

IV. HASIL ANALISIS DAN PEMBAHASAN

A. Keadaan Umum

Hasil subkultur tunas jati untuk tahap elongasi menunjukkan adanya pertumbuhan vegetatif eksplan yang mulai terlihat pada 1 minggu setelah tanam (MST). Seluruh perlakuan mampu menyerap nutrisi pada media agar yang digunakan. Nutrisi media merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan kultur *in vitro* pada tanaman. Faktor nutrisi media sangat penting dan menjadi perhatian utama keberhasilan kultur *in vitro* (Vasil dan Thorpe, 1998). Media MS dapat digunakan untuk elongasi tunas jati.

Nutrisi dari media dapat diserap oleh eksplan melalui proses difusi dan imbibisi. Nutrisi terdifusi melalui jaringan meristem yang terbuka karena pelukaan. Distribusi nutrisi yang terserap eksplan dilakukan oleh jaringan pembuluh tanaman dan digunakan oleh eksplan untuk proses metabolisme. Eksplan tanaman melakukan metabolisme secara heterotrof atau menggunakan nutrisi yang tersedia pada media untuk pertumbuhannya. Proses fotosintesis sangat kecil terjadi karena adanya kandungan gula sederhana dengan konsentrasi tinggi dan rendahnya ketersediaan CO₂ pada botol perlakuan (Neumann dkk, 2009).

Proses elongasi terjadi karena peran hormon yang memacu sel menuju ke keadaan tertentu. Giberelin mempunyai peran dalam perluasan sel melalui perkembangan sel yang berkaitan dengan turgiditas sel yaitu kemampuan sel untuk mencapai ukuran sel maksimal. Tekanan turgor sangat erat kaitannya dengan elongasi sel pada eksplan (Rose, 2016). Pemberian Giberelin berfungsi untuk pemanjangan sel yang berpengaruh dalam ukuran sel sehingga morfologi batang

yang terbentuk menjadi lebih panjang. Pertumbuhan panjang dan terbentuknya ruas batang pada eksplan jati menjadi indikator penting dalam proses elongasi eksplan tunas jati. Elongasi atau pemanjangan batang dilakukan untuk mendapatkan eksplan dengan tinggi yang sesuai untuk aklimatisasi (Adinugraha dan Mahfudz, 2014).

Kondisi eksplan dalam menerima nutrisi yang disediakan dapat diketahui dari parameter persentase eksplan hidup, kontaminasi dan *browning*. Hasil pengamatan persentase eksplan hidup, kontaminasi, dan *browning* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Penggunaan GA₄ pada Elongasi Klon Unggul Tunas Jati (*Tectona grandis*) pada 6 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perlakuan	Persentase Eksplan(%)		
	Kontaminasi	Eksplan Hidup	Browning
0 mg/l GA ₄	0	100	0
0,1 mg/l GA ₄	10	80	10
0,3 mg/l GA ₄	40	60	0
0,5 mg/l GA ₄	20	80	0
Rata-rata	17,5	80	2,5

Hormon menstimulasi reseptor dan bekerja melalui jalur transduksi sinyal. Hormon mengikat reseptor dari luar membran sel sehingga membentuk ikatan hormon-reseptor. Senyawa kompleks hormon-reseptor ini mengaktifkan membran-terikat protein guanin nukleotida (G-protein) sebagai *transducer* menjadi *effector* yaitu protein membran-terikat ketiga. *Effector* mengikat enzim adenilat siklase yaitu enzim yang menstimulasi siklus adenosine monopospat (cAMP). Senyawa ini mengaktifkan enzim protein kinase yang memecah fosfat dan sel merespon sesuai dengan reseptor yang distimulasi oleh hormon. Tipe sel yang berbeda memberikan respon yang berbeda meskipun hormon yang bekerja merupakan hormon yang sama. Reseptor yang menerima hormon dalam satu sel bisa lebih dari satu jenis

sehingga respon yang diberikan berbeda-beda (McDonald, 2003). Inaktivasi Giberelin dapat menyebabkan penurunan pertumbuhan tanaman (Rose, 2016).

B. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup merupakan jumlah eksplan hidup tiap perlakuan yang dinyatakan dalam satuan persen. Media yang sesuai akan memberikan nutrisi yang dibutuhkan eksplan sehingga eksplan dapat melakukan proses metabolisme. Keadaan lain yang menyatakan bahwa eksplan hidup adalah tidak ada kontaminasi dan *browning* yang terjadi. Kontaminasi yang terjadi dapat menyebabkan eksplan tidak mampu menyerap nutrisi karena koloni jamur atau bakteri, sehingga eksplan tidak dapat tumbuh pada media yang tersedia. Keadaan eksplan *browning* merupakan kondisi bahwa sel-sel atau jaringan berwarna coklat pada eksplan telah mati karena tidak dapat menyerap nutrisi. Rata-rata persentase hidup eksplan diamati untuk mengetahui daya hidup eksplan pada media perlakuan yang digunakan tersaji pada Tabel 2.

Perlakuan 0 mg/l GA₄ berdasarkan gambar menghasilkan persentase eksplan hidup 100%, sedangkan perlakuan 0,1 mg/l GA₄; 0,5 mg/l GA₄ sebesar 80% dan perlakuan 0,3 mg/l GA₄ menghasilkan persentase eksplan hidup 60%. Persentase 100% pada perlakuan 0 mg/l GA₄ menandakan bahwa seluruh eksplan yang ditanam dapat hidup pada media perlakuan tanpa terjadi kontaminasi maupun *browning*. Hasil berbeda terdapat pada perlakuan 0,1 mg/l GA₄, 0,5 mg/l GA₄ dan perlakuan 0,3 mg/l GA₄ yang tidak mencapai 100% persentase eksplan hidup. Terdapat eksplan yang tidak hidup dikarenakan adanya kontaminasi dan *browning*. Kontaminasi terjadi karena pada proses inokulasi terdapat bakteri atau jamur yang

masuk ke dalam botol melalui eksplan yang dipindahkan (*subkultur*) atau *dissecting kits* yang digunakan. Kontaminasi dapat disebabkan karena proses sterilisasi yang dilakukan tidak sepenuhnya membunuh mikroorganisme pada lingkungan inokulasi, sehingga mikroorganisme dapat masuk ke dalam botol kultur dan menyebabkan kontaminasi (Fogh,1973). Eksplan terkontaminasi dapat diaklimatisasi jika eksplan telah mencapai tinggi yang sesuai untuk aklimatisasi. Persentase eksplan hidup terbaik diperoleh pada perlakuan GA₄ 0 mg/l karena eksplan hidup mencapai 100%.

