

# Karakter Anatomi Daun Kultur Purwoceng Pascakonservasi *In Vitro*

Rita Ningsih<sup>1</sup>, Ireng Darwati<sup>2</sup>, Rita Megia<sup>3</sup>, dan Ika Roostika T.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi FMIPA Universitas Haluoleo, Kampus Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 93232  
Telp. (0401) 3191929; Faks. (0401) 3190496; E-mail: rita\_unhalu@yahoo.com

<sup>2</sup>Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

<sup>3</sup>Jurusan Biologi FMIPA Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

<sup>4</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

Diajukan: 19 Juli 2010; Diterima: 9 Februari 2011

## ABSTRACT

**Leaf Anatomy Characteristic of Pruatjan Cultures Post *In Vitro*.** Evaluation of anatomical characteristics regenerant planlet of purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) cultivated on conservation medium was observed to determine the difference of characteristics performance of the planlet grown on conservation medium and those that was maintained on the normal medium. Stomata was microscopically observed on abaxial leaf paradermal section that prepared by whole mount method and leaf structure on cross section by paraffin method. The result showed that stomata density was greater on the planlets regenerated in the conservation medium but stomata length was lower than those on the normal medium. Upper epidermis, mesofil and lower epidermis length of the regenerant on the conservation medium were lower than those on the normal medium. Sorbitol and paclobutrazol applied reduced the performance of regenerated species than those of planlet maintained on the normal medium. Combination of both application resulted in anatomical character differences on the plants regenerated on normal medium.

**Keywords:** *Pimpinella pruatjan* Molk, conservation, regenerant, anatomical character.

## ABSTRAK

Pengujian terhadap karakter anatomi daun regeneran purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) pasca penyimpanan dalam medium konservasi telah dilakukan untuk mengetahui karakter anatomi daun regeneran pascakonservasi dalam medium dengan penambahan kombinasi sorbitol dan paklobutrazol selama 4 dan 8 bulan. Selanjutnya daun regeneran tersebut dibandingkan dengan daun regeneran dalam medium normal (kontrol). Pengamatan stomata dan struktur daun dilakukan secara mikroskopis masing-masing terhadap sayatan paradermal daun yang dibuat melalui metode *whole mount* dan sayatan melintang yang dibuat melalui metode paraffin. Hasil pengamatan menunjukkan terdapat perbedaan anatomi daun regeneran yang dikultur pada medium konservasi dan daun regeneran pada medium normal (kontrol). Densitas stomata daun regeneran yang tumbuh pada media konservasi rata-rata

lebih tinggi dibandingkan dengan daun regeneran pada media kontrol, tetapi stomata lebih pendek dibandingkan dengan daun regeneran pada media kontrol. Panjang epidermis atas, mesofil, dan epidermis lebih pendek dibandingkan dengan kontrol. Penurunan daya regenerasi berkorelasi dengan perbedaan karakter anatomi. Pengaruh sorbitol dan paklobutrazol selama periode konservasi masih bertahan (persisten) pada tanaman regeneran. Kombinasi perlakuan keduanya menghasilkan perbedaan karakter anatomi pada daun regeneran purwoceng.

**Kata kunci:** *Pimpinella pruatjan* Molk, konservasi, regeneran, karakter anatomi.

## PENDAHULUAN

Purwoceng merupakan tanaman obat bernilai ekonomi tinggi. Akarnya memiliki khasiat utama sebagai afrodisiak, yaitu meningkatkan gairah seksual dan menimbulkan ereksi (Hernani dan Yuliani, 1990). Menurut Rahardjo (2003), saat ini populasi purwoceng di habitat alaminya sudah punah akibat eksploitasi secara besar-besaran sebagai bahan baku jamu tanpa usaha penanaman kembali. Purwoceng sulit dibudidayakan di luar habitat alaminya karena memiliki persyaratan tumbuh yang spesifik. Oleh karena itu, purwoceng dikategorikan sebagai tanaman langka yang sangat dilindungi (Rivai *et al.*, 1992). Untuk menghindari kepunahan purwoceng perlu dilakukan upaya konservasi secepatnya. Berbagai upaya untuk melindungi eksistensi spesies ini telah dilakukan, di antaranya melalui konservasi secara *in vitro* pada media konservasi.

Menurut hasil penelitian terakhir (Megia *et al.*, 2008), periode konservasi purwoceng pada media *in vitro* dapat diperpanjang selama 8 bulan melalui teknik pertumbuhan minimal dengan memberikan regulator osmotik (sorbitol) dan retardan

pertumbuhan (paklobutrazol) secara bersama-sama. Namun kultur yang telah dikonservasi tersebut mengalami penurunan daya regenerasi pada media pemulihan. Selain itu, kultur menunjukkan gejala kerdil pada perlakuan sorbitol dan paklobutrazol konsentrasi tinggi. Untuk itu, diperlukan pengujian pada berbagai aspek seperti anatomi, fisiologi, dan sitologi bahkan molekuler (DNA).

Kondisi yang diharapkan pada protokol konservasi adalah kultur dapat disimpan selama mungkin tanpa mengalami penurunan daya regenerasi dan terjaminnya stabilitas genetik. Konservasi tanaman strawberi selama 15 bulan tidak mengalami perubahan genetik berdasarkan pengujian DNA (RAPD) (Neveen *et al.*, 2008). Menurut Harding dalam Sarkar *et al.*, 2001, stres osmotik menggunakan manitol dapat menimbulkan hiper-metilasi terhadap DNA *microplant* kentang. Beberapa bukti juga menunjukkan bahwa penggunaan retardan merangsang terjadinya mutagenik (Sarkar *et al.*, 2001).

Pengujian stabilitas genetik pada tingkatan molekuler (DNA) sudah banyak dilakukan, tetapi pada aspek anatomi sangat jarang. Padahal prosedur dan biayanya relatif mudah dan murah dibandingkan dengan metode molekuler. Untuk itu, sebelum melangkah lebih jauh, diperlukan pengujian karakter anatomi daun kultur terlebih dahulu. Selanjutnya pembuktian diikuti oleh analisis keterkaitan antara penurunan daya regenerasi dengan struktur anatomi daun kultur.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Ekofisiologi Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro) dan Laboratorium Anatomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA Institut Pertanian Bogor pada bulan Juni sampai November 2008.

