokyo University Forest* **102**:103-111
- Verhagen, S. A. and Wann, S.R. (1989). Norway spruce somatic embryogenesis: high-frequency initiation from light-cultured mature embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **16**: 103-111
- Watanabe, S., Kojima, K., Ide, Y., Sasaki, S. (1999). Establishment of a tissue culture system of *Populus euphratica* Oliv. *The Bulletin of the Tokyo University Forests* **102**: 87-92
- Xie, D.Y. Hong, Y. (2001). Regeneration of *Acacia mangium* through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* **20**: 34-40