

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan salah satu jenis tanaman hortikultura yang dapat dikonsumsi umbinya. Saat ini pendayagunaan kentang sudah semakin luas. Kentang selain digunakan sebagai bahan pangan, juga digunakan sebagai bahan baku industri, pakan dan berpotensi untuk biofarmaka. Oleh sebab itu, tanaman kentang memiliki prospek yang cukup baik apabila dikembangkan di Indonesia (Minarsih, 2004). Kentang mampu memproduksi protein lebih banyak dibandingkan gandum dan beras (Thurton, 2001). Tanaman Kentang merupakan tanaman penting di dunia, termasuk Indonesia karena merupakan sumber makanan terbesar keempat di dunia setelah padi, gandum dan jagung (Wattimena, 2000), bernilai ekonomi tinggi (Gunarto, 2007; Rusiman, 2008).

Kandungan gizi yang cukup tinggi pada tanaman kentang menyebabkan tanaman kentang menjadi salah satu komoditi yang mendapat prioritas pengembangan. Kebutuhan kentang cenderung meningkat sejalan dengan pertambahan jumlah penduduk, meningkatnya pendapatan serta berkembangnya industri pengolahan makanan. Keadaan tersebut mengakibatkan bertambah luasnya pertanaman kentang dan meningkatnya permintaan benih kentang yang bermutu dan berkualitas (Baharuddin, *et al.*, 2015).

Meskipun potensi permintaan kentang yang cukup tinggi ditunjang dengan potensi ketersediaan lahan yang cukup luas, namun pengembangan dan peningkatan produksi kentang berjalan lambat. Menurut BPS (2015) produksi tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) dari mulai tahun 2011 sampai 2014 mengalami peningkatan 1.348 juta ton pada tahun 2014. Pada

tahun 2015 produksi kentang mengalami penurunan 9,54 % yaitu sekitar 1.219 juta ton, dengan luas panenanya itu 66.983 ha. Hal tersebut disebabkan oleh beberapa faktor seperti persaingan pasar dari Cina, Taiwan, dan Australia, modal usaha yang dibutuhkan cukup tinggi, hama penyakit yang potensial menyerang kentang cukup banyak, dan penggunaan bibit kentang bermutu yang masih rendah (Sugihono dan Agus, 2014).

Benih atau bibit yang baik merupakan salah satu faktor kunci utama penentu keberhasilan peningkatan produktivitas dan kualitas produk usahatani. Sehingga salah satu cara memperoleh bibit kentang yang bermutu tinggi yaitu dapat dilakukan dengan perbanyakan tanaman secara *in vitro* atau kultur jaringan (Yuwono, 2008). Stek mikro dan umbi mikro menghasilkan lebih banyak umbi dibandingkan dengan bibit umbi biasa (Sari, *et al.*, 2014).

Teknik kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman, seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan, dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap (Gunawan, 1992). Gamborg dan Skyluk dalam Thorpe (1981), menyatakan bahwa keberhasilan dalam teknologi dan aplikasi metode kultur jaringan erat dengan penyediaan hara yang mencukupi dan sesuai dengan kultur sel ataupun jaringan. Terdapat dua hal yang seringkali sangat menentukan keberhasilan kultur jaringan, yaitu asal eksplan dan media kultur yang dipergunakan.

Perbanyakan *in vitro* ini mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan cara konvensional, yaitu bebas penyakit, dalam waktu relatif singkat dapat dihasilkan tanaman dalam jumlah banyak dan tidak bergantung musim (Gunawan 1992). Teknik kultur jaringan diakui sebagai metode dalam perbanyakan tanaman yang pelaksanaannya meliputi persiapan media, eksplan/bahan tanaman, penanaman, penumbuhan serta aklimatisasi. Media kultur jaringan

mengandung unsur-unsur penting berupa garam-garam mineral, sukrosa, vitamin, dan zat pengatur tumbuh (ZPT). Bahan-bahan tersebut merupakan bahan esensial untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

6-Benzly amino purine (BAP) merupakan salah satu sitokinin yang sering digunakan dalam penelitian kultur jaringan. Perbedaan jenis tanaman dan asal eksplan akan mempengaruhi keefektifan ZPT yang digunakan.