Sampel merupakan daun kultur regenerasi purwoceng berumur 3 bulan yang telah mengalami periode konservasi 4 (RPPK4) dan 8 bulan (RPPK8) dalam media DKW + sukrosa 2,5% yang mengandung kombinasi sorbitol (0, 1, 2, 3, 4, dan 5%) dan paklobutrazol (0, 1, 3, dan 5 ppm). Adapun media regenerasi, yaitu DKW + BA 4 ppm + TDZ 0,4 ppm + glutamin 100 ppm (Roostika *et al.*, 2005) dengan penambahan GA<sub>3</sub> 3 ppm. Sebagai bahan

perbandingan dibuat pula preparat daun purwoceng dari lapang.

Pengamatan karakter anatomi stomata daun dilakukan secara mikroskopis terhadap preparat irisan paradermal epidermis bawah daun. Sedangkan struktur daun diamati melalui preparat irisan melintang daun. Preparat paradermal dibuat melalui metode *Whole Mount* (Sass, 1951) yang dimodifikasi, dengan pewarnaan safranin 2% (b/v) dan irisan melintang daun dibuat melalui metode paraffin dengan dehidran n-butanol (Nakamura, 1995). Blok sampel diiris melintang dengan ketebalan 10 µm menggunakan mikrotom putar Yamato RV-240. Selanjutnya diwarnai dengan safranin 2% (b/v) selama 3 malam dan *fast green* 0,5% (b/v) selama 1,5 jam.

Karakter anatomi daun pada preparat paradermal yang diamati ialah struktur stomata, bentuk sel epidermis, kerapatan, dan panjang stomata. Pengamatan kerapatan stomata dilakukan sebanyak 3 ulangan, setiap ulangan meliputi dua luas bidang pandang yang dipilih secara acak, sedangkan pengukuran panjang stomata dilakukan 3 ulangan setiap ulangan meliputi 10 stomata yang dipilih secara acak.

Karakter anatomi irisan melintang daun meliputi: tebal epidermis atas dan bawah, tebal mesofil serta kualitatif struktur daun. Ketebalan epidermis dan mesofil merupakan nilai rata-rata pengukuran pada tiga bagian helaian daun yang tidak mengandung berkas pembuluh. Kualitatif struktur daun yang diamati meliputi tingkat diferensiasi jaringan, bentuk dan susunan sel serta kandungan kloroplas. Pengamatan dilakukan sebanyak 3 ulangan di bawah mikroskop cahaya pada perbesaran 100 dan 400X. Pengambilan foto dilakukan dengan menggunakan fotomikroskop Olympus CX 40 yang disambungkan dengan kamera Olympus OM-20.

Percobaan dilakukan secara faktorial dalam rancangan acak kelompok lengkap (RAKL). Data yang diperoleh dari ke-24 kombinasi perlakuan dianalisis dengan ANOVA, dilanjutkan dengan uji Duncan Multi Range Test (DMRT) pada taraf  $\alpha = 5\%$  menggunakan program SPSS for Windows 13.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Struktur Stomata dan Sel Epidermis

Pengamatan secara kualitatif terhadap sayatan paradermal daun menunjukkan bahwa purwoceng memiliki stomata pada kedua permukaan daun, baik adaksial (atas) maupun abaksial (bawah), disebut juga amfistomatik (Fahn, 1990). Jumlah stomata pada permukaan daun abaksial lebih banyak atau lebih rapat dari adaksial.

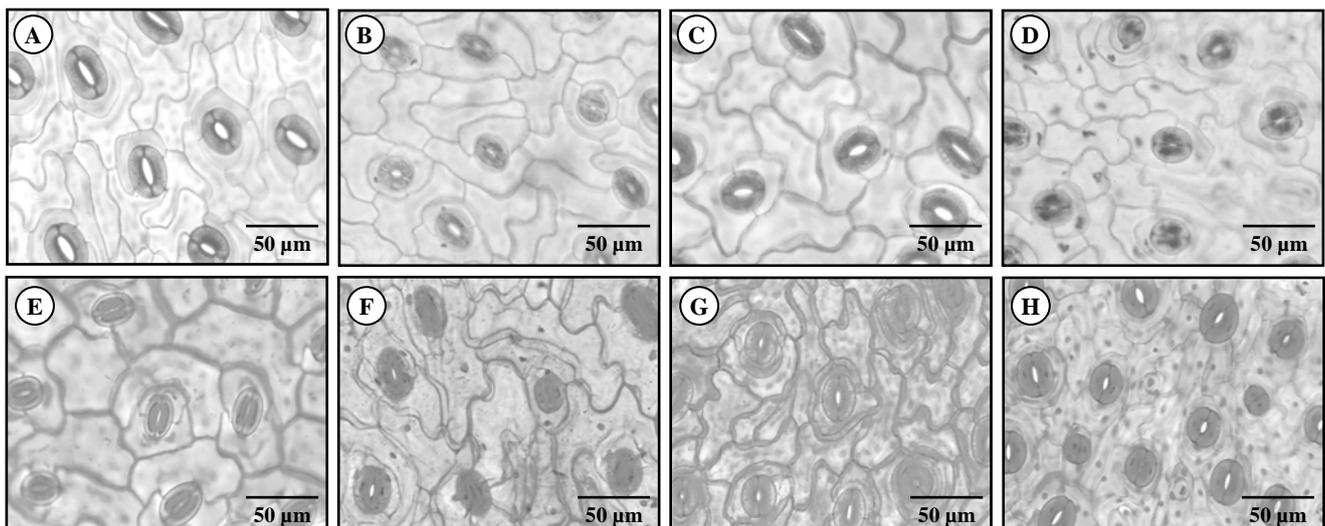
Stomata memiliki sel penjaga berbentuk seperti ginjal, dikelilingi oleh dua sel tetangga dengan dinding bersama dari kedua sel tetangga itu tegak lurus terhadap sumbu melalui panjang sel penutup serta celah (diasitik). Selain itu, ditemukan pula tipe stomata anomositik di mana bentuk sel tetangga tidak dapat dibedakan dengan sel epidermis lainnya (Fahn, 1990). Sel epidermis bervariasi, ada yang memanjang-berlekuk (Gambar 1 A, B, D, F, G) dan pendek-membulat (Gambar 1 C, E, H).

