

## Regenerasi Berbagai Jenis Eksplan Nilam Klon Sidikalang dan Aplikasi *Azotobacter* pada Tahap Aklimatisasi

Erni Suminar<sup>1\*</sup>, Denny Sobardini Sobarna<sup>1</sup>, Anne Nuraini<sup>1</sup>, Syariful Mubarok<sup>1</sup>, Pujawati Suryatmana<sup>2</sup>, Yudhistari Sihombing<sup>3</sup>, dan Christine Angel<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Staf Departemen Budidaya Pertanian Faperta Unpad

<sup>2</sup>Staf Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan

<sup>3</sup>Alumni Departemen Budidaya Pertanian Faperta Unpad

Alamat korespondensi : erni.suminar@unpad.ac.id

### Abstract

#### Regeneration Various Types of Patchouli Explants ‘Sidikalang’ and Application of *Azotobacter* on the Acclimatization Stage

Patchouli productivity in Indonesia is still low. This is suspected due to the low use of high quality seed and the limitation of the seed availability, seed number and uniformity, free of disease seed, and also the low quality of plant genetic. Therefore, in vitro technology is needed to be used for patchouli propagation and improving the genetic quality. This study consisted of three experiments. Experiment I: growing of patchouli explants on different compositions of cytokines in vitro (Complete Random Design factorial), the first factor (explant types: buds, shoots, and leaves), while the second factor (0 mg/l cytokines, 0.5 mg/l BAP, 1.0 mg/l BAP, 0.5 mg/l Zeatin, 1.0 mg/l Zeatin). Experiment II: multiplication of patchouli in the form of micro cuttings in vitro (Complete Random Design). Experiment III: the response of micro cuttings to the inoculation of *Azotobacter* sp. at the acclimatization process (Random Group). It consisted of five treatments (without inoculation, 1 ml, 2 ml and 3 ml *Azotobacter* sp.). The results showed that in the first experiment, no interaction occurred between the types of explants with the type and concentration of cytokines. The use of the shoot tip explants increased the average number of shoots, the number of leaves and the fresh weight of explants average. Moreover, the addition of 0.5 mg/l BAP was effective in increasing the number of leaves and the average of fresh weight of patchouli explant at 8 MST. In the second experiment showed that the use of 0.01 mg/l NAA and 1 mg/l BAP was the best treatment for shoot multiplication of patchouli on the variable of shoots and leaves number. In the third experiment showed that the inoculation of *Azotobacter* sp. at 3 ml was effective in improving the average number of leaves, roots and plant height.

Keyword : Acclimatization, *Azotobacter*, Cytokine, Explant, Patchouli, Regeneration

### Abstrak

Kondisi produktivitas nilam di Indonesia saat ini masih rendah, hal ini diduga disebabkan oleh rendahnya penggunaan benih unggul serta kendala ketersediaan benih yang tepat waktu, jumlah bibit yang seragam dan bebas penyakit, serta masih rendahnya mutu genetik tanaman. Sehingga perlu dilakukan upaya perbanyak maupun peningkatan mutu genetik dengan aplikasi teknologi *in vitro*. Percobaan I: Pertumbuhan eksplan nilam pada komposisi sitokin yang berbeda secara *in Vitro* (Rancangan Acak Lengkap pola faktorial), faktor pertama (jenis ekplan : mata tunas, pucuk, dan daun), sedangkan faktor kedua (0 mg/l sitokin; 0,5 mg/l BAP; 1,0 mg/l BAP; 0,5 mg/l Zeatin; dan 1,0 mg/l Zeatin). Percobaan II: Multiplikasi stek mikro nilam secara *in vitro* (Rancangan Acak Lengkap). Percobaan III: Respon stekmikro terhadap inokulasi *Azotobacter* sp.

pada tahap aklimatisasi (Rancangan Acak Kelompok) terdiri dari lima perlakuan (tanpa inokulasi, 1 ml, 2 ml dan 3 ml *Azotobacter* sp.). Hasil Percobaan I menunjukkan tidak terdapat interaksi antara jenis eksplan dengan jenis dan konsentrasi sitokinin. Penggunaan eksplan pucuk menghasilkan rata-rata jumlah tunas, pertambahan jumlah daun serta rata-rata bobot segar eksplan lebih baik serta penambahan 0,5 mg/l BAP pertambahan jumlah daun dan rata-rata bobot segar eksplan nilam lebih baik pada 8 MST. Percobaan II menunjukkan bahwa penggunaan 0,01 mg/l NAA dan 1 mg/l BAP merupakan perlakuan yang terbaik untuk multiplikasi tunas nilam pada peubah jumlah tunas dan jumlah daun. Percobaan III menunjukkan inokulasi *Azotobacter* sp. dengan dosis 3 ml memberikan rata-rata pertambahan jumlah daun, jumlah akar dan panjang tanaman relatif lebih baik.

Kata kunci : Aklimatisasi, *Azotobacter*, Cytokinin, Eksplan, Nilam, Regenerasi

---

## PENDAHULUAN

Nilam termasuk dalam kelompok tanaman unggulan Perkebunan Nasional sejak tahun 2010, namun produktivitas minyaknya masih rendah, yaitu 199,48 kg/ha/tahun (Direktorat Jenderal Perkebunan 2006), dengan kadar minyak berkisar 1-2% dari terna kering. Hal ini disebabkan oleh beberapa hal, di antaranya: teknologi budidaya yang sangat sederhana, rendahnya mutu genetik tanaman, berkembangnya berbagai penyakit, serta teknik panen, dan pasca panen yang belum tepat (Nuryani dkk., 2005).

Teknik kultur jaringan dapat dijadikan alternatif untuk perbanyak tanaman relatif cepat, seragam, dan bebas penyakit. Wattimena dkk. (1992) menyatakan perbedaan eksplan yang digunakan akan menghasilkan pola pertumbuhan yang berbeda. Hidayah dkk. (2012) melaporkan penggunaan eksplan *nodes* pada kultur jaringan nilam memberikan respon regenerasi yang cepat pada minggu pertama inisiasi. Golongan sitokinin sering digunakan dalam perbanyak secara *in vitro* yang berfungsi mendorong pembelahan sel, pembentukan dan pertumbuhan tunas aksilar maupun tunas adventif. Beberapa kelompok sitokinin, yaitu: zeatin, kinetin, BAP, 2-iP ( $n^6$ -2-*isopentenyladenine*) dan Thidiazuron (TDZ) (George & Sherrington, 1984).