C. Persentase Eksplan Terkontaminasi

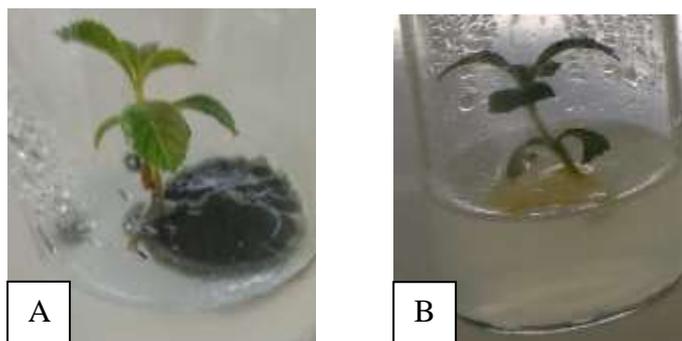
Keberadaan mikroorganisme yang tumbuh pada botol kultur dapat menyebabkan pertumbuhan eksplan terhambat. Keadaan tumbuhnya mikroorganisme pada kultur *in vitro* adalah kontaminasi. Mikroorganisme yang menyebabkan kontaminasi disebut kontaminan dan dapat berupa jamur atau bakteri. Keberadaan mikroorganisme tidak dikehendaki karena dapat merusak eksplan dengan cara meracuni eksplan melalui fitotoksin yang dihasilkan, mengikis jaringan eksplan (nekrosis), menurunkan proliferasi batang dan pengakaran (Bhojwani dan Dantu, 2013). Persentase eksplan terkontaminasi diamati untuk mengukur jumlah eksplan yang berpotensi tidak dapat tumbuh pada botol kultur akibat kontaminasi. Terdapat dua prinsip utama yang dapat mencegah terjadinya kontaminasi yaitu penggunaan prosedur yang sesuai standar dan kedua adalah selalu menjaga kegiatan pemindahan eksplan tetap dalam prosedur (Fogh, 1973). Rata-rata kontaminasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Rata-rata kontaminasi pada inokulasi eksplan jati adalah 17,5%. Terdapat beberapa faktor yang menyebabkan adanya kontaminasi. Salah satu faktor kontaminasi adalah botol kultur yang terbuka karena dapat menyebabkan kontaminasi melalui udara baik melalui kontak eksplan dengan penutup botol, lingkungan di luar botol dan teknik yang kurang baik saat pemindahan (Fogh, 1973). Kontaminasi pada perlakuan dapat terjadi karena kontaminan jamur dan bakteri masih ada yang bertahan di lingkungan inokulasi meskipun sterilisasi alat dengan menggunakan *mini sterilizer* (metode panas kering) pada suhu 200°C selama 5 menit sudah dilakukan, maupun sterilisasi ruang inokulasi telah dilakukan.

Kontaminasi pada perlakuan terjadi diduga karena prosedur yang diterapkan tidak ada proses sterilisasi untuk pemindahan eksplan. Kontaminasi mikroorganisme terjadi ketika pemindahan eksplan. Proses subkultur merupakan sumber utama kontaminasi sekitar 5-15% kontaminasi. Penyebab utama kontaminasi mikroba adalah kurang sterilnya eksplan, media pertumbuhan, peralatan dan tangan operator (Bonga dan Aderkas, 1992). Eksplan hasil pemindahan adalah eksplan steril dan berada pada kondisi steril, sehingga kontaminasi yang paling memungkinkan terjadi adalah ketika kontak dengan alat pemindahan, melalui udara di dalam LAF dan kontak yang terjadi dengan operator (Fogh, 1973). Kontaminasi alat dapat terjadi melalui udara di lingkungan LAF yang terkontaminasi melalui udara. Kontaminasi melalui udara dapat dicegah selama menjaga prosedur kerja, namun kontaminasi dapat terjadi kapanpun selama botol kultur terbuka saat eksplan dipindahkan. Prosedur pemindahan eksplan yaitu membuka botol kultur eksplan dan botol kultur media baru kemudian eksplan

dipindahkan tanpa adanya sterilisasi eksplan. Kontaminasi dapat terjadi karena eksplan yang dipindahkan mengandung kontaminan dan tidak disterilisasi kembali pada saat pemindahan ke media baru. Kontaminan jamur dan bakteri dapat berasosiasi dengan eksplan sehingga eksplan terkontaminasi pada saat inkubasi media baru. Kontaminasi sangat memungkinkan terjadi karena bakteri hanya berukuran 4-28 μm yang dapat diterbangkan dengan kecepatan 30 cm/menit oleh udara (Fogh, 1973).

Sumber kontaminasi yang dapat menyebabkan kontaminasi pada kultur dapat berubah seiring dengan proses inkubasi. Bakteri dapat menyebabkan kontaminasi pada awal pertumbuhan eksplan ketika bakteri dapat berasosiasi dengan eksplan maupun media karena proses sterilisasi yang tidak sempurna. Kontaminasi di tahap akhir inkubasi dapat terjadi karena dua faktor yaitu pertumbuhan bakteri yang sangat lambat dan manusia sebagai sumber kontaminasi. Bakteri dapat menghasilkan spora akibat kondisi lingkungan yang sangat ekstrim atau keadaan lingkungan tidak memungkinkan untuk bakteri bertahan hidup. Bakteri yang dorman dapat hidup kembali pada kondisi lingkungan yang sudah memungkinkan. Ada kemungkinan terdapat spora bakteri yang masih bertahan hidup meskipun telah disterilisasi. Kontaminasi bakteri yang menempel pada eksplan atau media dapat terjadi, namun bakteri yang masuk karena berasosiasi dengan manusia dapat terjadi seiring berjalannya waktu (Bhojwani dan Dantu, 2013).