Pengamatan terhadap struktur kualitatif stomata dan sel epidermis menunjukkan tidak ada perbedaan di antara kontrol dan semua kombinasi perlakuan. Variasi bentuk sel epidermis tidak hanya pada kontrol, tetapi juga pada semua kombinasi perlakuan. Diduga perbedaan ini bukan pengaruh dari perlakuan, tetapi merupakan variasi dari sifat tanaman sampel.

### Kerapatan Stomata

Hasil analisis ragam terhadap rata-rata kerapatan stomata menunjukkan bahwa interaksi sorbitol dan paklobutrazol selama periode konservasi 4 bulan nyata meningkatkan kerapatan stomata daun yang telah diregenerasi (RPPK4). Kerapatan stomata paling tinggi terdapat pada daun dari planlet yang telah mengalami penyimpanan dengan kombinasi perlakuan S4P3 (239 stomata/mm<sup>2</sup>). Tingkat kerapatan stomata paling rendah terdapat pada daun yang diberi kombinasi perlakuan S2P1 (133,8 stomata/mm<sup>2</sup>), lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (155,7 stomata/mm<sup>2</sup>), tetapi secara statistik tidak berbeda nyata (Gambar 2). Daun dari dua kombinasi perlakuan (S5P3 dan S5P5) tidak diamati karena ukuran daun sangat kecil (lebar ±0,3 cm) sehingga sulit dibuat sayatan.

Pengamatan karakter anatomi daun regenerasi pascakonservasi 8 bulan (RPPK8) hanya dilakukan terhadap 11 kombinasi perlakuan, karena sebagian planlet mati pada saat dikonservasi atau diregenerasi sebelum mencapai bulan ketiga. Kerapatan stomata daun planlet RPPK8 menunjukkan hasil yang bervariasi. Ada kecenderungan, semakin tinggi konsentrasi kombinasi perlakuan semakin tinggi pula nilai kerapatan stomata/mm<sup>2</sup> daun (Gambar 2). Sebagai pembanding, kerapatan stomata daun di lapangan adalah 206,3/mm<sup>2</sup>. Kerapatan stomata daun



Gambar 1. Stomata daun bulan ke-3 regenerasi pascakonservasi 4 bulan (RPPK4), 8 bulan (RPPK8), dan daun dari lapang (E). RPPK4: Kontrol (A), S0P5 (B), S1P0 (C), S3P1 (D). RPPK8: S0P5 (F), S1P0 (G), S3P1 (H) (perbesaran 400x).

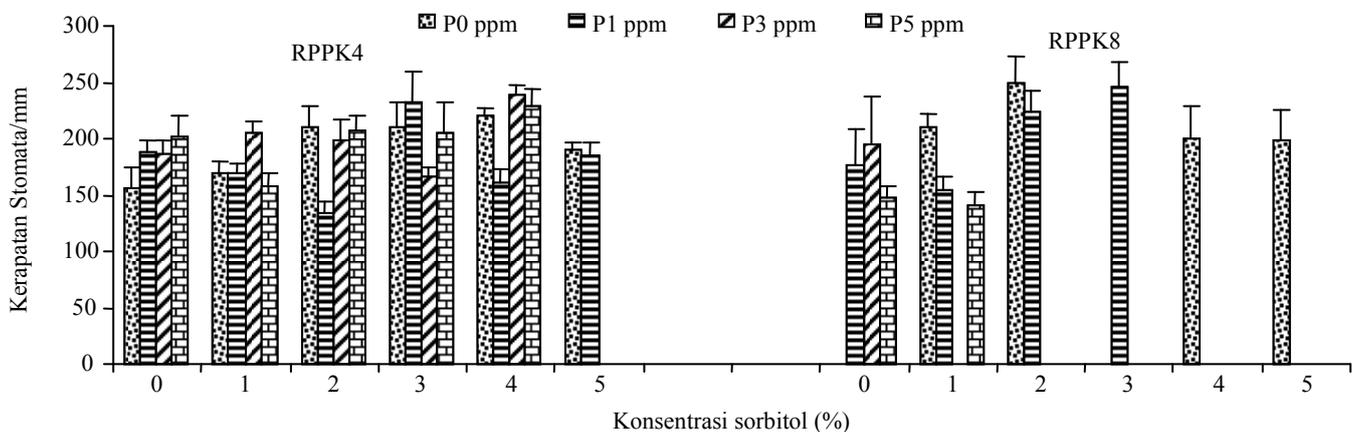
kultur pada RPPK8 secara umum lebih tinggi dari daun pada planlet RPPK4 (Gambar 2).

Hasil pengamatan terhadap karakter kerapatan stomata daun regenerasi pada periode konservasi 4 bulan (RPPK4) dan 8 bulan (RPPK8) menunjukkan bahwa aplikasi sorbitol dan paklobutrazol selama periode konservasi masih berpengaruh. Nilai kerapatan stomata cenderung meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi kedua faktor tersebut. Hal ini berhubungan dengan pengecilan ukuran daun seiring dengan peningkatan konsentrasi selama periode konservasi, meskipun planlet sudah dipindah ke media regenerasi. Menurut Kasele *et al.* (1995), aplikasi retardan menurunkan luas daun dan bobot kering daun, tetapi meningkatkan kerapatan stomata s7-19%.