Asam Naftalen Asetat (NAA) merupakan auksin sintetik, tidak mengalami oksidasi enzimatis, dan dapat diberikan pada konsentrasi berkisar antara 1-2 ppm (Zulkarnain, 2009).

Hal yang dapat dilakukan dengan memanipulasi media kultur tersebut sedemikian rupa sehingga sel-sel tersebut dapat bereproduksi *in vitro* dan mengalami perkembangan dengan mengikuti tahapan perkembangan yang terjadi pada tumbuhan normal. Perkembangan ini akan menginduksi suatu sel tunggal untuk menjadi suatu tumbuhan yang mampu hidup terus dan menjadi bibit yang unggul. Berdasarkan uraian diatas maka penulis sangat tertarik untuk meneliti pengaruh pemberian auksin dan sitokinin terhadap perkembangan tunas mikro kentang varietas granola Lembang (*Solanum tuberosum* L.).

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari auksin dan sitokinin serta pengaruh interaksinya terhadap perkembangan tunas mikro kentang (*Solanum tuberosum* L.).

1.3 Hipotesis Penelitian

1. Diduga ada pengaruh pemberian auksin terhadap perkembangan tunas mikro kentang varietas Granola (*Solanum tuberosum* L.).

2. Diduga ada pengaruh pemberian sitokinin terhadap perkembangan tunas mikro kentang varietas Granola (*Solanum tuberosum* L.).
3. Diduga ada pengaruh interaksi auksin dan sitokinin terhadap perkembangan tunas mikro kentang varietas Granola (*Solanum tuberosum* L.).

1.4 Kegunaan Penelitian

1. Untuk memperoleh kombinasi yang optimum dari pemberian auksin dan sitokinin terhadap perkembangan tunas mikro kentang varietas Granola Lembang (*Solanum tuberosum* L.).
2. Untuk menghasilkan bibit tanaman kentang unggul dalam jumlah banyak dalam waktu yang singkat dengan pemberian auksin dan sitokinin.
3. Sebagai bahan penyusun skripsi untuk memenuhi persyaratan dalam menempuh ujian sarjana pada Fakultas Pertanian Universitas HKBP Nommensen Medan.
4. Sebagai bahan informasi bagi berbagai pihak yang terkait di dalam usaha budidaya tanaman kentang.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Taksonomi Tanaman Kentang

Menurut Setiadi, (2009) klasifikasi tanaman kentang sebagai berikut : Kingdom: *Plantae*, Divisi: *Spermatophyta*, Kelas: *Dicotyledonae*, Ordo: *Solanales*, Famili: *Solanaceae*, Genus: *Solanum*, Spesies: *Solanum tuberosum* L.

Kentang memiliki kadar air yang cukup tinggi sekitar 78%. Setiap 100 g kentang mengandung kalori 374 kal, protein 0,3 g, lemak 0,1 g, karbohidrat 85,6 g, kalsium 20 mg, fosfor 30 mg, zat besi 0,5 mg, dan vitamin B 0,04 mg. Berdasarkan nilai kandungan gizi tersebut, kentang merupakan sumber utama karbohidrat, sehingga sangat bermanfaat untuk meningkatkan energi di dalam tubuh (Samadi, 2007).

2.2 Morfologi Tanaman Kentang

1. Daun

Tanaman kentang umumnya berdaun rimbun. Helaian daun berbentuk bulat lonjong, dengan ujung meruncing, memiliki anak daun primer dan sekunder, tersusun dalam tangkai daun secara berhadap-hadapan (daun mejemuk) yang menyirip. Pada dasar tangkai daun terdapat tunas ketiak yang dapat berkembang menjadi cabang sekunder (Rukmana, 1997).

2. Batang

Batang tanaman berbentuk segi empat atau segi lima, tergantung pada varietasnya. Batang tanaman berbuku-buku, berongga, dan tidak berkayu, namun bertekstur agak keras dan permukaan batang halus. Diameter batang kecil dengan tinggi dapat mencapai 50–120 cm, tumbuh menjalar. Warna batang hijau kemerah-merahan atau hijau keungu-unguan (Rukmana, 1997).