Gambar 2. Eksplan tunas jati yang mengalami kontaminasi jamur (a) dan kontaminasi bakteri (b)

Kontaminasi yang terjadi pada kultur jati adalah kontaminasi jamur dan bakteri. Kontaminasi jamur mempunyai ciri-ciri terdapat hifa atau benang-benang yang terbentuk pada koloni (Gambar 2.a). Kebanyakan jamur merupakan multiseluler, membentuk jaringan filamen disebut hifa. Hifa merupakan pipa dinding sel yang mengelilingi membran sitoplasma. Masing-masing filamen hifa tumbuh dari perpanjangan terminal sel (Madigan dkk, 2011). Penyebaran dimulai dari koloni yang tumbuh pada media. Nutrisi yang terdapat pada media digunakan oleh jamur untuk berkembang biak hingga koloni menyebar ke eksplan jati. Gambar 2.b menunjukkan eksplan yang terkontaminasi karena bakteri. Koloni tampak berlendir menunjukkan bahwa kontaminasi diakibatkan oleh bakteri. Bakteri merupakan makhluk uniseluler dan tidak membentuk hifa. Bakteri beregenerasi dan membentuk koloni yang berasal dari satu sel bakteri. Koloni yang terbentuk tampak seperti lendir akibat dari proses metabolisme bakteri (Madigan dkk, 2011).

D. Persentase *Browning*

Pencoklatan atau *browning* merupakan akumulasi senyawa fenolik teroksidasi yang dihasilkan eksplan akibat adanya pelukaan atau stres mekanik yang

dialami eksplan. Enzim yang bertanggungjawab pada proses pencoklatan adalah enzim polifenol oksidase dan tirosinase. Reaksi pencoklatan merupakan indikasi adanya kemunduran fisiologis eksplan dan menunjukkan tanda-tanda eksplan tidak mampu bertahan hidup. Senyawa yang teroksidasi tersebut sangat beracun untuk eksplan karena membentuk ikatan kovalen dengan protein yang dapat menghambat kinerja enzim lainnya (Antony dkk, 2015). Persentase *browning* diamati untuk mengetahui daya hidup eksplan pada media yang digunakan. *Browning* yang terjadi pada eksplan diidentifikasi untuk mengetahui penyebab eksplan mengalami kemunduran fisiologis. Persentase *browning* tersaji pada gambar 5.

Hasil penelitian pada persentase eksplan *browning* menunjukkan perlakuan yang mengalami *browning* adalah perlakuan 0,1 mg/l GA₄ sebesar 10%. Perlakuan lain tidak mengalami *browning* karena eksplan yang digunakan adalah jaringan muda hasil rejuvenasi. Tanaman jati merupakan tanaman tahunan berkayu sehingga eksplan yang digunakan harus eksplan hasil rejuvenasi (Smith, 2013). Eksplan rejuvenasi digunakan karena tanaman tahunan memiliki fisiologi yang lebih kompleks dibandingkan dengan tanaman semusim. Hambatan dari banyak faktor akan muncul jika eksplan yang digunakan bukan dari hasil rejuvenasi. Eksplan rejuvenasi digunakan agar proses pertumbuhan eksplan cepat karena jaringan eksplan merupakan jaringan muda yang mudah tumbuh (Smith, 2013). Eksplan tanaman tahunan memiliki peluang menghasilkan senyawa fenolik lebih tinggi dibanding dengan eksplan tanaman semusim. *Browning* yang terjadi karena adanya senyawa fenol akibat stress mekanik saat inokulasi atau pelukaan pada eksplan. Jaringan yang mati menghasilkan reaksi pencoklatan sebagai mekanisme mempertahankan

jaringan dari stress abiotik (Pierik, 1987). Eksplan *browning* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Eksplan Tunas Jati yang Mengalami *Browning*

Pangkal batang eksplan mengalami pencoklatan akibat tidak mampu beradaptasi dengan media baru. Eksplan yang sudah mengalami *browning* tidak mampu menyerap nutrisi secara optimal sehingga pertumbuhan eksplan terhambat bahkan terhenti. Perubahan warna menjadi coklat (pencoklatan) dalam kultur jaringan terjadi karena akumulasi polifenol oksidase yang dilepas atau disintesis jaringan dalam kondisi teroksidasi ketika sel dilukai (Hutami, 2008).

E. Jumlah Tunas

Proses diferensiasi sel pada eksplan dapat terjadi karena adanya ZPT yang berperan selama proses inkubasi berlangsung. Neumann dkk.. (2009) menyatakan bahwa konsentrasi ZPT eksogen merupakan faktor penting terhadap pertumbuhan eksplan. Kinetin 0,1 mg/l pada eksplan *Datura* dapat menstimulasi pembelahan sel secara kuat. Giberelin mempunyai pengaruh terhadap pemanjangan sel. Takahashi dkk. (1991) menyatakan bahwa Giberelin mempunyai peran dalam pemanjangan batang dan perkembangan daun pada tanaman tahunan. Penambahan jumlah tunas dapat distimulasi oleh Sitokinin eksogen karena dapat menstimulasi diferensiasi sel.

Jumlah tunas diamati karena adanya Sitokinin yang ditambahkan pada media. Hasil analisis jumlah tunas dilakukan dengan metode ANOVA (*analysis of varians*) dan hasil DMRT tersaji pada tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh Konsentrasi GA₄ terhadap Pertumbuhan Jumlah Tunas Eksplan Jati pada 3 dan 6 Minggu Setelah Tanam (MST)

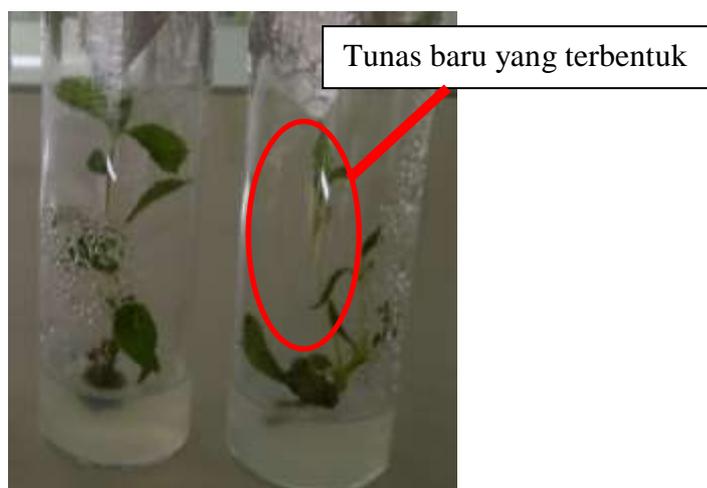
Perlakuan	Jumlah Tunas	
	3 MST	6 MST
0 mg/l GA ₄	0,70a	0,90a
0,1 mg/l GA ₄	0,30a	0,60a
0,3 mg/l GA ₄	0,50a	0,60a
0,5 mg/l GA ₄	0,10a	0,10a