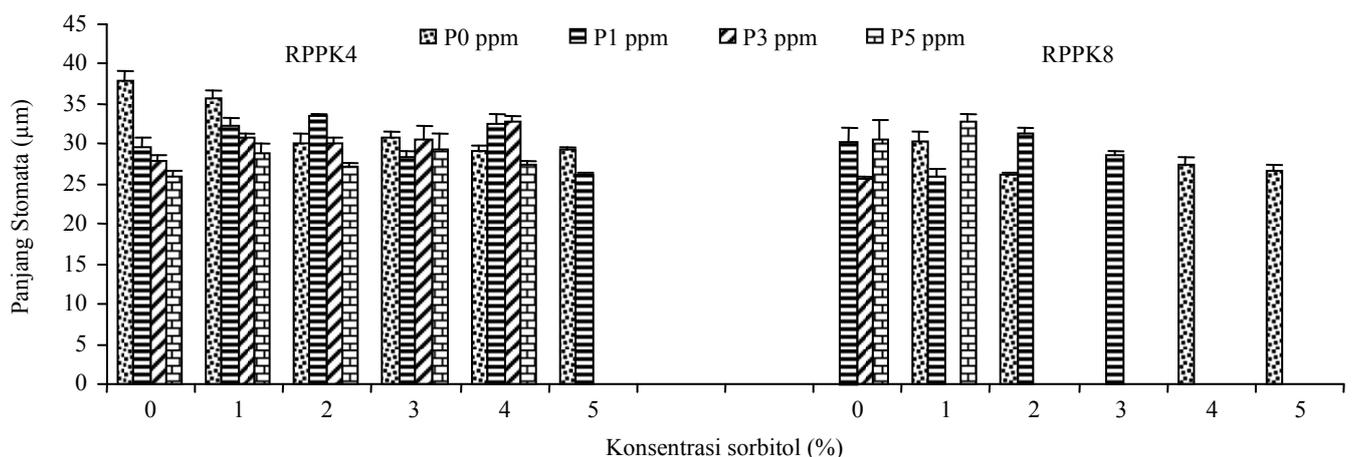
Stomata daun pada bulan ketiga RPPK8 cenderung lebih rapat dari daun RPPK4. Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama periode konservasi semakin kuat pula efek perlakuan sorbitol dan paklobutrazol, meskipun tanaman sudah disubkultur ke media regenerasi selama 3 bulan.

### Panjang Stomata

Menurut hasil analisis ragam, interaksi sorbitol dan paklobutrazol nyata menurunkan panjang stomata (PS) daun pada bulan ketiga RPPK4. Rata-rata PS daun paling tinggi dimiliki oleh kontrol (37,8  $\mu\text{m}$ ), terendah pada kombinasi perlakuan S0P5 (26  $\mu\text{m}$ ) (Gambar 3).



Gambar 2. Interaksi sorbitol dan paklobutrazol terhadap kerapatan stomata/mm<sup>2</sup> daun akhir bulan ke-3 regenerasi pasca periode konservasi 4 bulan (RPPK4) dan 8 bulan (RPPK8).



Gambar 3. Interaksi sorbitol dan paklobutrazol terhadap panjang stomata ( $\mu\text{m}$ ) daun akhir bulan ke-3 regenerasi pascakonservasi 4 bulan (RPPK4) dan 8 bulan (RPPK8).

Panjang stomata daun pada RPPK8 bervariasi, paling besar terdapat pada kombinasi perlakuan SIP5 (32,8  $\mu\text{m}$ ) dan terkecil SOP3 (25,6  $\mu\text{m}$ ). Sebagai pembanding, panjang stomata dari lapang rata-rata 29,1  $\mu\text{m}$ . Panjang stomata daun RPPK8 pada sebagian kombinasi perlakuan mengalami penurunan dibandingkan dengan daun pada RPPK4 (Gambar 3).

Penurunan panjang stomata daun RPPK4 merupakan respon terhadap interaksi sorbitol dan paklobutrazol selama periode konservasi. Semakin tinggi konsentrasi kedua faktor tersebut semakin kecil ukuran stomata. Panjang stomata pada daun kontrol *in vitro* (37,8  $\mu\text{m}$ ) lebih besar dari stomata daun yang berasal dari lapang (29,1  $\mu\text{m}$ ). Stomata terpendek terdapat pada daun yang diberi perlakuan SOP5 (26  $\mu\text{m}$ ), lebih pendek pula dibandingkan dengan stomata daun dari lapang.

Sebagaimana halnya sorbitol, peningkatan konsentrasi sukrosa sebagai regulator osmotik dalam media MS sampai 9% dapat meningkatkan kandungan gula, pati, dan jumlah stomata tetapi menurunkan potensial air dan ukuran stomata planlet *Alocasia amazonica* selama periode pertumbuhan *in vitro* (Jo *et al.*, 2009).

Menurut Ermayanti *et al.* (2004), karakter anatomi daun yang menyangkut ukuran seperti jumlah, panjang, dan lebar stomata daun bagian bawah tanaman merupakan karakter anatomi yang dapat berubah karena pengaruh lingkungan. Diharapkan perbedaan karakter kuantitatif anatomi ini dapat dihilangkan setelah kultur diaklimatisasi ke rumah kaca.