Penambahan kombinasi auksin dan sitokinin telah berhasil dilakukan terhadap berbagai spesies tanaman. Menurut Ezeibekwe dkk. (2009), tanaman *Dioscorea rotundata* L. yang ditambahkan dengan NAA 0,5 mg/l dan BAP 0,2 mg/l menghasilkan jumlah tunas, jumlah daun, jumlah ruas buku dan jumlah akar tertinggi. Penggunaan 1 mg/l BAP pada tanaman kentang *Solanum tuberosum* L. mampu menghasilkan tunas yang relatif lebih tinggi (Molla dkk., 2011). Kombinasi 1

mg/l BAP dengan 0,25 mg/l NAA terbukti menghasilkan jumlah tunas tertinggi pada tanaman nilam (Hidayah dkk., 2012). Pada penelitian ini digunakan konsentrasi 1 mg/l BAP karena dari beberapa penelitian yang menggunakan BAP dengan konsentrasi 1 mg/l menghasilkan jumlah tunas yang tinggi.

Penggunaan TDZ dengan konsentrasi 1 mg/l pada tanaman carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) mampu menghasilkan jumlah tunas terbanyak namun tinggi tunas relatif rendah (Brar dkk., 1995). Menurut penelitian Sharma & Shahzad (2008) kombinasi 0,05 mg/l NAA dengan 0,01 mg/l TDZ menghasilkan jumlah tunas tertinggi pada tanaman *Abelmoschus moschatus* Medik L. Kombinasi TDZ 0,1 mg/l yang ditambahkan pada media MS + BAP 1 mg/l, 3 mg/l, dan 5 mg/l mampu meningkatkan kemampuan multiplikasi tunas pada tanaman kencur (Lestari & Hutami, 2005). TDZ lebih aktif daripada zeatin untuk menstimulasi pertumbuhan pada kultur jaringan dengan konsentrasi yang rendah pada tanaman kentang (Sajid dan Aftab, 2009). Kombinasi 0,1 mg/l NAA dengan 1 mg/l zeatin mampu menghasilkan jumlah tunas tertinggi pada multiplikasi tunas tanaman *Cymbalaria muralis* (Thwe dkk., 2012). Penambahan 0,5 mg/l BAP pada kultur jaringan *Olive Cultivar 'Moraiolo'* memberikan hasil terbaik pada pertumbuhan tunas (Ali dkk., 2009). Penggunaan media MS dengan penambahan 1 mg L<sup>-1</sup> BAP menghasilkan rata-rata jumlah tunas tertinggi pada perbanyak nilam secara *in vitro* (Sobardini dkk., 2006). Ghanti dkk. (2003) melaporkan penambahan BAP 1 mg/l pada multiplikasi *Mentha piperita* secara *in vitro* memberikan jumlah tunas terbanyak.

Zeatin digunakan dalam jumlah sedikit dan memiliki efektivitas yang tinggi meskipun harganya relatif lebih mahal (Schmulling, 2004). Ling dkk. (2012) melaporkan penambahan 1 mg/l zeatin pada

*Labisia pumila* var. *alata* memberikan persentase maksimum pada pertumbuhan tunas. Penelitian Suminar dkk. (2010) melaporkan penggunaan zeatin 1 mg/l dapat merangsang pertumbuhan tunas anggrek *Phalaenopsis* dan *Vanda*.

Penggunaan mikroba yang sifatnya dapat mengkolonisasi akar menggantikan tempat mikroorganisme yang menimbulkan penyakit atau gangguan pada tanaman. Penelitian Kaur dkk. (2011) melaporkan, penggunaan *Azotobacter* pada *Thylopora indica* *in vitro* dapat meningkatkan jumlah tanaman yang bertahan hidup di tahap aklimatisasi. Penelitian Karthikeyan & Sakthivel (2011) melaporkan, inokulasi 5 sampai 10 ml *Azotobacter* pada stek *Eucalyptus camaldulensis* berhasil meningkatkan inisiasi akar dan pertumbuhan stek.

## BAHAN DAN METODE

### Percobaan I : Pertumbuhan eksplan nilam pada komposisi sitokinin yang berbeda secara *in Vitro*

Bahan-bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah eksplan nilam kultivar Sidikalang asal plantlet *in vitro* koleksi Laboratorium Teknologi Benih Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran. Eksplan yang diambil berupa ujung pucuk, mata tunas, dan daun. Metode yang digunakan adalah metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial yang terdiri dari dua faktor. Faktor pertama adalah Jenis Eksplan (a), dengan tiga taraf perlakuan, yaitu : a<sub>1</sub> = pucuk; a<sub>2</sub> = mata tunas, a<sub>3</sub> = daun, sedangkan faktor kedua adalah Jenis dan Konsentrasi Sitokinin (s), terdiri dari lima taraf, yaitu: s<sub>0</sub> = kontrol (tanpa pemberian BAP dan zeatin); s<sub>1</sub> = 0,5 mg/l BAP; s<sub>2</sub> = 1 mg/l BAP; s<sub>3</sub> = 0,5 mg/l zeatin ; s<sub>4</sub> = 1 mg/l zeatin.

### Percobaan II : Multiplikasi stek mikro nilam secara *in vitro*

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan kombinasi auksin (0; 0,01; 0,1; 1 mg/l NAA), sitokinin (1 mg/l BAP; 0,01 mg/l TDZ; 0,01 zeatin).

### Percobaan III : Respon stekmikro terhadap inokulasi *Azotobacter* sp. pada tahap aklimatisasi

Percobaan ini dirancang dengan metode Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang terdiri dari lima perlakuan konsentrasi. Perlakuan : A = 0 ml

inokulan *Azotobacter* sp./pot; B = 1 ml inokulan *Azotobacter* sp./pot; C = 2 ml inokulan *Azotobacter* sp./pot; D = 3 ml inokulan *Azotobacter* sp./pot; E = 4 ml inokulan *Azotobacter* sp./pot

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Percobaan I : Pertumbuhan eksplan nilam pada komposisi sitokinin yang berbeda secara *in Vitro* Persentase Eksplan Membentuk Kalus

Munculnya kalus pada eksplan merupakan salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro*. Menurut Hartmann dkk. (2002) kalus yang dihasilkan melalui propagasi secara *in vitro* terbentuk karena adanya pelukaan pada jaringan dan respon terhadap hormon.