3. Akar

Tanaman kentang memiliki sistem perakaran tunggang dan serabut. Akar tunggang dapat menembus tanah sampai kedalaman 45 cm, sedangkan akar serabut umumnya tumbuh menyebar (menjalar) ke samping dan menembus tanah dangkal. Akar tanaman berwarna keputih-putihan dan halus berukuran sangat kecil. Di antara akar-akar tersebut ada yang akan berubah bentuk dan fungsinya menjadi umbi (*stolon*) yang selanjutnya akan menjadi umbi kentang. Akar tanaman

berfungsi menyerap zat-zat yang diperlukan tanaman dan untuk memperkokoh berdirinya tanaman (Samadi, 1997).

4. Bunga

Bunga kentang berkelamin dua (*hermaphroditus*) yang tersusun dalam rangkaian bunga atau karangan bunga yang tumbuh pada ujung batang dengan tiap karangan bunga memiliki 7-15 kuntum bunga. Warna bunga bervariasi : putih, merah, biru. Struktur bunga terdiri dari daun kelopak (*calyx*), daun mahkota (*corolla*), benang sari (*stamen*), yang masing-masing berjumlah 5 buah serta putik 1 buah. Bunga bersifat protogami, tangkai putik lebih cepat masak daripada tepung sari. Sistem penyerbukannya dapat menyerbuk sendiri ataupun silang (Rukmana, 1997).

5. Umbi

Umbi terbentuk dari cabang samping diantara akar-akar. Proses pembentukan umbi ditandai dengan terhentinya pertumbuhan memanjang dari stolon yang diikuti pembesaran sehingga stolon membengkak. Umbi berfungsi menyimpan bahan makanan seperti karbohidrat, protein, lemak, vitamin, mineral, dan air (Samadi, 1997).

2.3 Kultur Jaringan

Pemuliaan tanaman dengan melibatkan kultur jaringan mencakup semua teknik kultur sel atau jaringan yang meliputi perbanyakan, pengamatan, dan manipulasi genetik tanaman tanpa melibatkan siklus seksual. Pada dasarnya kultur jaringan suatu proses perbanyakan sel, jaringan, organ atau protoplas dengan teknik steril (Nasir, 2001).

Kultur jaringan merupakan salah satu teknik dalam perbanyakan tanaman secara klonal untuk perbanyakan masal. Keuntungan pengadaan bibit melalui kultur jaringan antara lain dapat diperoleh bahan tanaman yang unggul dalam jumlah banyak dan seragam, selain itu dapat

diperoleh biakan steril (*mother stock*) sehingga dapat digunakan sebagai bahan untuk perbanyakan selanjutnya (Lestari, 2008).

Menurut Suryowinoto (1991), kultur jaringan dalam bahasa asing disebut sebagai *tissue culture*. *Kultur* adalah budidaya dan *jaringan* adalah sekelompok sel yang mempunyai bentuk dan fungsi yang sama, jadi, kultur jaringan berarti membudidayakan suatu jaringan tanaman menjadi tanaman kecil yang mempunyai sifat seperti induknya.

Prinsip utama teknik kultur jaringan pada tanaman adalah berdasarkan teori sel yang dikemukakan oleh Schwann dan Schleiden dalam Pierik (1987), yaitu setiap unit biologi terkecil yang mempunyai kemampuan untuk beregenerasi membentuk tanaman lengkap. Modifikasi teknik kultur jaringan dapat dilakukan dengan penambahan persenyawaan organik kompleks pada media yang dapat berupa buah atau sayuran untuk dijadikan media kultur jaringan dengan syarat tidak mengandung zat berbahaya apapun yang dapat menghambat pertumbuhan tanaman.

Tingkat keberhasilan pada teknik kultur jaringan sangat ditentukan oleh pemilihan eksplan sebagai bahan dasar, penggunaan medium yang tepat, lingkungan yang bersih, dan suhu yang cocok. Selain itu tanaman yang akan dikultur adalah jaringan muda yang masih dalam proses pertumbuhan, seperti pucuk, daun muda, tunas maupun akar. Kultur jaringan merupakan proses perbanyakan tanaman berdasarkan kemampuan sel tanaman dalam proses pertumbuhan (Kurniati, 2013).