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata menurut UJGD pada taraf α 5 %

Hasil analisis jumlah tunas pada 3 MST menunjukkan tidak ada beda nyata antar perlakuan. Perlakuan 0 mg/l GA₄ mempunyai pertumbuhan tunas 0,7 tunas per perlakuan. Jumlah tunas pada perlakuan 0,3 mg/l memiliki nilai 0,5 tunas per perlakuan, perlakuan 0,1 mg/l memiliki jumlah tunas 0,3 tunas per perlakuan dan pada perlakuan 0,5 mg/l hanya 0,1 tunas per perlakuan. Hasil analisis menunjukkan tidak ada pengaruh pemberian GA₄ untuk jumlah tunas eksplan pada 3 MST.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa keberadaan ZPT eksogen tidak mempengaruhi pembentukan tunas baru pada eksplan. Penambahan Giberelin tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap penambahan jumlah tunas. Fungsi Giberelin pada eksplan untuk menstimulasi elongasi sel, sehingga eksplan tidak membentuk tunas baru pada eksplan. Senyawa Giberelin lain seperti GA₃ bahkan menghambat inisiasi tunas seiring berkurangnya sintesis pati pada tembakau (Soh dan Bhojwani, 1999). Morfogenesis pada eksplan *Digitalis obscura* yang didorong

menggunakan Auksin atau Sitokinin dengan tambahan Giberelin menjadi terhambat, namun perlakuan tersebut dapat mendorong perkembangan embrio (Gavidia dkk., 1993; Soh dan Bhojwani, 1999). Efektor Giberelin lebih banyak ditemukan pada jaringan bunga dan embrio untuk mempercepat pembentukan bunga atau perkecambahan. Giberelin tidak berpengaruh pada pembentukan tunas karena Giberelin tidak berperan dalam diferensiasi sel dan keberadaan hormon lain juga dapat mempengaruhi respon jaringan. Sitokinin dapat memacu pembentukan tunas pada konsentrasi tinggi, namun konsentrasi rendah dapat memacu elongasi sel secara tidak langsung (Rose, 2016). Peran masing-masing ZPT terhadap jumlah tunas tidak tampak karena konsentrasi Sitokinin yang rendah dan Giberelin secara spesifik tidak memiliki fungsi dalam pembentukan tunas, bahkan dapat menghambat pembentukan tunas. Tunas baru yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 4.



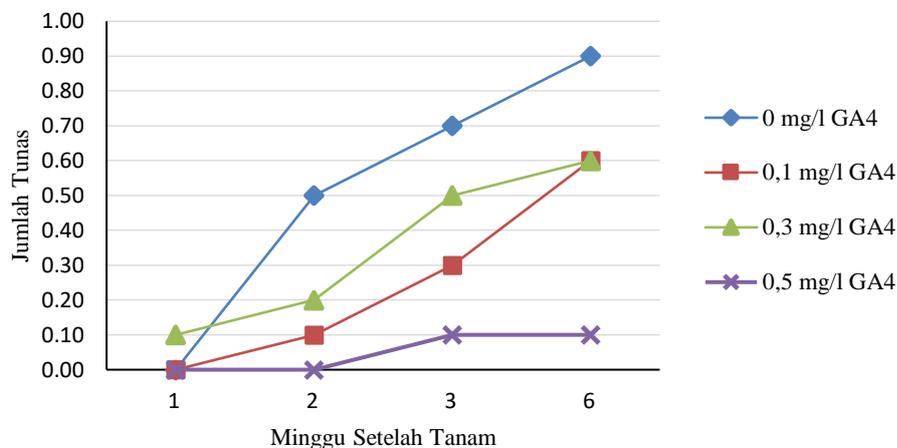
Gambar 4. Pertumbuhan Tunas Baru Eksplan Jati pada 6 MST

ZPT yang diberikan pada media efektif karena tujuan awal pemberian ZPT adalah untuk elongasi tunas. Hasil yang didapatkan tidak ada pengaruh signifikan terhadap penambahan tunas pada 3 MST. Konsentrasi Sitokinin yang digunakan

untuk elongasi tergolong efektif berdasarkan jumlah tunas yang terbentuk karena tingkat pertambahan jumlah tunas rendah dan tidak ada beda nyata antar perlakuan. Konsentrasi Sitokinin rendah menghasilkan tunas lebih panjang, sebaliknya jumlah tunas berkurang. Penelitian Gyves dkk (2007) yang menggunakan media MS termodifikasi yaitu mengurangi 50% kandungan NH_4NO_3 dan penambahan 1,5 mg/l BAP; 0,01 mg/l IAA; 0,1 mg/l asam giberelat menghasilkan 4 buku eksplan jati.

Data pada Tabel 3 juga menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan GA_4 pada jumlah tunas 6 MST tidak berbeda nyata. Jumlah tunas cenderung lebih tinggi pada perlakuan 0 mg/l GA_4 , sedangkan jumlah tunas rata-rata yang sama terdapat pada perlakuan 0,1 mg/l GA_4 dan perlakuan 0,3 mg/l GA_4 sebesar 0,6 tunas per perlakuan. Jumlah tunas pada perlakuan 0,5 mg/l GA_4 cenderung lebih rendah. ZPT eksogen yang ditambahkan tidak mempengaruhi penambahan tunas eksplan jati. Hasil analisis parameter jumlah tunas pada 3 MST dan 6 MST menyatakan kesimpulan tidak ada beda nyata. Lama proses inkubasi tidak menimbulkan efek pada perbandingan jumlah tunas antar perlakuan. Faktor yang mempengaruhi adalah kurangnya konsentrasi Sitokinin yang ada pada media. Konsentrasi Sitokinin yang tinggi dapat memicu inisiasi tunas, namun Sitokinin dengan kadar rendah tidak memicu inisiasi tunas eksplan jati. Sitokinin yang digunakan hanya mengandung 0,05 mg/l BAP dan 0,15 Kinetin. Penelitian inisiasi tunas embrio *Picea abies* menunjukkan bahwa inkubasi konsentrasi BA 250 μM (26,79 mg/l) selama 2 jam dengan tekanan (*pulse*) pada pH 5,5 lebih efektif untuk memperbanyak tunas dibandingkan BA 5 μM (2,68 mg/l) selama 4 minggu (Bonga dan Aderkas, 1992).