Eksplan yang membentuk kalus pada 4 MST sekitar 31,82%. Eksplan yang paling banyak membentuk kalus adalah jenis eksplan daun. Hal ini diduga akibat pelukaan yang terjadi pada berkas pengangkut yang cukup banyak sehingga kalus akan terus terbentuk hingga luka tersebut tertutup (Gambar 1.).



Gambar 1. Eksplan asal potongan daun yang membentuk kalus pada 4 MST

### Jumlah Tunas per Eksplan

Perlakuan berbagai jenis eksplan secara mandiri memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah tunas selama 4 MST (Tabel 1). Penambahan sitokinin yang berbeda secara mandiri pada 4 MST tidak memberikan pengaruh nyata. Perlakuan tanpa ZPT (perlakuan s<sub>0</sub>), menghasilkan jumlah tunas yang relatif lebih baik pada 4 MST. Hal ini disebabkan kemungkinan sudah terdapat ZPT endogen yang telah mencukupi sehingga tanpa penambahan sitokinin eksogen pun dapat dihasilkan tunas. Pertumbuhan dan diferensiasi tanaman merupakan interaksi antara zat pengatur tumbuh dan zat lainnya yang ditambahkan ke dalam media atau pun yang sudah ada di dalam jaringan tanaman.

Tabel 4. Rata-rata jumlah tunas (buah) pada 4 dan 8 MST.

Perlakuan	Rata-rata jumlah tunas (buah)	
	4 MST	8 MST
Jenis eksplan (a)		
a <sub>1</sub> = ujung pucuk	1,89 b	4,93 b
a <sub>2</sub> = buku	1,62 b	5,33 b
a <sub>3</sub> = daun	0,13 a	1,89 a
Konsentrasi sitokinin (s)		
s <sub>0</sub> (0 mg/l BAP + 0 mg/l ZEA)	1,85 a	3,26 a
s <sub>1</sub> (0,5 mg/l BAP + 0 mg/l ZEA)	0,89 a	3,71 a
s <sub>2</sub> (0 mg/l BAP + 0,5 mg/l ZEA)	0,66 a	3,93 a
s <sub>3</sub> (0 mg/l BAP + 0,5 mg/l ZEA)	1,33 a	5,04 a
s <sub>4</sub> (0 mg/l BAP + 1 mg/l ZEA)	1,33 a	4,33 a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut Uji Duncan pada taraf 5 %.

Perlakuan 1 mg/l BAP (s<sub>2</sub>) menghasilkan jumlah tunas yang relatif lebih rendah dibandingkan perlakuan yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi BAP cenderung menurunkan jumlah tunas. Sejalan dengan penelitian Norrizah dkk. (2012) yang melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi BAP pada kultur jaringan nilam justru menurunkan pertambahan jumlah tunas.

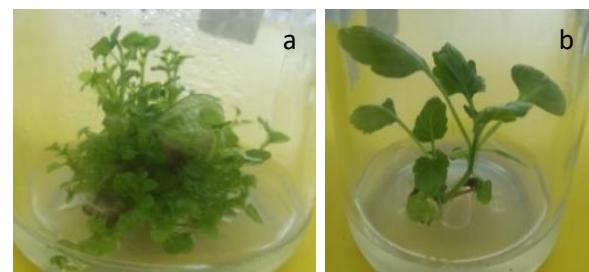
#### Jumlah Daun

Menurut Demissie (2013), jumlah daun dipengaruhi oleh jumlah tunas yang muncul, sehingga semakin sedikit tunas yang muncul, maka jumlah daun yang terbentuk akan semakin banyak dan sebaliknya. Berdasarkan hasil analisis ragam, terlihat bahwa tidak terdapat pengaruh interaksi jenis eksplan dengan konsentrasi sitokinin yang berbeda terhadap pertambahan jumlah daun per eksplan pada 8 MST. Penggunaan eksplan ujung pucuk menunjukkan pertambahan jumlah daun yang relatif lebih baik (42,80 helai), walaupun tidak berbeda nyata dengan penggunaan eksplan mata tunas. Penambahan 0,5 mg/l BAP memberikan pertambahan jumlah daun yang relatif lebih baik, namun tidak berbeda nyata dengan jenis sitokinin lainnya, bahkan dengan yang tanpa sitokinin cukup untuk pertambahan jumlah daun (Tabel 2.). Thidiaczuron (TDZ) memiliki keaktifan yang lebih baik dibandingkan dengan sitokinin lain karena berperan dalam menstimulasi produksi sitokinin endogen sel (Gubbuk & Pekmezci, 2004).



Gambar 2. Eksplan asal pucuk (a<sub>1</sub>) dengan pemberian 0,5 BAP mg/l (s<sub>1</sub>), yang memberikan rata-rata pertambahan tunas relatif lebih baik.

Berdasarkan hasil statistik, tidak terdapat pengaruh interaksi antara berbagai jenis eksplan dengan konsentrasi sitokinin terhadap jumlah tunas per eksplan nilam kultivar Sidikalang pada 8 MST. Perlakuan jenis eksplan mata tunas (a<sub>2</sub>) memberikan rata-rata jumlah tunas lebih baik, yaitu 5,33 buah, namun tidak berbeda nyata dengan penggunaan eksplan ujung pucuk yang memberikan rata-rata jumlah tunas 4,93 buah. Penambahan 0,5 mg/l zeatin memberikan rata-rata jumlah tunas relatif lebih banyak, yaitu 5,04 buah (Gambar 2.)



Gambar 3. (a) Eksplan asal pucuk (a<sub>1</sub>) dengan pemberian 0,5 BAP mg/l(s<sub>1</sub>) dan (b) eksplan asal pucuk (a<sub>1</sub>) tanpa penambahan sitokinin (s<sub>0</sub>).