Masalah yang sering muncul dalam perbanyakan kentang secara *in vitro* adalah kontaminasi. Syarat utama keberhasilan kultur *in vitro* adalah terciptanya kondisi aseptik yaitu terbebas dari mikroorganisme. Proses sterilisasi merupakan langkah awal untuk menciptakan kondisi aseptik terutama pada eksplan yang digunakan. Sterilisasi eksplan dengan menggunakan *Sodium Hypochlorite* (NaOCl) selama 8 menit kemudian dimasukkan ke dalam larutan etanol 30

detik dan dibilas dengan akuades sebanyak dua kali merupakan perlakuan terbaik dan tidak menimbulkan dampak pada eksplan dalam jangka panjang (Sugihono dan Agus, 2014).

2.4 Zat Pengatur Tumbuh

Hormon merupakan zat yang berfungsi untuk mengendalikan berbagai fungsi di dalam tumbuh. Meskipun kadarnya sedikit, hormon memberikan pengaruh yang nyata dalam pengaturan berbagai proses dalam tubuh. Hormon yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan pada makhluk hidup beragam jenisnya. Hormon pada tumbuhan sering disebut fitohormon atau zat pengatur tubuh. Beberapa diantaranya adalah auksin, sitokinin, giberelin, etilen, dan asam absisat (Hilal dan Hilal, 2000).

Senyawa yang memiliki peranan dalam mengarahkan pertumbuhan sel adalah zat pengatur tumbuh. Sitokinin, giberelin dan auksin merupakan zat pengatur tumbuh yang seringkali digunakan dalam teknik kultur jaringan (Gunawan, 1992). Zat pengatur tumbuh yang tergolong auksin adalah Indol Asam Asetat (IAA), Indol Asam Butirat (IBA), Naftalaen Asam Asetat (NAA) dan 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4-D). Zat pengatur tumbuh yang termasuk golongan sitokinin adalah Kinetin, Zeatin, Ribosil dan Bensil Amino Purin (BAP). Sedangkan golongan giberelin adalah GA1, GA2, GA3, GA4, dan golongan inhibitor adalah fenolik dan asam absisik (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

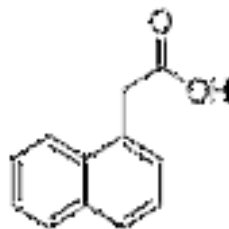
Selain zat pengatur tumbuh, kultur jaringan juga dipengaruhi oleh medium tanam karena beberapa jenis jaringan dapat tumbuh pada medium yang sederhana yang hanya mengandung nutrisi organik dan sumber karbon. Selain itu juga kebanyakan jaringan membutuhkan suplemen esensial seperti asam amino, substansi pertumbuhan dan juga vitamin (Razdan, 2003).

2.4.1 Auksin

Auksin adalah sekelompok senyawa yang fungsinya merangsang pemanjangan sel-sel pucuk (Zulkarnain, 2011). Pada umumnya auksin meningkatkan pemanjangan sel, pembelahan sel, dan pembentukan akar adventif (Pierik, 1987). Menurut Campbell, *et.al.*, (2003) auksin mempengaruhi beberapa aspek perkembangan tumbuhan, salah satu fungsinya yang paling penting adalah merangsang pemanjangan sel tunas muda yang sudah berkembang. Auksin juga meningkatkan aktivitas pembentukan akar adventif.

Hormon auksin didalam tubuh tanaman dihasilkan oleh pucuk-pucuk batang, pucuk-pucuk cabang dan ranting yang menyebar luas ke dalam seluruh tubuh tanaman. Zat pengatur tumbuh yang tergolong auksin adalah: Asam Indol Asetat (IAA), Asam Indol Butirat (IBA), Asam Naftalen Asetat (NAA) dan 2,4 Dikhlorofenoksiasetat (2,4-D) (Abbas, 2011).

Asam Naftalen Asetat (NAA) merupakan auksin sintetik, tidak mengalami oksidasi enzimatik dan dapat diberikan pada konsentrasi berkisar antara 1-2 ppm (Zulkarnain, 2009). Menurut Sudiyanti, *et al.*, (2017) untuk meningkatkan kemampuan proliferasi tunas perlu ditambahkan auksin dalam konsentrasi rendah. Hal ini ditegaskan oleh Zulkarnain (2009) auksin dapat diberikan pada media kultur dengan konsentrasi rendah berkisar antara 0,1 – 2,0 mg. NAA memiliki berat molekul 186.21 dengan rumus $C_{12}H_{10}O_2$. Berikut dijelaskan struktur molekul NAA pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur molekul NAA (Wuzhouchem, 2016)