### Struktur Daun

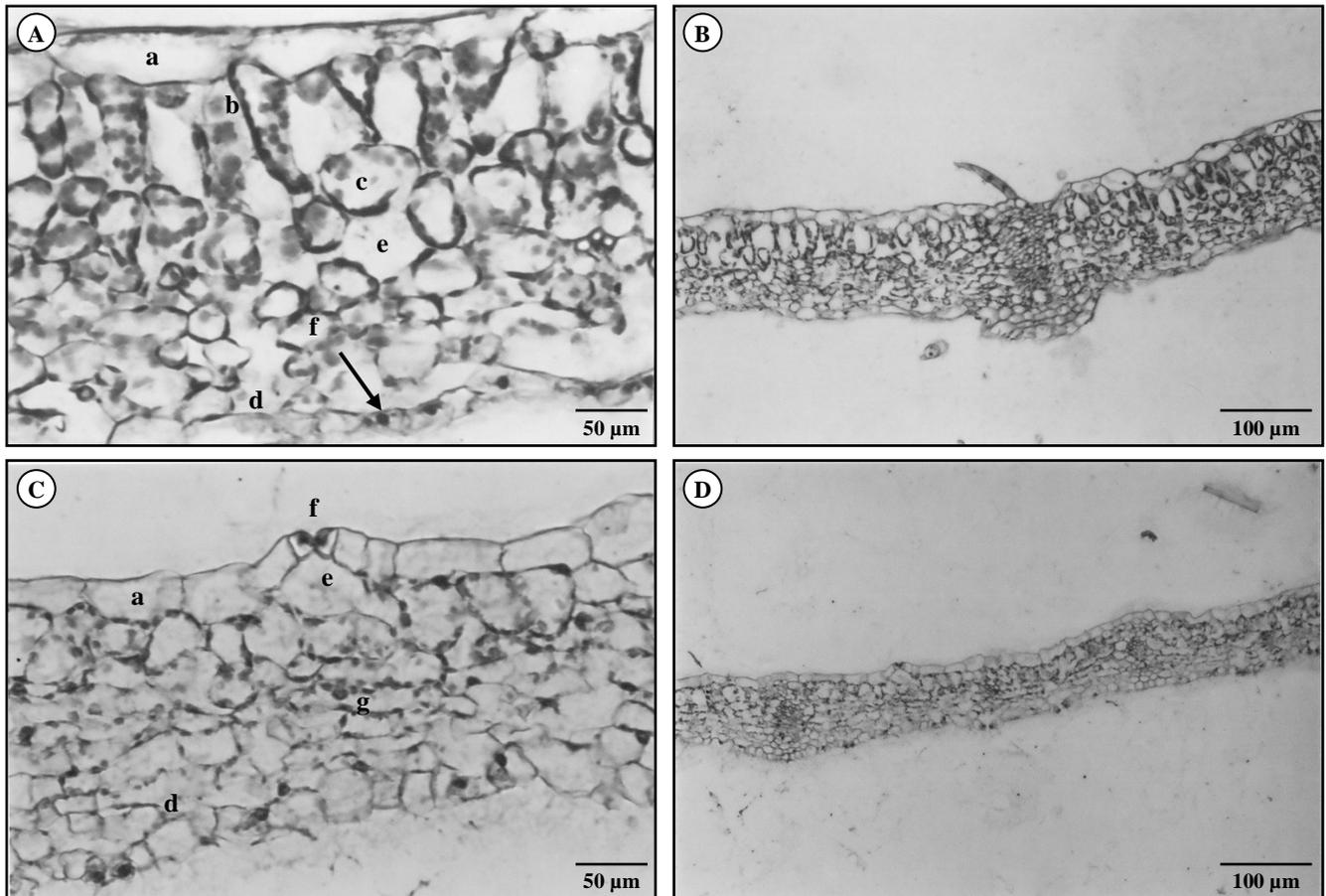
Sayatan melintang daun purwoceng dari lapang tersusun dari bagian-bagian sebagai berikut: epidermis atas, jaringan palisade, jaringan bunga karang, berkas pembuluh, dan epidermis bawah. Sel-sel epidermis atas berukuran relatif lebih besar dari yang ada di bawah. Epidermis atas dan bawah mengandung stomata (amfistomatik), kedudukan stomata lebih tinggi dari epidermis (faneropor). Jaringan palisade terdiferensiasi sempurna memanjang tegak lurus dengan epidermis, tersusun rapat dan mengandung banyak kloroplas. Jaringan bunga karang terdiri atas sel-sel yang berukuran relatif

lebih kecil membulat, susunannya tidak teratur sehingga banyak mengandung rongga udara (Gambar 4A dan B).

Struktur daun purwoceng *in vitro* memiliki sedikit perbedaan, yaitu jaringan mesofil tidak terdiferensiasi dengan sempurna, sehingga tidak dapat dibedakan antara palisade dengan bunga karang. Jaringan mesofil atas dapat dibedakan dari mesofil bawah melalui distribusi kloroplasnya. Kloroplas lebih banyak berada pada jaringan mesofil bagian atas, selain itu sel-selnya berukuran relatif lebih besar, tersusun rapat tetapi masih berbentuk membulat. Jaringan bunga karang tersusun atas sel-sel dengan ukuran lebih kecil dan tersusun rapat (Gambar 4C dan D).

Pengamatan kualitatif terhadap struktur anatomi daun memperlihatkan adanya perbedaan antara daun purwoceng dari lapang dan dari lingkungan kultur (*in vitro*). Daun dari lapang memiliki mesofil yang terdiferensiasi menjadi parenkim palisade dan parenkim spons, parenkim palisade terdapat pada bagian adaksial (ventral) disebut juga daun bifasial atau dorsiventral (Suradinata, 1998). Mesofil daun *in vitro* tidak berdiferensiasi secara sempurna menjadi parenkim palisade. Menurut Sandoval *et al.* (1994) serta Dami dan Hughes (1995), daun dari kultur *in vitro* memiliki helaian lebih sempit, tipis, dan tingkatan diferensiasi jaringan lebih rendah daripada daun dari lapang. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan kondisi lingkungan kultur dengan kondisi di lapang. Tanaman di lapang menerima secara optimal cahaya dari matahari langsung, sedangkan tanaman di lingkungan kultur terbatas pada pencahayaan dari lampu. Akibatnya, daun tanaman kultur *in vitro* tidak dapat berdiferensiasi sempurna membentuk jaringan palisade dan bunga karang. Menurut Suradinata (1998), air dan cahaya merupakan faktor yang mempengaruhi diferensiasi jaringan palisade.

Hasil pengamatan kualitatif terhadap sayatan melintang daun pada kombinasi perlakuan sorbitol dan paklobutrazol menunjukkan adanya sedikit perbedaan ketebalan, struktur jaringan mesofil, dan kandungan kloroplas. Struktur daun purwoceng yang diberi perlakuan tidak menunjukkan kerusakan namun menghasilkan sedikit perbedaan dibandingkan kontrol (Gambar 5).



Gambar 4. Sayatan melintang daun purwoceng lapang (A dan B) dan kontrol *in vitro* (C dan D). Epidermis atas (A), palisade (B), spons (C), epidermis bawah (D), rongga substomata (E), stomata (F), mesofil (G). Gambar 4A dan 4C perbesaran 400x, Gambar 4B dan 4D perbesaran 100x.