Tabel 2. Rata-rata pertambahan jumlah daun pada 8 MST.

Perlakuan	Rata-rata Pertambahan Jumlah Daun	Rata-rata Bobot Segar Eksplan (g)
Jenis eksplan (a)		
a1 = ujung pucuk	42,80 b	0,70 a
a2 = buku	23,20 ab	0,37 a
a3 = daun	16,10 a	0,56 a
Konsentrasi sitokinin (s)		
s <sub>0</sub> (tanpa sitokinin)	-	-
s <sub>1</sub> (0,5 mg/l BAP)	19,67 a	0,10 a
s <sub>2</sub> (0,5 mg L <sup>-1</sup> ZEA)	44,67 a	0,84 b
s <sub>3</sub> (1 mg/l BAP )	21,83 a	0,72 b
s <sub>3</sub> (0,5 mg/l ZEA)	26,17 a	0,67 b
s <sub>4</sub> (1 mg/l ZEA)	24,50 a	0,39 ab

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut Uji Duncan pada taraf 5 %.

### Bobot Segar Kultur

Penggunaan berbagai jenis eksplan secara mandiri tidak memberikan pengaruh yang nyata pada pertambahan bobot segar eksplan. Tabel 2 menunjukkan bahwa penggunaan eksplan ujung pucuk memberikan pengaruh relatif lebih baik pada bobot segar eksplan dibandingkan penggunaan eksplan mata tunas dan daun, yaitu 0,70 gram. Penambahan 0,5 mg/l BAP memberikan pengaruh nyata terhadap pertambahan bobot segar eksplan dibandingkan perlakuan sitokinin lainnya. Hal ini sejalan dengan penelitian Ezeibekwe dkk. (2009) bahwa penggunaan BAP menunjukkan adanya peningkatan bobot segar eksplan. Sementara BAP dengan penggunaan konsentrasi lebih tinggi yaitu 1 mg/l menyebabkan pertumbuhan eksplan terhambat yang ditandai menurunnya bobot segar nilam.

Interaksi dan keseimbangan ZPT endogen dan eksogen, kondisi fisiologis eksplan dan kemampuan eksplan menyerap hara dan komposisi media tanam mempengaruhi bobot segar eksplan. Sitokinin mendorong pembelahan sel dalam biakan jaringan dengan cara meningkatkan peralihan dalam daur sel, yaitu dari G<sub>2</sub> (masa sesudah replikasi DNA, sel bersiap untuk membelah) ke fase mitosis (pembelahan sel), hal itu dapat terjadi karena sitokinin meningkatkan laju sintesis protein (Salisbury & Ross, 1992).

### Percobaan II : Multiplikasi stek mikro nilam secara *in vitro*

#### Jumlah Tunas

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa kombinasi NAA dengan sitokinin yang berbeda secara *in vitro* memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah tunas pada 4 MST, 8 MST dan 12 MST. Pada penelitian ini, kombinasi NAA dengan sitokinin jenis zeatin menghasilkan tunas yang lebih rendah jika dibandingkan dengan penggunaan sitokinin jenis BAP. Hal ini diduga konsentrasi zeatin 0,01 mg/l kurang efektif untuk multiplikasi tunas nilam. Perlakuan yang paling efektif dan efisien untuk perbanyak jumlah tunas nilam adalah perlakuan C (0,01 mg/l NAA + 1 mg/l BAP) yang menghasilkan jumlah tunas lebih banyak daripada perlakuan lain (Tabel 3).

Reddy *et al.* (2014), menyatakan bahwa sitokinin dapat mengatur proses fisiologis tanaman walaupun dengan pemberian konsentrasi rendah. Hal ini disebabkan aktivitas sitokinin yang terkait dengan proses pertumbuhan dan perkembangan dalam siklus sel, khususnya untuk melakukan metabolisme asam nukleat dan sintesis protein (Adda *et al.*, 2004).

#### Jumlah Daun

Hasil analisis ragam terlihat bahwa kombinasi NAA dengan sitokinin yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata terhadap rata-rata

jumlah daun tanaman nilam yang terbentuk. Konsentrasi sitokinin dan auksin yang tinggi ternyata belum mampu menghasilkan jumlah daun yang tinggi, bahkan jumlah daun tergolong lebih rendah jika dibandingkan dengan penggunaan konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi yang dikombinasikan dengan auksin (Tabel 4).

### Tinggi Tunas

Hasil analisis ragam pada 12 MST menunjukkan bahwa kombinasi NAA dengan

sitokinin yang berbeda secara *in vitro* menghasilkan pengaruh yang nyata terhadap tinggi tunas. Berdasarkan Tabel 5 terlihat bahwa perlakuan H (0,1 mg/l NAA + 0,01 mg/l TDZ) menghasilkan tunas relatif lebih tinggi daripada perlakuan lainnya, namun tidak berbeda nyata dengan beberapa perlakuan lainnya. Rata-rata tinggi tunas nilam yang lebih rendah dihasilkan daripada perlakuan A, B, C, D, E dan M. Proses proliferasi tunas dan perpanjangan dipengaruhi oleh sitokinin dan konsentrasi yang digunakan (Strosse, et al., 2004)

Tabel 3. Rata-rata jumlah tunas pada 4 MST, 8 MST dan 12 MST.

Perlakuan	Jumlah Tunas (buah)		
	4 MST	8 MST	12 MST
A = Kontrol	2,1 a	2,4 c	1,9 c
B = 1 mg/l BAP	2,6 a	3,7 b	7,7 b
C = 0,01 mg/l NAA + 1 mg/l BAP	1,8 a	6,1 a	15,2 a
D = 0,1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP	2,3 a	7,3 a	16,8 a
E = 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP	2,8 a	5,5 a	7,7 b
F = 0,01 mg/l TDZ	2,1 a	2,7 c	6,3 b
G = 0,01 mg/l NAA + 0,01 mg/l TDZ	2,4 a	3,3 b	7,1 b
H = 0,1 mg/l NAA + 0,01 mg/l TDZ	2,1 a	2,4 c	3,8 c
I = 1 mg/l NAA + 0,01 mg/l TDZ	0,2 b	0,6 d	3,7 c
J = 0,01 mg/l Zeatin	1,8 a	2,3 c	3,8 c
K = 0,01 mg/l NAA + 0,01 mg/l Zeatin	1,7 a	2,0 c	2,7 c
L = 0,1 mg/l NAA + 0,01 mg/l Zeatin	1,6 a	4,0 b	9,3 b
M = 1 mg/l NAA + 0,01 mg/l Zeatin	0,7 b	1,3 d	2,3 c

Keterangan : angka yang ditandai oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Scott-Knot pada taraf 5 %.