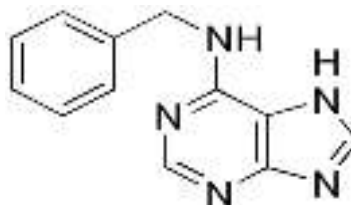
2.4.2 Sitokinin

Sitokinin adalah senyawa turunan adenine dan berperan dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis. Sitokinin digunakan untuk merangsang terbentuknya tunas, berpengaruh dalam metabolisme sel, dan merangsang sel dorman serta aktivitas utamanya adalah mendorong pembelahan sel. Sitokinin berperan dalam merangsang pertumbuhan tunas samping (*lateral*), meningkatkan klorofil daun serta memperlambat proses penuaan (*senescence*) pada daun, buah dan organ-organ lainnya (Wattimena, 1988).

Peran sitokinin dalam pembelahan memiliki peranan penting yaitu pemacu sitokinensis. Sitokinesis mendorong pembelahan sel dengan cara meningkatkan peralihan G_2 ke mitosis dan dalam hal ini sitokinin juga meningkatkan laju sintesis protein (Wijayani, *dkk.*, 2007).

Bentuk dasar dari sitokinin adalah adenine (*6- amino purin*). Adenin merupakan bentuk dasar yang menentukan terhadap aktifitas sitokinin. Didalam senyawa sitokinin, panjang rantai dan hadirnya suatu *double bond* dalam rantai tersebut akan meningkatkan aktifitas zat pengatur tumbuh. Sitokinin memiliki rantai samping yang kaya akan karbon dan hydrogen, menempel pada nitrogen. BAP memiliki rumus bangun $C_{12}H_{11}N_5$ dan titik lebur $230-233^{\circ}C$ (Santoso dan Nursadi, 2004).

6-Benzyl amino purine (BAP) merupakan sitokinin sintesis yang memiliki berat molekul sebesar 225.26 (Alitalia, 2008). Wattimena (1988) menambahkan bahwa BAP merupakan turunan adenin yang disubstutusi pada posisi 6 yang strukturnya serupa dengan kinetin. Struktur kimia *6-Benzil amino purin* dapat dilihat pada Gambar 2 berikut ini:



Gambar 2. Struktur molekul BAP (Wuzhouchem, 2016)

BAB III

BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Benih Induk Hortikultura Gedung Johor, Kecamatan Medan Johor, Sumatera Utara. Pelaksanaan dilakukan pada bulan November 2020 sampai Januari 2021.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah tanaman kentang varietas Granola, media yang digunakan adalah media Murasighe dan Skoog, *Benzyl Amino Purine* (BAP), *Napthalena Acetic acid* (NAA), fungisida antracol, *tween* 20, agar-agar, NaOH 1 N, HCl 1 N, akuades, vitamin, sukrosa, myo-inositol, alcohol 70%, 80%, dan 95%, serta hiplokhlorit 5%, klorox, kertas label, dan *alluminium foil*.

Alat-alat yang digunakan adalah: *autoklaf*, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), lampu *fluorescent*, botol kultur, erlenmeyer, pipet skala, gelas ukur, Petridis, *scalpel*, gunting, bunsen, timbangan analitik, *hotplate*, spatula, lemari es, pinset, oven, dan pH meter.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari dua faktor, yaitu :

1. Faktor NAA dengan 3 taraf konsentrasi yaitu:

$N_0 = 0$ mg/l air

$N_1 = 0,5$ mg/l air

$N_2 = 1$ mg/l air

Hasil penelitian Triyanti, *dkk.*, (2019) mengungkapkan bahwa konsentrasi anjuran NAA bagi pertumbuhan dan perkembangan tunas kentang adalah 0,5 mg/l .

2. Faktor BAP dengan 3 taraf konsentrasi yaitu:

$$B_0 = 0 \text{ mg/ l air}$$

$$B_1 = 0,5 \text{ mg/l air}$$

$$B_2 = 1 \text{ mg/l air}$$

Hasil penelitian Pratama, *dkk.*, (2014) mengungkapkan bahwa konsentrasi anjuran BAP bagi pertumbuhan dan perkembangan tunas kentang adalah 1 mg/l.