Penambahan konsentrasi GA₄ dari seluruh perlakuan tidak memberikan pengaruh pada pembentukan tunas baru.



Gambar 5. Pengaruh Konsentrasi GA₄ terhadap Jumlah Tunas Eksplan Jati pada 1, 2, 3 dan 6 MST

Peningkatan jumlah tunas terjadi pada semua perlakuan. Perlakuan 0mg/l GA₄ memiliki peningkatan jumlah tunas tertinggi pada akhir pengamatan sebesar 0,9 tunas per perlakuan. Laju pertumbuhan tunas pada perlakuan 0 mg/l merupakan laju tertinggi dibanding perlakuan lain. Perlakuan 0,1 mg/l meningkat dari 3 MST ke 6 MST dari 0,3 menjadi 0,6 tunas per perlakuan, sedangkan perlakuan 0,3 mg/l meningkat hanya dari 0,5 menjadi 0,6 tunas per perlakuan. Laju paling lambat pada perlakuan 0,5 mg/l karena tunas baru mulai terbentuk pada 2 MST dan tidak ada pertumbuhan tunas hingga 6 MST. Giberelin tidak berpengaruh pada pembentukan tunas karena reseptor GA banyak terdapat pada internoda batang, sehingga tidak memacu pembentukan tunas yang terbentuk di nodal atau pembentukan tunas yang ada pada eksplan. Sitokinin lebih berperan dalam pembentukan tunas karena mempunyai fungsi dalam pembelahan sel, pembentukan meristem apikal pada batang dan akar, serta pembentukan cabang (Soh dan Bhojwani, 1999). Sitokinin

pada perlakuan elongasi eksplan jati mempunyai konsentrasi rendah, sehingga peran sitokinin yang spesifik dalam pembentukan tunas melalui diferensiasi sel tidak ditemukan.

F. Tinggi Tunas

Individu tanaman mengalami pertumbuhan batang secara fisiologi akibat adanya penambahan jumlah sel pada jaringan dan peningkatan volume sel (sel membesar dan memanjang). Eksplan pada kultur *in vitro* mengalami pertumbuhan yang sama dan dapat distimulasi oleh hormon dengan konsentrasi yang sesuai. Pertumbuhan batang pada eksplan tunas dapat distimulasi dengan Sitokinin yang berperan untuk memacu pembelahan sel. Giberelin dalam beberapa penelitian tanaman tahunan dapat memacu pertumbuhan batang karena berperan dalam memacu elongasi sel (Takahashi dkk., 1991; Hedden dan Thomas, 2016). Giberelin dapat menurunkan potensial osmosis sel, sehingga dapat meningkatkan penyerapan air yang mana dapat mempengaruhi sifat hidrolis sel (Takahashi dkk., 1991). Hasil analisis pengaruh perlakuan terhadap tinggi tunas dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh Konsentrasi GA₄ terhadap Tinggi Tunas Eksplan Jati pada 3 dan 6 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perlakuan	Tinggi Tunas	
	3 MST	6 MST
0 mg/l GA ₄	1,41a	3,35a
0,1 mg/l GA ₄	0,57b	0,81c
0,3 mg/l GA ₄	1,42a	2,94ab
0,5 mg/l GA ₄	0,48b	1,29bc

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata menurut UJGD pada taraf α 5 %

Hasil analisis pada 3 MST menunjukkan ada beda nyata antar perlakuan dengan perlakuan 0,3 mg/l GA memiliki nilai tertinggi. Hasil tersebut tidak berbeda nyata dengan perlakuan 0 mg/l. Perlakuan 0,5 mg/l merupakan perlakuan dengan tinggi tunas terendah yang berbeda nyata dengan perlakuan 0 mg/l dan 0,3 mg/l. Perlakuan 0,1 mg/l berbeda nyata dengan perlakuan 0 mg/l dan 0,3 mg/l. Perlakuan penambahan konsentrasi GA₄ memberikan pengaruh pada tinggi tunas eksplan jati pada 3 MST. Perbedaan pengaruh konsentrasi GA₄ karena aktivitas GA₄ pada sel dapat direspon melalui reseptor GA yang dapat mengaktifkan peran GA₄ untuk elongasi sel, namun pada saat yang sama GA₄ diinaktivasi melalui beberapa mekanisme yaitu peran enzim GA-oksidasase dan enzim yang mengubah rantai ganda C-16, 17 menjadi rantai siklik *epoxide* (Hedden dan Thomas, 2016).

Adanya beda nyata antar perlakuan karena keberadaan GA₄ pada media terhadap tinggi tunas eksplan jati. Perlakuan 0 mg/l atau tanpa GA₄ memiliki tinggi tunas terbaik karena eksplan sudah beradaptasi dengan media yang digunakan sehingga pertumbuhan tunas tidak terhambat. Media awal sebelum proses subkultur sama dengan media baru yang digunakan tanpa penambahan GA₄. Media awal yang digunakan adalah MS + Kinetin 0,15 mg/l + BAP 0,05 mg/l. Media subkultur yang digunakan mengandung nutrisi dan ZPT yang sama dengan penambahan perlakuan GA₄. Penambahan konsentrasi 0,3 mg/l GA₄ mempunyai pengaruh sama karena mempunyai keseimbangan ZPT antara Sitokinin dengan Giberelin dalam elongasi sel dan pembelahan sel. Perlakuan 0,1 mg/l mempunyai pengaruh yang lebih rendah karena keberadaan Giberelin menghambat peran Sitokinin. Konsentrasi 0,1 mg/l terlalu rendah untuk menstimulasi pemanjangan sel diiringi dengan kecepatan

pembelahan sel. Konsentrasi 0,5 mg/l menyebabkan tinggi tunas rendah karena konsentrasi GA₄ yang digunakan terlalu tinggi, sehingga eksplan melakukan mekanisme penghambatan aktivitas GA₄ dengan menghasilkan GA-oksidadase dibandingkan merespon elongasi sel. Laju pembelahan sel menjadi lambat karena aktivitas atau keberadaan Giberelin lebih dominan dibandingkan dengan Auksin dan Sitokinin dalam pertumbuhan eksplan. Giberelin mampu memacu pertumbuhan dibandingkan auksin atau Kinetin, namun pada saat yang sama Giberelin tidak memberikan pengaruh apapun pada jaringan yang diinduksi Auksin dan Kinetin (Davies, 2004). Mekanisme sel lebih banyak merespon pada penghambatan aktivitas Giberelin karena konsentrasi Giberelin yang tinggi. GA-oksidadase lebih banyak diproduksi untuk mencapai level homeostatis konsentrasi Giberelin pada sel.