Tabel 4. Rata-rata jumlah daun pada 4 MST, 8 MST dan 12 MST (helai).

Perlakuan	Jumlah Daun (helai)		
	4 MST	8 MST	12 MST
A = Kontrol	8,4 a	13,6 b	17,8 c
B = 1 mg/l BAP	6,3 a	14,7 b	46,0 b
C = 0,01 mg/l NAA + 1 mg/l BAP	2,7 b	26,0 a	87,1 a
D = 0,1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP	2,8 b	33,2 a	97,0 a
E = 1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP	0,3 c	16,5 b	32,3 c
F = 0,01 mg/l TDZ	10,6 a	21,4 a	55,1 b
G = 0,01 mg/l NAA + 0,01 mg/l TDZ	8,4 a	13,7 b	59,8 b
H = 0,1 mg/l NAA + 0,01 mg/l TDZ	7,6 a	16,0 b	30,8 c
I = 1 mg/l NAA + 0,01 mg/l TDZ	0,5 c	10,9 b	25,6 c
J = 0,01 mg/l Zeatin	6,4 a	17,3 b	31,0 c
K = 0,01 mg/l NAA + 0,01 mg/l Zeatin	9,5 a	15,8 b	28,2 c
L = 0,1 mg/l NAA + 0,01 mg/l Zeatin	7,6 a	26,5 a	64,2 b
M = 1 mg/l NAA + 0,01 mg/l Zeatin	0,2 c	8,50 b	17,8 c

Keterangan : angka yang ditandai oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Lanjut Scott Knott pada taraf 5 %.

Tabel 5. Rata-rata tinggi tunas, jumlah ruas dan bobot basah pada 12 MST.

Perlakuan		Tinggi tunas (cm)	Jumlah ruas
A =	Kontrol	2,3 b	3,0 a
B =	1 mg/l BAP	1,8 b	0,7 b
C =	0,01 mg/l NAA + 1 mg/l BAP	2,3 b	1,9 a
D =	0,1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP	2,1 b	2,1 a
E =	1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP	1,3 b	1,3 b
F =	0,01 mg/l TDZ	3,2 a	2,7 a
G =	0,01 mg/l NAA + 0,01 mg/l TDZ	3,7 a	3,0 a
H =	0,1 mg/l NAA + 0,01 mg/l TDZ	4,4 a	3,1 a
I =	1 mg/l NAA + 0,01 mg/l TDZ	3,1 a	2,4 a
J =	0,01 mg/l Zeatin	3,1 a	2,7 a
K =	0,01 mg/l NAA + 0,01 mg/l Zeatin	3,5 a	3,0 a
L =	0,1 mg/l NAA + 0,01 mg/l Zeatin	4,3 a	2,7 a
M =	1 mg/l NAA + 0,01 mg/l Zeatin	2,3 b	2,1 a

Keterangan: angka yang ditandai oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut Uji Lanjut Scott Knott pada taraf 5%.

#### Jumlah Ruas

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa kombinasi NAA dengan sitokinin yang berbeda secara *in vitro* berpengaruh nyata terhadap rata-rata jumlah ruas tanaman nilam. Berdasarkan Tabel 5, perlakuan H (0,1 mg/l NAA + 0,01 mg/l TDZ) menghasilkan jumlah ruas yang lebih banyak, namun tidak berbeda nyata dengan beberapa perlakuan lain. Penggunaan BAP tunggal ternyata menghasilkan rata-rata ruas paling rendah diantara semua perlakuan, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan E (1 mg/l NAA + 1 mg/l BAP). Pada pemberian TDZ tanpa NAA ataupun dengan NAA tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah ruas. begitu juga dengan pemberian zeatin dengan NAA ataupun tanpa NAA. Kombinasi TDZ dengan NAA menghasilkan ruas yang lebih banyak.

Ramesh & Ramassamy (2014), menyatakan tinggi tanaman diduga dipengaruhi oleh jumlah tunas yang muncul, sehingga semakin sedikit tunas yang muncul, maka tinggi tanaman semakin meningkat, dan sebaliknya, hal ini karena energi yang dibutuhkan untuk pemanjangan tunas digunakan untuk pembentukan calon tunas lainnya, sehingga tinggi tunas dapat mengalami penghambatan.

#### Percobaan III : Respon stek mikro terhadap inokulasi *Azotobacter* sp. pada tahap aklimatisasi

Kegiatan penelitian yang melibatkan kultur *in vitro*, selain memerlukan sistem regenerasi yang

konsisten dan teknik transformasi yang efektif dan efisien, juga perlu menguasai teknik aklimatisasi tanaman (Slamet dkk., 2011). Menurut Pierik (1987), aklimatisasi adalah masa adaptasi planlet dari kultur heterotrofik menjadi autotrofik, yang merupakan tahap akhir dari kegiatan kultur *in vitro*.

Menurut Slamet (2011), secara umum faktor-faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan aklimatisasi tanaman adalah kondisi planlet (ukuran bibit, perakaran), kondisi lingkungan (ketepatan media tumbuh yang digunakan dan kelembapan udara), ketepatan perlakuan pra dan pasca transplantasi dari media *in vitro* ke media aklimatisasi, dan sanitasi lingkungan dari infeksi penyakit.