Dengan demikian diperoleh kombinasi perlakuan sebanyak $3 \times 3 = 9$ kombinasi yaitu :

N0B0	N1B0	N2B0	
	N1B0	N1B1	N2B1
	N2B0	N2B1	N2B2

Jumlah kombinasi = 9 kombinasi

Jumlah ulangan = 3 ulangan

Jumlah tunas per botol = 1 tunas

Jumlah botol per perlakuan = 5 botol

Jumlah sampel yang dijadikan parameter = 3 sampel

Jumlah seluruh botol sebanyak $9 \times 5 \times 3 = 135$ botol

3.4 Metode Analisis

Metode linier aditif yang digunakan untuk RAL faktorial adalah :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dimana:

Y_{ijk} = Hasil pengamatan dari perlakuan NAA taraf konsentrasi ke-I dan perlakuan BAP taraf konsentrasi ke-j pada ulangan ke-k

μ = Nilai tengah

α_i = Pengaruh perlakuan konsentrasi NAA taraf ke-i

β_j = Pengaruh perlakuan konsentrasi BAP taraf ke-j

$\alpha\beta_{ij}$ = Pengaruh interaksi perlakuan NAA taraf konsentrasi dan perlakuan BAP taraf konsentrasi ke-j

ϵ_{ijk} = Pengaruh galat pada satuan percobaan yang diberi NAA taraf konsentrasi ke-i dan perlakuan BAP taraf konsentrasi ke-j pada ulangan ke-k

Untuk mengetahui pengaruh dari faktor perlakuan yang diberikan serta interaksinya maka data hasil percobaan dianalisis dengan menggunakan sidik ragam. Hasil sidik ragam yang nyata atau sangat nyata pengaruhnya dilanjutkan dengan menggunakan uji jarak Duncan pada taraf $\alpha = 0,05$ dan $\alpha = 0,01$ untuk membandingkan perlakuan dan kombinasi perlakuan (Malau, 2005).

3.5 Tahapan Pelaksanaan Penelitian

Tahapan pelaksanaan penelitian meliputi beberapa kegiatan, yaitu:

3.5.1 Pengadaan dan Seleksi Tanaman

Pada penelitian ini, sumber tanaman yang digunakan adalah tunas kentang varietas granola. Umbi kentang yang digunakan sebagai eksplan untuk penelitian harus berasal dari indukan yang sehat, berasal dari asal usul indukan yang jelas, memiliki riwayat hasil produksi yang baik dan umbi yang unggul. Tunas yang digunakan untuk dijadikan eksplan berukuran 0,5 cm. Umbi tanaman kentang varietas granola (*Solanum tuberosum* L.) yang digunakan diperoleh dari Balai Benih Induk Hortikultura (BBI), Berastagi, Sumatera Utara.

3.5.2 Sterilisasi Alat dan Ruang Kultur

Sterilisasi merupakan teknik membersihkan dan membebaskan suatu benda dari segala kehidupan mikroorganisme (protozoa, fungi, bakteri, dan virus). Sterilisasi adalah tahap kunci keberhasilan dalam metode kultur jaringan. Sterilisasi ini meliputi sterilisasi ruangan, sterilisasi alat tanam, sterilisasi media tanam, dan sterilisasi eksplan.

Alat-alat seperti botol kultur akan digunakan dalam kultur jaringan dapat disterilkan dengan autoklaf. Botol kultur disterilkan dengan autoklaf pada temperatur 121°C dan tekanan 1 atm, selama 60 menit, sedangkan sterilisasi bahan atau media kultur selama 15 menit. Alat-alat seperti pinset dan scalpel selain disterilkan dengan autoklaf dapat dilakukan dengan pembakaran di atas api bunsen. Botol-botol yang akan disterilisasi sebelumnya ditutup dengan aluminium foil atau plastik dan diikat dengan karet. Akuades disterilkan seperti sterilisasi alat selama 30 menit.

Salah satu ruang yang harus dijaga kesterilannya adalah ruang transfer yang digunakan untuk inokulasi, isolasi dan subkultur. Ruangan ini biasanya tidak terlalu besar agar proses sterilisasinya tidak lama dan mudah. Sterilisasi ruangan dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 90%, dan sterilisasi lantai dengan kain pel yang dibasahi dengan alkohol 90% atau phenol. Sterilisasi ini mutlak dilakukan menjelang ruang inokulasi akan digunakan. Lampu ultraviolet dapat digunakan untuk sterilisasi ruang, dan biasanya selalu dinyalakan apabila ruang inokulasi tidak digunakan, serta dimatikan saat masuk dalam ruang ini (Edhi Sandra, 2013).