Data pada tabel 4 menunjukkan bahwa pada 6 MST terdapat beda nyata antar perlakuan. Perlakuan 0 mg/l GA₄ mempunyai nilai tertinggi namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan 0,3 mg/l. Perlakuan 0,1 mg/l merupakan perlakuan dengan tinggi tunas terendah dan berbeda nyata dengan perlakuan 0 mg/l dan 0,3 mg/l. Perlakuan 0,5 mg/l memiliki beda nyata dengan perlakuan 0 mg/l. Perlakuan 0,3 mg/l tidak berbeda nyata dengan perlakuan 0,5 mg/l. Perlakuan penambahan konsentrasi GA₄ memberikan pengaruh pada tinggi tunas eksplan jati. Giberelin tidak mempercepat proses elongasi karena adanya hubungan kompleks antar ZPT yang ada pada jaringan, sehingga Giberelin tidak menunjukkan adanya pengaruh pemberian Giberelin meskipun konsentrasi perlakuan dinaikkan. ZPT dapat bertindak sebagai faktor yang menyebabkan proses morfogenesis atau organogenesis, namun pada saat yang sama hanya bertindak untuk menjaga

metabolisme pada organ tanaman yang sudah terbentuk. Cara kerja satu hormon sulit untuk diketahui secara spesifik karena tiga alasan. Alasan pertama adalah peran hormon yang tumpang tindih. Alasan kedua yaitu adanya interaksi satu ZPT dengan lainnya agar dapat bekerja. Alasan ketiga adalah aktivitas ZPT yang bergantung pada tipe sel yang spesifik, konsentrasi ZPT dan intensitas sinyal aktivasi hormon (Rose, 2016). Hasil yang didapat adalah adanya penambahan Giberelin tidak memberikan pengaruh pada elongasi eksplan, bahkan pada konsentrasi tertentu dapat menghambat laju pertumbuhan eksplan.

Hasil analisis tinggi tunas pada 6 MST didapatkan bahwa perlakuan tanpa GA₄ dan penambahan 0,3 mg/l GA₄ memberikan hasil terbaik untuk tinggi tunas. Terdapat kondisi yang tidak seimbang pada pertumbuhan tinggi tunas karena penambahan 0,3 mg/l GA₄ dan kontrol atau tanpa GA₄ memiliki pengaruh sama, sedangkan 0,1 mg/l GA₄ dan 0,5 mg/l GA₄ memiliki pengaruh negatif terhadap tinggi tunas. Kondisi ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. GA₄ yang ada pada media sebagai ZPT tidak memberikan dampak apapun atau bahkan menghambat elongasi eksplan. Diferensiasi sel eksplan selalu berjalan, sehingga tipe sel yang terbentuk berubah. Ada kemungkinan bahwa reseptor Giberelin pada eksplan berkurang seiring perkembangan sel pada eksplan. Reseptor Giberelin lebih banyak terdapat pada ruas batang pada fase juvenil, sehingga peran Giberelin pada eksplan berkurang pada proses inkubasi lebih lama. Soh dan Bhojwani (1999) mengungkapkan bahwa ZPT akan berkurang pengaruhnya tergantung pada lama inkubasi. ZPT eksogen akan menurun efektivitasnya untuk inkubasi yang lebih lama dan akan lebih efektif jika eksplan dipindah pada media baru dengan ZPT lain atau

tanpa ZPT sebelumnya. Hal ini terbukti pada penambahan 0,3 mg/l GA₄ yang tidak memiliki perbedaan pengaruh dibandingkan perlakuan 0 mg/l. Penambahan 0,3 mg/l tidak efektif untuk pemanjangan batang pada inkubasi selama 6 MST.

Perlakuan 0,1 mg/l memiliki pengaruh negatif terhadap tinggi tunas karena keberadaan GA₄ eksogen pada level rendah dapat menghambat pemanjangan batang eksplan tunas jati. Penghambatan Giberelin terhadap pemanjangan batang pada tanaman pohon pernah diteliti. Konsentrasi GA₃ rendah menghambat perkembangan tunas *Araucaria* dan tidak menghasilkan efek apapun dalam perkembangan kotiledon *Pinus radiata*, serta tidak berperan dalam pertumbuhan eksplan meristem tanaman *Sequoiadendron giganteum* (Bonga dan Aderkas, 1992).

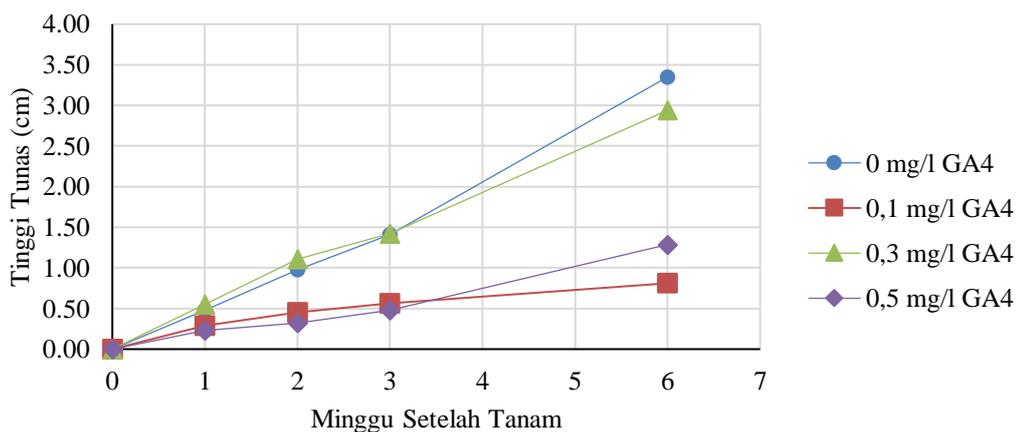
Faktor lain yang dapat mempengaruhi pertumbuhan tinggi tunas eksplan jati yaitu keadaan homeostatis pada eksplan, sehingga Giberelin eksogen menjadi inaktif. Keadaan ini dapat memicu produksi Giberelin endogen berkurang karena inaktivasi sintesis Giberelin. Gen inaktivasi Giberelin mempunyai peran besar dalam pengendalian level Giberelin yang terdapat pada eksplan baik Giberelin endogen maupun Giberelin eksogen. Penambahan 0,1 mg/l GA₄ memacu pembentukan enzim GA-oksidadase melalui biosintesis gen GA-oksidadase. Keberadaan GA-oksidadase menyebabkan GA₄ teroksidasi menjadi Giberelin tidak aktif, sehingga GA₄ aktif pada eksplan perlakuan 0,1 mg/l GA₄ lebih rendah dibandingkan perlakuan 0 mg/l GA₄ dan menyebabkan tinggi tunas menjadi lebih rendah.