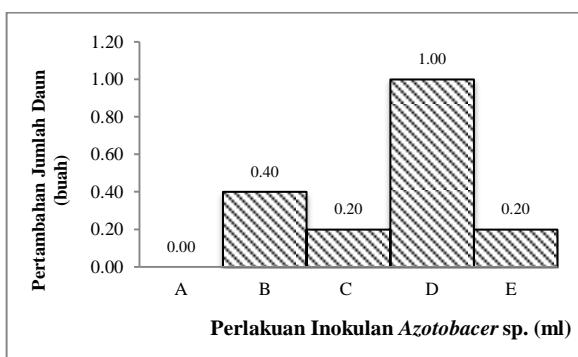
Kondisi umum pertumbuhan stek nilam *in vitro* 4 minggu setelah tanam sebelum penambahan *Azotobacter* sp. cukup baik. Persentase stek yang hidup, tetap tegak, dan berwarna hijau selama 4 MST mencapai 100%. Persentase stek yang berakar dan bertunas selama 4 MST juga mencapai 100%. (Gambar 4.)



Gambar 4. Stek nilam yang ditanam pada media sekam

### Pertambahan Jumlah Daun

*Azotobacter* sp. diketahui berperan dalam menghasilkan fitohormon. Berdasarkan analisis pada kultur isolat *Azotobacter* sp. yang diisolasi dari rizosfir bibit *lettuce* memperlihatkan adanya 0,04 mg/l sitokinin; 1,9 mg/l GA<sub>3</sub>; 0,9 mg/l GA<sub>5</sub> dan 1,0 mg/l GA<sub>7</sub> (Hindersah dkk., 2003). Sitokinin memiliki fungsi dalam menstimulasi pembelahan dan pertumbuhan sel. GA<sub>3</sub>, GA<sub>5</sub> dan GA<sub>7</sub> termasuk golongan giberelin yang pada tanaman utuh berfungsi mendorong pembungaian, menginduksi tumbuhnya mata tunas yang dorman dan mendorong perpanjangan ruas tanaman (Wattimena dkk., 1992). *Azotobacter* memiliki peran penting dalam meningkatkan serapan makro dan mikro elemen pada daun (Raman, 2012). Raman (2012), melaporkan bahwa inokulasi *Azotobacter* dapat meningkatkan jumlah daun pada pembibitan apel.



Gambar 5. Pertambahan Jumlah Daun pada 2 MST (A=kontrol, B=1 ml inokulasi *Azotobacter* sp., C=2 ml inokulasi *Azotobacter* sp., D=3 ml inokulasi *Azotobacter* sp., E=4 ml *Azotobacter* sp.).



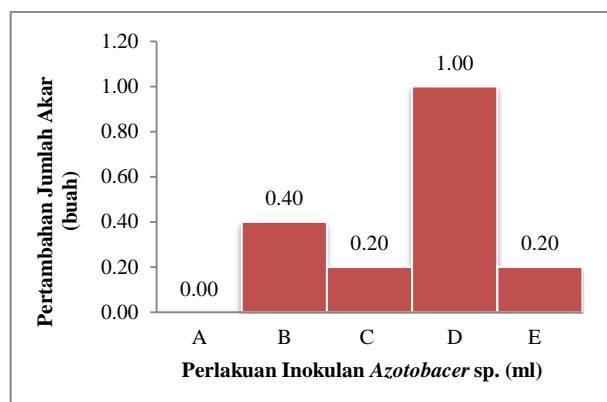
Gambar 6. Stek nilam dengan perlakuan 3 ml *Azotobacter* sp.

### Pertambahan Jumlah Akar

*Azotobacter* sp. sebagai mikroba penghasil fitohormon dapat membantu peningkatan pertumbuhan bibit, khususnya dalam pertumbuhan akar. *Azotobacter* juga memiliki efek

menguntungkan dalam fiksasi nitrogen dan menstimulasi perkembangan akar (Doebereiner dan Pedrosa, 1987 dalam Eid dkk., 2009).

Berdasarkan Gambar 7, terlihat bahwa tidak terdapat pengaruh nyata inokulasi *Azotobacter* sp. dengan dosis yang berbeda terhadap pertambahan jumlah akar stek nilam *in vitro* di tahap aklimatisasi. Gambar 9 & 10 menunjukkan dosis 3 ml inokulan *Azotobacter* sp. memberikan rata-rata pertambahan jumlah akar relatif lebih tinggi, yaitu 1,00 buah, sedangkan rata-rata pertambahan jumlah akar relatif lebih rendah terdapat pada perlakuan kontrol (tanpa inokulasi *Azotobacter* sp.).



Gambar 7. Pertambahan Jumlah Akar pada 2 MST (A=kontrol, B=1 ml inokulasi *Azotobacter* sp., C=2 ml inokulasi *Azotobacter* sp., D=3 ml inokulasi *Azotobacter* sp., E=4 ml *Azotobacter* sp.).

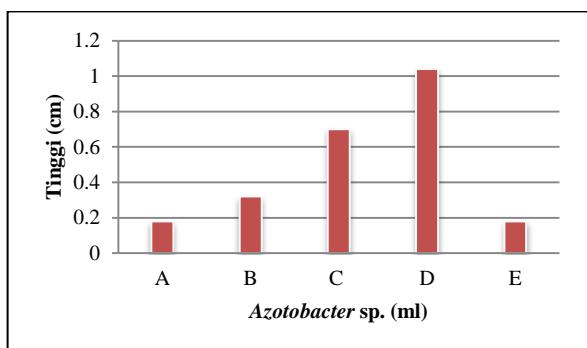
Asam indol-3 asetat (AIA) adalah senyawa alami yang menunjukkan aktivitas auksin yang mendorong pembentukan akar adventif. Produksi AIA oleh *Azotobacter* tidak berfungsi sebagai hormon bagi sel bakteri sendiri, namun mengarah pada interaksi dengan tanaman. Tanaman menggunakan AIA untuk mendukung proses pertumbuhan, sedangkan *Azotobacter* memanfaatkan senyawa karbohidrat yang akan dioksidasi sehingga diperoleh energi (Salisbury & Ross, 1992). Karthikeyan & Sakthivel (2011) melaporkan *Azotobacter* memproduksi AIA untuk inisiasi akar secara nyata dan inokulasinya mampu meningkatkan proliferase dan pertumbuhan akar stek batang tanaman *E. Camaldulensis*. Fatima dkk. (2009) melaporkan bahwa *Azotobacter* sp. memproduksi 19.4-30.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  AIA dan secara nyata meningkatkan panjang akar dan tunas pada tanaman gandum, hal ini diduga *Azotobacter* sp. meningkatkan kandungan auksin pada tanaman (Shaukat dkk., 2006).