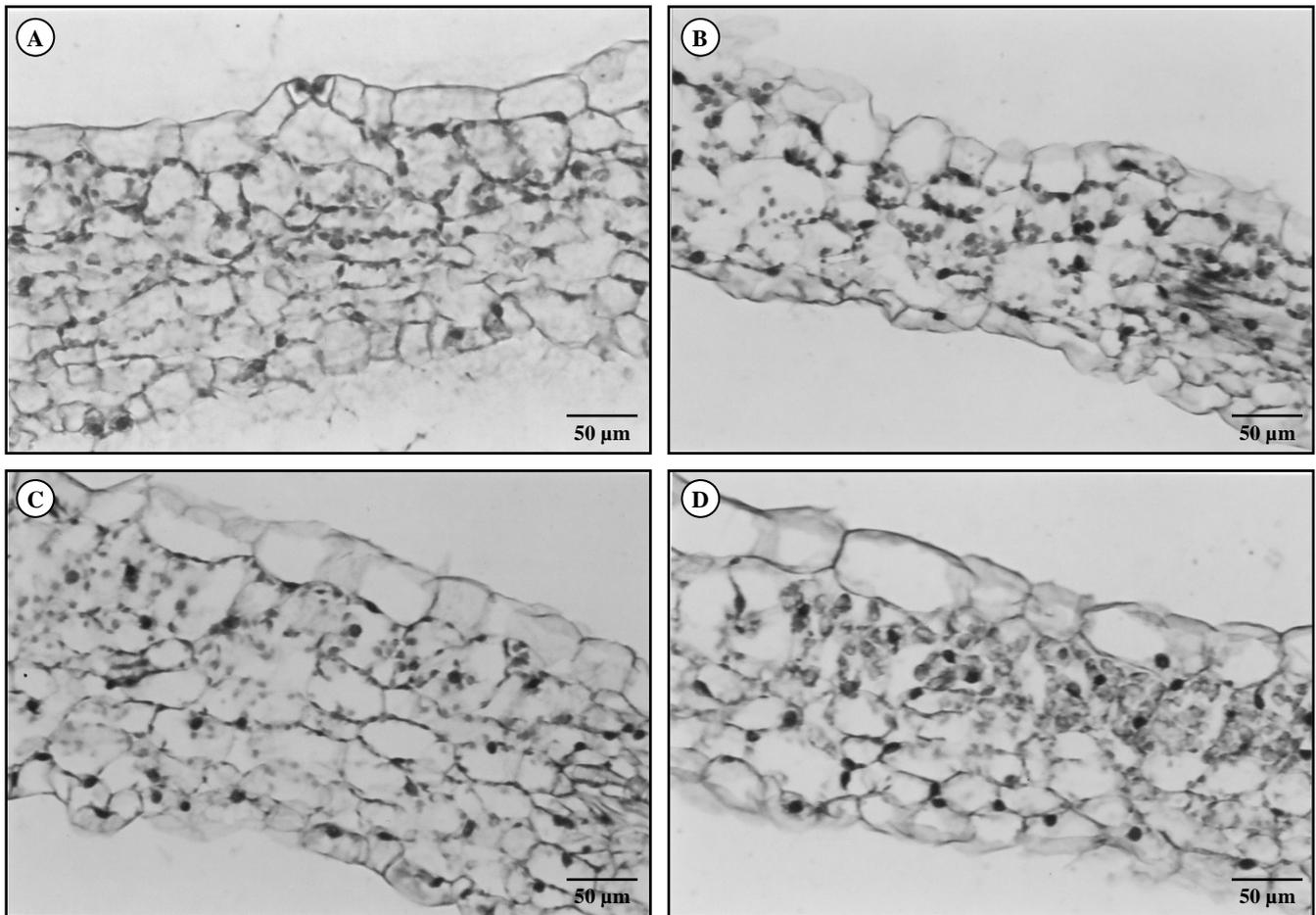
Struktur jaringan mesofil daun yang diberi perlakuan paklobutrazol konsentrasi tinggi sedikit lebih terdiferensiasi menyerupai palisade, di mana kandungan klorofil terkonsentrasi pada mesofil atas, susunan sel agak memanjang dan rapat. Bentuk dan susunan sel-sel mesofil bawah lebih membulat. Diduga cekaman yang disebabkan oleh sorbitol dan paklobutrazol berpengaruh terhadap diferensiasi parenkim palisade.

Daun yang diberi perlakuan sorbitol dan paklobutrazol konsentrasi tinggi mengandung banyak kloroplas dibanding kontrol sehingga menginduksi diferensiasi jaringan palisade. Menurut Sinha (1999), perkembangan kloroplas menginduksi diferensiasi jaringan fotosintesis pada tomat. Selain itu, cekaman osmotik pada daun planlet *in vitro* tanaman anggur menyebabkan diferensiasi palisade yang lebih nyata dan kloroplas lebih banyak di-

bandingkan dengan daun kontrol *in vitro*. Diduga zat osmotikum dapat memperbaiki anatomi daun mendekati keadaan normal seperti daun dari rumah kaca (Dami dan Hughes, 1995).

#### Tebal Epidermis dan Mesofil

Hasil analisis ragam menunjukkan interaksi sorbitol dan paklobutrazol selama penyimpanan nyata menghambat pertumbuhan epidermis atas daun RPPK4. Rata-rata epidermis atas pada semua kombinasi perlakuan lebih tipis dibandingkan dengan epidermis atas kontrol (27,6  $\mu\text{m}$ ), sedangkan epidermis atas paling kecil (14,3  $\mu\text{m}$ ) pada kombinasi perlakuan SOP1. Tebal epidermis atas daun kombinasi perlakuan lainnya berkisar antara 24,2-15,8  $\mu\text{m}$  (Tabel 1).



Gambar 5. Sayatan melintang daun regenerasi pascakonservasi 8 bulan (RPPK8). Kontrol (A), S1P0 (B), S3P1 (C), S0P3 (D) (Perbesaran 400x).

Tabel 1. Interaksi sorbitol (%) dan paklobutrazol (ppm) terhadap tebal epidermis atas ( $\mu\text{m}$ ) daun regenerasi pascakonservasi 4 bulan (RPPK4).

Perlakuan	Epidermis Atas ( $\mu\text{m}$ )			
	P0	P1	P3	P5
S0	27,6 a	14,3 f	17,3 cdef	18,1 cdef
S1	17,3 cdef	21,9 bc	19,8 bcde	16,9 def
S2	21,6 bcd	18,8 cdef	16,3 ef	15,8 ef
S3	17,5 cdef	18,8 cdef	20,8 bcde	18,2 cdef
S4	15,9 ef	20,3 bcde	24,2 ab	18,1 cdef
S5	17,8 cdef	17,9 cdef	15,9 ef	17,2 cdef

S = sorbitol dan P = paklobutrazol. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam kolom dan baris yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji DMRT.

Tebal epidermis atas daun RPPK8 bervariasi, berkisar antara 14,6-19,3  $\mu\text{m}$ . Tebal epidermis atas daun RPPK8 pada sebagian besar kombinasi perlakuan mengalami penurunan dibandingkan dengan daun RPPK4 (Tabel 2).