Perlakuan 0,3 mg/l GA₄ berada dalam level perbandingan produksi enzim dengan level penyerapan GA₄ eksogen yang sama, sehingga hasil tinggi tunas tidak berbeda nyata dengan perlakuan 0 mg/l GA₄. Perlakuan 0,5 mg/l GA₄ memacu gen

biosintesis GA-oksidadase untuk memproduksi GA-oksidadase lebih tinggi sehingga pertumbuhan tunas terhambat dan pertumbuhan tinggi tunas menjadi lebih rendah dibandingkan perlakuan 0 mg/l GA₄. Terdapat 4 regulasi biosintesis Giberelin yaitu kontrol perkembangan, homeostatis Giberelin, regulasi hormon lain dan regulasi oleh lingkungan. Level bioaktif Giberelin endogen diatur oleh beberapa mekanisme homeostatis yang dapat memodifikasi metabolisme Giberelin. Salah satu mekanisme yang dilakukan adalah dengan umpan balik melalui pengaturan transkripsi GA-oksidadase melalui biosintesis dari gen (Hedden dan Thomas, 2016). Keberadaan GA-oksidadase menyebabkan efek kenampakan dibandingkan elongasi yang ekstrim, seperti kecacatan pada putik dan perkembangan buah (Tran dan Pal, 2014).

Penambahan GA₄ cenderung menghambat tinggi tunas tanaman karena menghambat pertumbuhan dan pada penambahan 0,3 mg/l GA₄ tidak berefek pada tinggi tunas, sedangkan perlakuan 0,1 mg/l dan 0,5 mg/l menghambat pertumbuhan tinggi tunas hingga 6 MST. Hasil perlakuan terbaik untuk elongasi tunas adalah perlakuan 0 mg/l GA₄ karena mempunyai pertumbuhan yang baik dan tanpa menggunakan tambahan Giberelin. Keberadaan Giberelin menyebabkan hambatan pada jaringan eksplan karena dengan penambahan Giberelin, pertumbuhan eksplan menurun pada konsentrasi 0,1 mg/l dan 0,5 mg/l GA₄. Hanya pada konsentrasi 0,3 mg/l yang mempunyai laju sama dengan perlakuan tanpa Giberelin. Davies (2004) menjelaskan bahwa pemberian Giberelin eksogen sangat berpengaruh pada mutan dalam pemanjangan batang *Arabidopsis* kerdil yang direkayasa tidak memiliki metabolisme biosintesis Giberelin, sedangkan *Arabidopsis* liar tidak menunjukkan

pemanjangan batang yang signifikan pada perlakuan yang sama. Hasil tersebut memberi kesimpulan bahwa Giberelin eksogen menjadi inaktif ketika level Giberelin endogen pada eksplan mempunyai level optimal, bahkan hasil pertumbuhan tinggi eksplan tunas jati dapat memperlambat laju pertumbuhan eksplan dengan adanya Giberelin 0,1 mg/l dan 0,5 mg/l.



Gambar 6. Pengaruh Konsentrasi GA₄ terhadap Tinggi Tunas pada 1,2,3 dan 6 Minggu Setelah Tanam (MST)

Gambar 6 menunjukkan bahwa perbedaan pertumbuhan tinggi tunas eksplan jati terjadi dimulai pada 1 MST. Seluruh perlakuan mengalami pertumbuhan tunas dengan laju pertumbuhan berbeda. Waktu inkubasi yang lebih lama menunjukkan kecenderungan laju pertumbuhan tinggi tunas eksplan lebih tinggi terdapat pada perlakuan 0 mg/l GA₄ dan 0,3 mg/l GA₄. Perlakuan 0,1 mg/l GA₄ dan 0,5 mg/l GA₄ memiliki laju pertumbuhan lebih rendah. Tipe sel yang merespon aktivitas Giberelin sangat berpengaruh dalam pemberian Giberelin eksogen yaitu GA₄. Perbedaan konsentrasi GA₄ memberikan respon yang berbeda melalui aktivitas reseptor Giberelin dan aktivitas enzim pada eksplan. Deaktivasi Giberelin

merupakan mekanisme jaringan dalam mengendalikan konsentrasi Giberelin yang ada pada jaringan (Hedden dan Thomas, 2016).

G. Jumlah Daun

Parameter jumlah daun adalah jumlah daun yang terbentuk pada eksplan dalam jaringan batang memicu pembentukan daun pada eksplan karena tunas eksplan akan membentuk daun baru. Proses perkembangan daun dapat dibagi menjadi 3 tahap. Tahap pertama sel primer yang tersedia dari meristem pucuk batang ke primordia daun. Tahap kedua proliferasi sel yang terjadi melalui primordia daun (pembelahan sel dan elongasi). Tahap ketiga ekspansi sel dimulai melalui elongasi sel (Rose,2016). Jumlah sel terbentuk dari proliferasi sel merupakan faktor penting dalam menentukan ukuran dan bentuk daun sebagai korelasi antara jumlah sel dan ukuran organ. Hasil analisis beda nyata tiap perlakuan tersaji pada Tabel 5.