3.5.3 Pembuatan Media

Media kultur yang dibuat adalah menurut formula Murashige dan Skoog (MS) pada Lampiran 1. Pembuatan media dilakukan dengan pembuatan larutan stok terlebih dahulu untuk memudahkan pembuatan media. Larutan stok adalah larutan bahan media dalam jumlah atau volume besar. Pembuatan larutan stok bertujuan untuk menghemat pekerjaan menimbang yang

berulang-ulang setiap kali membuat media. Larutan stok disimpan di tempat gelap dan bertemperatur rendah. Pembuatan larutan stok bahan kimia terdiri dari hara makro , hara mikro, larutan vitamin, sukrosa, myo-inositol dan agar-agar.

Selanjutnya, sukrosa dimasukkan ke dalam gelas beaker yang telah berisi akuades 500 ml, kemudian diaduk dengan menggunakan magnetik stirrer sebagai pengaduk. Kemudian ditambahkan myo-inositol dan diaduk hingga larut. Setelah itu masukkan unsur hara makro, larutan stok hara mikro, iron dan vitamin. Kemudian larutan ditepatkan menjadi 1000 ml. kemudian keasaman larutan diukur menggunakan pH meter. Nilai pH yang dikehendaki yaitu 5,8. Untuk menaikkan pH digunakan larutan NaOH 0,1 N dan untuk menurunkan pH diberikan larutan HCl 0,1 N.

Agar-agar ditambahkan kedalam Erlenmeyer untuk setiap perlakuan, lalu dipanaskan di *hot plate* dengan pengaduk magnetik sampai larutan menjadi kering (semua agar telah larut) media siap dipindahkan ke dalam botol kultur steril. Kemudian botol ditutup dengan aluminium foil dan diberi label sesuai perlakuan yang diberikan. Media yang dalam botol tersebut disterilkan di dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 30 menit. Selanjutnya media dapat disimpan ke dalam ruang kultur sebelum digunakan.

3.5.4 Pemberian Zat Pengatur Tumbuh

Penggunaan zat pengatur tumbuh diawali dengan pembuatan media stok. Zat pengatur tumbuh sebanyak yang dibutuhkan dengan konsentrasi stok optimum 100 ml. Zat pengatur tumbuh yang digunakan diberikan terlebih dahulu kedalam botol kultur dengan menggunakan pipet tetes sesuai konsentersasi perlakuan. Kemudian media dimasukkan ke dalam botol yang telah diberikan zat pengatur tumbuh tersebut dan botol kultur ditutup menggunakan kertas aluminium foil untuk disterilkan ke dalam autoklaf.

3.5.5 Sterilisasi *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC)

Sterilisasi laminar dilakukan dengan sprirtus atau alkohol 70%. Permukaan laminar sebelum mulai bekerja dibersihkan dengan tisu yang sudah dicelupkan alkohol 70%. Laminar yang dilengkapi dengan lampu UV, sebelum digunakan juga dinyalakan selama 1-2 jam untuk mematikan kontaminan yang ada di permukaan laminar. Hal serupa juga dilakukan setelah selesai melakukan penanaman atau inokulasi. Laminar harus tetap dijaga kebersihannya.

3.5.6 Sterilisasi Bahan Tanaman Tunas Mikro Kentang

Tunas mikro kentang dibersihkan dari kotoran lalu tunas kentang dipisahkan satu persatu dari tunas tanaman kentang dengan detergen, dan dibilas dengan air mengalir, tunas kentang lalu direndam dalam larutan fungisida antracol dengan takaran 2 g/l air bersih, eksplan tunas kentang direndam selama 30 menit didalam larutan tersebut lalu dicuci bersih menggunakan akuades. Kemudian eksplan tunas kentang direndam didalam alkohol 95% diaduk perlahan selama beberapa detik dan dicuci dengan akuades. Kemudian tunas kentang direndam dengan larutan klorox 5% (larutan klorox terdiri dari 5 ml klorox + 95 ml akuades + 3 tetes tween) selama 5 menit lalu dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali. Selanjutnya, tunas kentang direndam dengan larutan klorox 10% (larutan klorox terdiri dari 10 ml klorox + 90 ml akuades + 2 tetes tween) selama 10 menit lalu dibilas dengan akuades sebanyak tiga kali. Tunas kentang lalu direndam dan dicampur dalam klorox 20% (larutan klorox terdiri dari 20 ml klorox + 80 ml akuades + 1 tetes tween) selama 10 menit. Terakhir eksplan dibilas dengan akuades steril lima kali masing-masing selama 5 menit, kemudian eksplan tunas kentang steril dimasukkan kedalam cawan petri steril dan dipotong bagian kanan, kiri dan pangkalnya kemudian segera ditanam pada masing-masing media MS tanpa perlakuan.