Gambar 8. Pengaruh penambahan *Azotobacter* sp. (a) akar stek nilam dengan perlakuan 1 ml *Azotobacter* sp. dan (b) akar nilam tanpa inokulasi *Azotobacter* sp. (kontrol)

#### Pertambahan Tinggi Tanaman

Perpanjangan batang salah satunya dipengaruhi oleh hormon giberelin. Pada tanaman, giberelin disintesakan dari asam mevalonat (MVA) di jaringan muda di pucuk dan biji yang sedang berkembang, dan ditranslokasikan melalui xilem dan phloem (Wattimena dkk., 1992). Penambahan inokulan *Azotobacter* sp. memungkinkan diproduksinya giberelin eksogen yang akan berinteraksi dengan hormon endogen dari tanaman itu sendiri.



Gambar 9. Pertambahan jumlah akar dengan inokulasi *Azotobacter* sp. terhadap pertambahan jumlah akar pada 2 MST.



Gambar 10. Penambahan *Azotobacter* sp. pada stek nilam, (a) stek nilam dengan perlakuan 3 ml *Azotobacter* sp. dan (b) stek nilam tanpa inokulasi *Azotobacter* sp. (kontrol).

Gambar 9 menunjukkan bahwa penambahan inokulan *Azotobacter* sp. 3 ml (perlakuan D) cenderung memberikan rata-rata pertambahan tinggi lebih baik, yaitu 1,04 cm, meskipun tidak berbeda nyata dengan perlakuan 1 ml inokulan *Azotobacter* sp. (perlakuan B) dan 2 ml inokulan *Azotobacter* sp. (perlakuan C). Soleimanzadeh dkk. (2013) menyatakan bahwa inokulasi *Azotobacter* pada pembibitan mampu meningkatkan tinggi tanaman *Triticum aestivum* L. Perlakuan kontrol dan 5 ml inokulan *Azotobacter* sp. menghasilkan rata-rata pertambahan tinggi relatif lebih rendah, yaitu 0,18 cm.

#### KESIMPULAN

1. Tidak terdapat interaksi antara jenis eksplan dan konsentrasi sitokinin terhadap pertumbuhan eksplan nilam kultivar Sidikalang secara *in vitro* pada pertambahan jumlah tunas, jumlah daun, dan bobot segar.
2. Penggunaan eksplan ujung pucuk menghasilkan rata-rata jumlah tunas relatif lebih baik pada 4 MST, pertambahan jumlah daun dan rata-rata bobot segar eksplan lebih baik pada 8 MST. Penambahan 0,5 mg/l BAP memberikan pertambahan jumlah daun dan rata-rata bobot segar eksplan nilam lebih baik pada 8 MST.
3. Inokulasi *Azotobacter* sp. dengan dosis 3 ml memberikan rata-rata pertambahan jumlah daun, jumlah akar dan tinggi tanaman relatif baik pada tahap aklimatisasi.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Adds, J, E Larkcom, and R Miller. 2004. Genetics, Evolution, and Biodiversity. Nelson Advanced Science. United Kingdom, pp. 184.
- Ali, A, T Ahmad, and N Hafiz. 2009. Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultivar 'Moraiolo'. Pak. J. Bot., 41(2): 783-795.
- Brar, S, Mohanjeet, JM Al-Khayri and GL Klingaman. 1995. Effect of thidiazuron and benzylaminopurine on *in vitro* shoot proliferation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L). Proceedings Arkansas Academy of Science 49: 30-33.
- Demissie, AG. 2013. Effect of different combinations of BAP (*6-benzyl amino purine*) and NAA (*Naphthalene acetic acid*) on multiple shoot proliferation of plantain (*Musa* spp.) cv.

- Matoke from meristem derived explant. *Academia J. Biotech.* 1(5): 2315-7747.
- Direktorat Jendral Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pertanian Kementerian Pertanian Republik Indonesia. 2012. Perkembangan Ekspor Minyak Atsiri Indonesia. Available at: <http://pphp.deptan.go.id> (diakses : 20 November 2012).
- Eid, AR, MN Awad, and HA Hamouda. 2009. Evaluate effectiveness of bio and mineral fertilization on the growth parameters and marketable cut flowers of *Matthiola incana* L. American-Eurasian J. Agric and Environ. Sci., 5 (4): 509-518.
- Ezeibekwe, IO, CL Ezenwaka, FN Mbagwu, and CIN Unamba. 2009. Effects of combination of different levels of auxin (NAA) and cytokinin (BAP) on in vitro Propagation of *Dioscorea rotundata* L. (White Yam). Journal of Molecular Genetics 1 (2): 18-22.
- Farhani, F, H Aminpoor, M Sheidai, Z Noormohammadi, and MH Mazinani. 2008. An improved system for in vitro propagation of banana (*Musa acuminata* L.) cultivars. Asian Journal of Plant Science 7(1): 116-118.
- Fatima, Z, M Saleemi, M Zia, T Sultan, M Aslam, Riaz-ur-Rehman, and MF Chaudhary. 2009. Antifungal activity of plant growth promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in Wheat. Afr. J. Biotech., 8: 219-225.
- George, EF, and PD Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook of Commercial Laboratories. Eversley, Basingstokes.
- Ghanti, K, CP Kaviraj, RB Venugopal, PT Jabeeb, and S Rao. 2003. Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal eExplants. Indian journal Biotechnology. 3: 594-598.
- Gubbuk, H, and M Pekmezci. 2004. In vitro propagation of some new banana types (*Musa* spp.). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 28 (5): 355-361.
- Hartman, HT, FT Davis-Jr, and RL Geneve. 2002. Plant Propagation Principles and Practices (Seventh Edition). Prentice-Hall Career and Technology. Englewood Cliffs, New Jersey. 880 pp.
- Hidayah, WN, JS Noeriah, SM Sharifah Aminah, SA Sharipah, Ruzaina and P. Faiezah. 2012. Effect of medium strength and hormones concentration on regeneration of *Pogostemon cablin* using nodes explants. Asian Journal of Biotechnology 4(1) : 46-52,2012.
- Hindersah, R, MR Setiawati, dan BN Fitriatin. 2003. Inokulasi *Azotobacter* sp. Melalui Filosifir dan Rizosifir pada Pembibitan Selada Lettuce (*Lactuca sativa* L.). Laporan Penelitian. Bandung: Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran.
- Hutchinson, MJ, R Onamu, L Kipkosgei and SD Obukosia. 2010. Effect of thidiazuron, NAA and BAP on in vitro propagation of *Alstroemeria aurantiaca* cv. Rosita from shoot tip explants. JAGST 12 (2).
- Karthikeyan, A and KM Sakthivel. 2011. Efficacy of *Azotobacter chroococcum* in rooting and growth of *Eucalyptus camaldulensis* stem cuttings. Research Journal of Microbiology DOI : 10.3923.
- Kaur, H, M Anand, and D Goyal. 2011. Optimizing of potting mixture for hardening of in vitro raised plants of *Tylophora indica* to ensure high survival percentage. Int. J. Med. Arom. Plants, ISSN 2249-4340 1 (2): 83-88.
- Lestari, EG, dan S Hutami. 2005. Produksi Bibit Kencur Melalui Kultur Jaringan. DOI: <http://dx.doi.org/10.14203/beritabiologi.v7i6.866>
- Ling APK, K Tann, and S Hussein. 2012. Comparative effect of plant growth regulators on leaf and stem explants of *Labisia pumila* var. *alata*. Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine and Biotechnology). Available at : [www.zju.edu.cn](http://www.zju.edu.cn) (diakses : 19 Maret 2013).
- Molla, MM.H, KM Nasiruddin, M Al-Amin, D Khanam, and MA Salam. 2011. Effect of growth regulators on direct regeneration of potato. International Conference on Environment and Industrial Innovation. IPCBEE 12. IACSIT Press, Singapore
- Norrizah, SM,WN Hidayah, S Aminah, S Ruzaina, dan P Faiezah. 2012. Effect of medium strength and hormones concentration on regeneration of *Pogostemon cablin* using nodes explants. Asian Journal of Biotechnology 4(1) 46-52.
- Nuryani, Y, Emmyzar, dan Wiratno. 2005. Budidaya Tanaman Nilam. Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatika. Sirkuler No. 12
- Pardal, JS. 2002. Perkembangan penelitian regenerasi dan transformasi pada tanaman kedelai. Buletin Agrobio 5(2): 37-44.