Interaksi sorbitol dan paklobutrazol selama periode konservasi nyata menghambat pertumbuhan tebal epidermis bawah daun RPPK4, epidermis bawah paling tebal terdapat pada perlakuan kontrol (24  $\mu\text{m}$ ), sedangkan paling tipis pada perlakuan S0P1 (11,8  $\mu\text{m}$ ). Tebal epidermis bawah daun kom-

binasi perlakuan lainnya berkisar antara 19,1-12,0  $\mu\text{m}$  (Tabel 3).

Tebal epidermis bawah daun RPPK8 bervariasi, berkisar antara 10,8-14,5  $\mu\text{m}$ . Tebal epidermis daun RPPK8 pada sebagian besar kombinasi perlakuan mengalami penurunan dibandingkan dengan daun RPPK4 (Tabel 4).

Interaksi sorbitol dengan paklobutrazol nyata mempengaruhi tebal mesofil daun RPPK4. Terdapat dua kombinasi perlakuan yang menunjukkan tebal mesofil melebihi kontrol (92,3  $\mu\text{m}$ ), yaitu S0P5

(104,4  $\mu\text{m}$ ) dan S5P5 (99,8  $\mu\text{m}$ ), tetapi secara statistik tidak berbeda nyata. Mesofil paling tipis terdapat pada kombinasi perlakuan S3P0 (49,8  $\mu\text{m}$ ). Tebal mesofil dari kombinasi perlakuan lainnya di bawah kontrol, berkisar antara 83,8-52,1  $\mu\text{m}$  (Tabel 5).

Tebal mesofil daun RPPK8 bervariasi, berkisar antara 41,8-79,7  $\mu\text{m}$ . Tebal epidermis daun RPPK8 pada sebagian besar kombinasi perlakuan mengalami penurunan dibandingkan dengan daun RPPK4 (Tabel 6).

Tabel 2. Pengaruh kombinasi sorbitol (%) dan paklobutrazol (ppm) terhadap tebal epidermis atas ( $\mu\text{m}$ ) daun regenerasi pascakonservasi 8 bulan (RPPK8).

Perlakuan	Epidermis Atas ( $\mu\text{m}$ )			
	P0	P1	P3	P5
S0	x	16,3	14,6	15,9
S1	15,4	19,3	x	17,9
S2	15	16,8	x	x
S3	x	15,4	x	x
S4	19,2	x	x	x
S5	15,9	x	x	x

S = sorbitol dan P = paklobutrazol. Tidak semua perlakuan memiliki data karena planlet mati saat penyimpanan atau regenerasi.

Tabel 3. Interaksi sorbitol (%) dan paklobutrazol (ppm) terhadap tebal epidermis bawah ( $\mu\text{m}$ ) daun regenerasi pascakonservasi 4 bulan (RPPK4).

Perlakuan	Epidermis Bawah ( $\mu\text{m}$ )			
	P0	P1	P3	P5
S0	24,0 a	11,8 e	13,3 cde	15,0 bcde
S1	13,6 cde	18,8 b	14,8 bcde	15,0 bcde
S2	16,8 bcd	15,6 bcde	12,1 e	12,0 e
S3	12,9 cde	15,4 bcde	15,8 bcde	13,7 cde
S4	12,3 de	16,9 bc	19,1 b	13,9 cde
S5	13,3 cde	12,9 cde	13,1 cde	13,4 cde

S = sorbitol dan P = paklobutrazol. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam kolom dan baris yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (DMRT).

Tabel 4. Pengaruh kombinasi sorbitol (%) dan paklobutrazol (ppm) terhadap tebal epidermis bawah ( $\mu\text{m}$ ) daun regenerasi pasca-konservasi 8 bulan (RPPK8).

Perlakuan	Epidermis Bawah ( $\mu\text{m}$ )			
	P0	P1	P3	P5
S0	x	12,7	10,8	10,8
S1	11,7	14,4	x	14,5
S2	11,1	12,1	x	x
S3	x	12,3	x	x
S4	14,1	x	x	x
S5	12,5	x	x	x

S = sorbitol dan P = paklobutrazol. Tidak semua perlakuan memiliki data karena planlet mati saat penyimpanan atau regenerasi.

Tingginya kematian regeneran pascakonservasi 8 bulan disebabkan oleh cekaman perlakuan yang terlampaui berat dan lama. Kematian planlet pada kontrol bukan pengaruh cekaman perlakuan tetapi karena kehabisan nutrisi akibat terlampaui lama disimpan. Oleh karena itu, tidak dilakukan pengambilan kesimpulan antar perlakuan. Pengambilan kesimpulan hanya dilakukan berdasarkan hasil perbandingan data dari planlet yang masih hidup antara dua periode konservasi, yaitu RPPK4 dan RPPK8.

Pada umumnya interaksi sorbitol dan paklobutrazol selama konservasi 4 dan 8 bulan nyata menghambat pertumbuhan daun saat proses regenerasi. Epidermis atas, epidermis bawah, dan mesofil cenderung lebih tipis dibandingkan dengan kontrol. Anatomi daun yang telah disimpan 8 bulan pada saat diregenerasi secara umum lebih tipis dari daun yang disimpan selama 4 bulan.

Menurut Utrillas dan Alegre (1997), cekaman air menyebabkan perubahan pada karakter anatomi

dan ultrastruktur sel, antara lain menurunkan tebal daun, ukuran sel mesofil, ukuran kloroplas, perubahan orientasi tilakoid, dan peningkatan tebal dinding sel.

Interaksi perlakuan sorbitol dan paklobutrazol selama konservasi masih berpengaruh meskipun kultur telah diregenerasi selama 3 bulan dalam media dengan penambahan giberelin ( $GA_3$ ) 3 ppm. Penambahan giberelin belum mampu mendobrak efek persisten paklobutrazol. Paklobutrazol adalah retardan pertumbuhan yang mampu menghambat sintesis giberelin, sehingga akhirnya menghambat peluasan sel-sel. Selain itu, dapat mengecilkan porus stomata, daun, dan kutikula lebih tebal, serta peningkatan jumlah dan ukuran trikoma (Chaney, 2005). Oleh karena itu, perlu dikembangkan protokol penyimpanan jangka menengah yang lebih efisien tanpa disertai penurunan daya regenerasi dan terjaminnya stabilitas karakter anatomi. Selanjutnya, disarankan penggunaan regulator osmotik yang dikombinasikan dengan pengenceran media dasar.