Eksplan tunas kentang yang sudah ditanam pada media MS tanpa perlakuan ditunggu hingga berumur 3-4 minggu hingga menjadi planlet yang akan digunakan sebagai sumber eksplan untuk penelitian. Eksplan yang digunakan dalam penelitian yaitu dengan stek satu buku sesuai dengan perlakuan masing-masing.

3.5.7 Penanaman Eksplan Berupa Stek Batang Kentang Mikro Satu Buku

Penanaman eksplan stek batang satu buku tunas mikro kentang dilakukan di LAFK yang telah disterilkan dengan alkohol 70%. Eksplan steril diambil menggunakan pinset dan dipotong menjadi satu buku. Botol media diambil lalu didekatkan dengan api bunsen, kemudian eksplan ditanam ke dalam botol media sesuai perlakuan. Apabila telah selesai botol-botol media tersebut ditempatkan di dalam rak-rak kultur jaringan.

3.5.8 Pemeliharaan Ruang Kultur

Botol kultur yang telah berisi tunas kentang tersebut ditempatkan di dalam rak kultur jaringan dan disusun sedemikian rupa pada rak kultur yang suhunya telah diatur, ditempatkan pada kondisi terang dengan penyinaran lampu TL Neon dengan jarak 50 cm dari botol-botol kultur dan untuk kelembaban lingkungan harus dijaga 100% karena kelembaban di sekeliling ruang kultur dapat mempengaruhi pola perkembangan eksplan tersebut. Temperatur yang diperlukan untuk mendapatkan pertumbuhan yang optimum adalah 20-25°C. Ruang kultur harus dijaga kebersihannya agar terhindar dari bakteri maupun virus, agar terjaga kebersihannya botol-botol eksplan harus disemprot dengan menggunakan alkohol 95% dan rak-rak kultur ditaburi dengan fungisida benlate.

3.6 Pengamatan Parameter

Pengamatan terhadap eksplan dimulai dari 1 minggu setelah tanam (MST) sampai dengan 8 MST. Parameter yang diamati adalah :

3.6.1 Persentase Tunas Mikro Yang Hidup

Perhitungan jumlah eksplan tunas hidup kentang (*Solanum tuberosum* L) dengan menggunakan rumus menurut Nurcahayani, *dkk.*, (2014).

$$\text{Persentase tunas yang hidup} = \frac{\text{jumlah tunas yang hidup}}{\text{jumlah tunas seluruhnya}} \times 100\%$$

3.6.2 Jumlah Daun

Jumlah daun dihitung secara manual, yakni dengan menghitung jumlah semua daun pada setiap tunas secara manual dan dilakukan mulai pertama daun muncul sampai selesai penelitian.

3.6.3 Tinggi Tunas Mikro

Tinggi tunas diukur dengan menggunakan penggaris, pengukuran dilakukan dari mulai pangkal batang dan dilakukan pada akhir penelitian.

3.6.4 Jumlah Akar

Semua akar yang terdapat pada tunas kentang dihitung jumlahnya, dihitung secara manual dengan menghitung satu persatu jumlah akar pada tunas kentang.

3.6.5 Panjang Akar

Panjang akar diukur mulai dari pangkal akar sampai dengan ujung akar yang terpanjang, dengan menggunakan penggaris dan dilakukan pada akhir penelitian.

3.6.6 Jumlah Tunas Lateral

Jumlah tunas lateral dihitung secara manual, yakni dengan menghitung jumlah semua tunas lateral pada setiap tanaman secara manual dan dilakukan mulai pertama tunas lateral muncul sampai selesai penelitian setiap.