- Pierik, RLM, 1987. In vitro Culture of Higher Plants. Netherlands : Martinus Nijhoff Publisher, 344 pp.
- Raman, J. 2012. Response of *Azotobacter*, *Pseudomonas* and *Trichoderma* on growth of apple seedling. International Conference on Biological and Life Sciences IPCBEE 40.
- Ramesh, Y, and V Ramassamy. 2014. Effect of gelling agents in in vitro multiplication of banana var. Poovan. Int. J. Advanced Bio. research 4(3): 308-311.
- Reddy, DRD, D Suvarna, and DM Rao. 2014. Effects of 6-Benzyl Amino Purine (6-BAP) on in vitro shoot multiplication of grand Naine (*Musa* sp.). Int. J. advanced Biotech. & research 5(1): 36-42.
- Sajid, AZ, and F Aftab. 2009. Effect of Thidiazuron (TDZ) on in vitro micropropagation of *Solanum tuberosum* L. cvs. Desiree and Cardinal. Pakistan Journal of Botany 41 (4): 1811-1815.
- Salisbury, FB, dan CW Ross. 1992. Fisiologi Tumbuhan Jilid 3. Diterjemahkan oleh DR. Lukman dan Sumaryono. Penerbit ITB. Bandung. 343 hlm.
- Schmülling, T. 2004. Cytokinin. Academic Press/Elsevier Science : In Encyclopedia of Biological Chemistry. Available at: [http://www.angenetik.fu-berlin.de/media/pdf/cytokinin\\_.pdf](http://www.angenetik.fu-berlin.de/media/pdf/cytokinin_.pdf) (diakses: 17 April, 2013).
- Sharma, R, and A Shahzad. 2008. Thidiazuron (TDZ) induced regeneration from cotyledonary node explant of *Abelmoschus medik.* L., a valuable medicinal plant. World Journal of Agricultural Sciences 4 (4): 449-452.
- Slamet. 2011. Perkembangan Teknik Aklimatisasi Tanaman Kedelai Hasil Regenerasi Kultur *In Vitro*. Jurnal Litbang Pertanian, 30(2).
- Available at : <http://pustaka.litbang.deptan.go.id>, (diakses : 17 November, 2012).
- Sobardini, D, E Suminar, dan Murgayanti. 2006. Perbanyak Cepat Tanaman Nilam. Laporan Akhir Penelitian DIPA UNPAD.
- Soleimanzadeh, H, and F Gooshchi. 2013. Effects of *Azotobacter* and nitrogen chemical fertilizer on yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.). World Applied Sciences Journal 21 (8): 1176-1180.
- Strosse, H, I Van den Houwe, and B Panis. 2004. Banana cell and tissue culture: cellular, molecular biology and induced mutations. Polymouth, U.K.: Science Publishers Inc, pp : 1-12.
- Suminar, E, A Auraum, Y Supriati, dan R Yunita. 2010. Perbaikan Teknik Perbanyak Benih Anggrek Jenis Vanda dan Phalaenopsis yang Cepat Lebih Cepat dari Perbanyak Konvensional, Seragam, dan Bebas Virus melalui Kultur Meristem. Kerjasama Penelitian Badan Litbang Universitas Padjadjaran.
- Thwe, AA , SK Yeo, SC Chae and SU Park. 2012. *In vitro* shoot organogenesis and plant regeneration of *Cymbalaria muralis*. Life Science Journal 9(4): 878-881.
- Wattimena, GA, LW Gunawan, NW Mattjik, E Syamsudin, NMA Wiendi, dan A Ernawati. 1992. Bioteknologi Tanaman Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor. 309 hlm.
- Wulandari, S. 2004. Respon eksplan daun tanaman jeruk manis (*Citrus sinensis* L.) secara *in vitro* akibat pemberian NAA dan BA. Jurnal biogenesis 1(1): 21-25.