Tabel 5. Interaksi sorbitol (%) dan paklobutrazol (ppm) terhadap tebal mesofil ( $\mu\text{m}$ ) daun regeneran pascakonservasi 4 bulan (RPPK4).

Perlakuan	Mesofil ( $\mu\text{m}$ )			
	P0	P1	P3	P5
S0	92,3 abc	72,6 bcdef	64,6 cdef	104,4 a
S1	61,7 def	61,3 def	62,1 def	61,6 def
S2	83,8 abcd	80,0 abcde	60,8 def	52,3 ef
S3	49,8 f	79,6 abcde	81,9 abcd	67,3 cdef
S4	61,6 def	81,3 abcde	70,8 cdef	52,1 ef
S5	69,4 cdef	56,0 def	65,3 cdef	99,8 ab

S = sorbitol dan P = paklobutrazol. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam kolom dan baris tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji DMRT.

Tabel 6. Pengaruh kombinasi sorbitol (%) dan paklobutrazol (ppm) terhadap mesofil ( $\mu\text{m}$ ) daun regeneran pasca periode konservasi 8 bulan (RPPK8).

Perlakuan	Mesofil ( $\mu\text{m}$ )			
	P0	P1	P3	P5
S0	x	79,7	59,6	41,8
S1	54,2	52,3	x	56,1
S2	43,2	46,5	x	x
S3	x	66,9	x	x
S4	60,7	x	x	x
S5	47,3	x	x	x

S = sorbitol dan P = paklobutrazol. Tidak semua perlakuan memiliki data karena planlet mati saat penyimpanan atau regenerasi.

## KESIMPULAN

Berdasarkan uraian di atas maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Pengaruh perlakuan sorbitol dan paklobutrazol selama periode konservasi masih bertahan (persisten) meskipun sudah disubkultur ke media regenerasi.
2. Terdapat perbedaan karakter anatomi pada daun regeneran pasca-kedua periode konservasi.
3. Semua karakter anatomi daun regeneran pasca-konservasi 8 bulan lebih rendah dari konservasi 4 bulan, kecuali kerapatan stomata lebih tinggi.
4. Semua karakter anatomi daun yang diberi perlakuan sorbitol dan paklobutrazol lebih rendah dibandingkan dengan kontrol, kecuali kerapatan stomata lebih tinggi.
5. Diduga terdapat hubungan antara penurunan daya regenerasi dengan perbedaan sejumlah karakter kuantitatif anatomi daun regeneran.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian yang telah mendanai penelitian ini pada program Kerja Sama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T). Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Juliarni atas bimbingan dan saran yang menyangkut histo-anatomi serta semua pihak yang turut membantu penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Chaney, W.R. 2005. A Paclobutrazol Treatment Can Leave A Tree More Stress Tolerant. Golfdom. An Advanstar Publication. USA.
- Dami, I. and H. Hughes. 1995. Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated 'Valiant' grape. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 42(2):179-184.
- Fahn, A. 1990. *Plant Anatomy*. 4<sup>th</sup> Ed. Pergamon Press. New York.
- Ermayanti, T.M., Juliarni, dan Y. Andry. 2004. Struktur anatomi daun *Artemisia cina* Berg. Ex Poljakov hasil kultur jaringan. *Biota* IX(3):144-154.
- Hernani dan S. Yuliani. 1990. Obat-obat afrodisiaka yang bersumber dari bahan alam. *Prosiding Seminar Pelestarian Pemanfaatan Tumbuhan Obat dari Hutan Tropis Indonesia*. Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor.
- Jo, A.E., R.K. Tewari, E.J. Hahn, dan K.Y. Paek. 2009. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 96(3):307-315.
- Kasele, I.N., J.F. Shanahan, and D.C. Nielsen. 1995. Impact of growth retardants on corn leaf morphology and gas exchange traits. *Crop Sci.* 35:190-194.
- Megia, R., I. Darwati, I. Roostika, Juliarni, R. Ningsih, dan R. Agustarini. 2008. Konservasi *in vitro* tanaman obat langka asli Indonesia *Pimpinella pruatjan* Molck. secara pertumbuhan minimal dan kriopreservasi untuk protokol standar di bank gen. Laporan Hasil Penelitian Kerja Sama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T).
- Nakamura, T. 1995. Plant tissue observation using microscope. p. 15-22. *In* Hinata, K. and T. Hashiba (eds.) *A Manual of Experiment for Plant Biology*. Tokyo Soft Science Publications.
- Neeven, A. Hassan, and S.A. Bekheet. 2008. Mid-term storage and genetic stability of strawberry tissue culture. *J. Agr. Biol. Sci.* 4(5):505-511.
- Rahardjo, M. 2003. Purwoceng tanaman aprodisiak yang langka. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 9(2):4-7.
- Rivai, M.A., Rugayah, and E.A. Widjaja. 1992. Thirty Years of the Eroded Species Medicinal Crops. *Floribunda. Pioneer of Indonesian Taxonomy*. Bogor. 28 p.
- Roostika, I., I. Darwati, and I. Mariska. 2005. Micropropagation of purwoceng (*Pimpinella alpine* KDS) through organogenesis and somatic embryogenesis. *Seminar on Asean Science and Technology Week. August 5-7<sup>th</sup>. BPPT. Jakarta.*
- Sandoval, J.A., L.E. Müller, and F. Weberling. 1994. Foliar morphology and anatomy of *Musa cv. Grande Naine* (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. *Fruits* 49(1):37-46.
- Sarkar, D., S.K. Chakrabarti, and P.S. Naik. 2001. Slow growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage *in vitro*. *Euphytica* 117:133-142.
- Sass, J.E. 1951. *Botanical Microtechnique*. 2<sup>nd</sup> Edition. The Iowa State College Press.
- Sinha, N. 1999. Leaf development in angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:419-446.
- Suradinata, T.S. 1998. *Struktur Tumbuhan*. Angkasa. Bandung.
- Utrillas, M.J. and L. Alegre. 1997. Impact of water stress on leaf anatomy and ultrastructure in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. under natural conditions. *Int. J. Plant Sci.* 158(3):313-324.