Tabel 5. Pengaruh Konsentrasi GA₄ terhadap Jumlah Daun Eksplan Jati pada 3 dan 6 Minggu Setelah Tanam (MST)

Perlakuan	Jumlah Daun	
	3 MST	6 MST
0 mg/l GA ₄	4,60a	8,00a
0,1 mg/l GA ₄	2,00a	1,00b
0,3 mg/l GA ₄	3,30a	5,67ab
0,5 mg/l GA ₄	1,70a	0,86b

Keterangan : Angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak ada beda nyata menurut UJGD pada taraf α 5 %

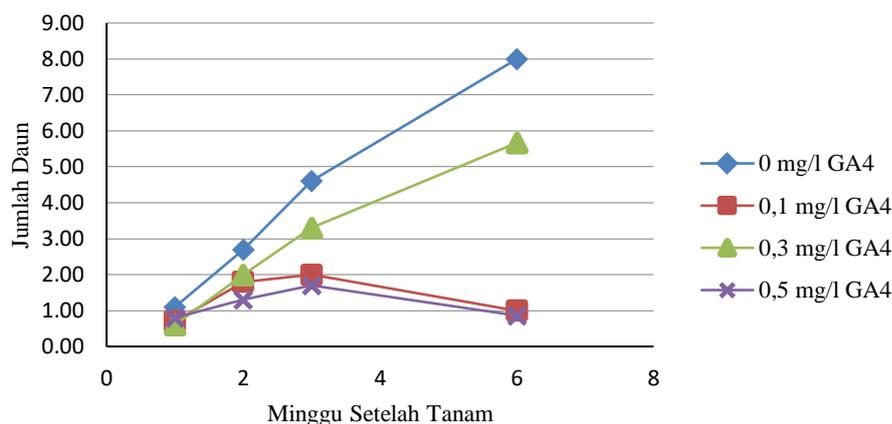
Hasil analisis hingga 3 MST tidak menunjukkan ada pengaruh pemberian perlakuan terhadap jumlah daun. Jumlah daun terbanyak terdapat pada perlakuan 0 mg/l. Hasil jumlah daun terendah pada perlakuan 0,1 mg/l dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Perlakuan tidak mempengaruhi jumlah daun pada 3 MST

karena Giberelin tidak berperan dalam pembentukan daun, meskipun secara tidak langsung dapat memacu pembentukan daun melalui pemanjangan batang. Laju pembentukan daun berjalan seiring pemanjangan batang pada eksplan. Giberelin dapat meningkatkan sifat dapat-meregang sel (*extensibility*) dan dapat memberikan kenampakan internoda batang yang lebih panjang pada eksplan. Kombinasi Sitokinin pada media dasar yang digunakan dapat memicu pembentukan daun karena Sitokinin mempengaruhi perkembangan meristem pucuk, sehingga daun terbentuk dari pucuk tunas (Soh dan Bhojwani, 1999). Hasil yang didapatkan adalah GA₄ tidak memberikan dampak pada pembentukan daun karena jumlah daun yang terbentuk pada perlakuan tanpa GA₄ tidak berbeda nyata dengan perlakuan yang ditambahkan GA₄.

Pembentukan daun terjadi dari tunas yang ada pada meristem pucuk. Tunas selanjutnya mengalami perkembangan dan melebar sehingga menjadi daun. Meristem pucuk kemudian membentuk tunas sebagai calon daun. Giberelin mempunyai peran memacu elongasi sel, namun tidak dapat memacu pembentukan daun atau pemekaran pucuk daun (Soh dan Bhojwani, 1999). GA₄ belum dapat memberikan pengaruh dalam pembentukan daun hingga 3 MST.

Hasil analisis 6 MST didapatkan penambahan GA₄ memiliki beda nyata antar perlakuan. Hasil tertinggi pada perlakuan 0 mg/l GA₄. Hasil ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan 0,3 mg/l. Perlakuan 0,1 mg/l GA₄ dan 0,5 mg/l GA₄ tidak berbeda nyata dengan perlakuan 0,3 mg/l, namun berbeda nyata dengan perlakuan 0 mg/l GA₄. Hasil terbaik untuk pembentukan jumlah daun adalah perlakuan 0 mg/l GA₄ karena memiliki jumlah daun rata-rata tertinggi dan menggunakan ZPT yang

paling sedikit. Beda nyata yang terjadi pada perlakuan karena eksplan lebih merespon keberadaan Sitokinin tanpa Giberelin. Penambahan jenis ZPT tidak dapat memberikan pengaruh yang lebih banyak pada pertumbuhan eksplan. Perlakuan Sitokinin tanpa Giberelin lebih mudah direspon oleh eksplan dibandingkan perlakuan yang ditambah dengan Giberelin, bahkan penambahan Giberelin menurunkan pertumbuhan jumlah daun pada eksplan. Hasil penambahan 0,3 mg/l GA₄ memberikan respon sama dengan perlakuan tanpa GA₄ diduga karena respon eksplan yang menerima stimulasi Sitokinin dan Giberelin secara seimbang. Takahashi dkk. (1991) menyatakan bahwa Giberelin mempunyai peran dalam pemanjangan batang dan perkembangan daun pada tanaman tahunan. Ada kemungkinan penambahan Giberelin mempunyai pengaruh pada kualitas daun eksplan secara molekuler. Kemungkinan tersebut dapat terjadi karena Giberelin menstimulasi pembentukan daun yang kompak pada daun fase juvenil.



Gambar 7. Pengaruh Konsentrasi GA₄ terhadap Jumlah Daun Eksplan Jati pada 1,2,3 dan 6 MST

Terjadi peningkatan jumlah daun pada perlakuan 0 mg/l GA₄ dan 0,3 mg/l GA₄. Perlakuan 0,1 mg/l dan 0,5 mg/l mengalami penurunan jumlah daun karena daun mengalami kematian. Kematian daun terjadi karena daun menghasilkan asam

absisat yang diakibatkan oleh pemotongan daun pada proses subkultur. Daun eksplan jati pada saat pemindahan media dipotong separuhnya untuk menurunkan proses perkembangan daun sehingga metabolisme yang dilakukan oleh eksplan lebih mengarah pada proses pertumbuhan batang. Respon eksplan terhadap pemotongan daun tersebut adalah menggugurkan daunnya. Asam absisat mempunyai peran dalam pengguguran daun karena bertindak untuk mengatur tekanan osmosis pada jaringan. Jaringan mati pada daun yang dilukai memacu asam absisat bekerja dalam menggugurkan daun (Soh dan Bhojwani, 1999). Perbedaan jumlah daun terlihat pada 6 MST. Pertumbuhan eksplan memicu tunas yang merupakan calon daun membuka sehingga daun baru terbentuk dan tunas pucuk baru terbentuk.