

**KAJIAN PENGGUNAAN BERBAGAI KONSENTRASI BAP DAN 2,4-D
TERHADAP INDUKSI KALUS JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* L.)
SECARA *IN VITRO***

Skripsi

Program Studi/Jurusan Agronomi



Disusun oleh :

**SETIANINGRUM ANDARYANI
H0106098**

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA
2010**

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kebutuhan bahan bakar minyak (BBM) di Indonesia akhir-akhir ini semakin meningkat seiring dengan meningkatnya angkutan transportasi berbahan bakar minyak dan mesin lainnya yang menggunakan bahan bakar minyak. Sampai saat ini Indonesia bukan lagi sebagai pengekspor minyak bumi tapi justru sekarang Indonesia sebagai pengimpor minyak dari luar negeri khususnya dari Arab (Sumanto, 2005). Untuk itu perlu dicarikan sumber alternatif dan jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) merupakan salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai sumber bahan bakar nabati (BBN).

Bahan bakar nabati berasal jarak pagar memiliki beberapa kelebihan. Keuntungan yang dimiliki jarak pagar dibandingkan dengan tanaman lainnya karena tanaman ini hanya memiliki sedikit fungsi lain dan terbatas, sehingga persaingan penggunaannya juga terbatas. Selain ramah lingkungan minyak jarak pagar bukan termasuk minyak yang dapat dimakan (*edible oil*) sehingga harga bahan bakunya lebih murah dan tidak bersaing dengan pangan (Puslitbangbun, 2007).

Menurut Syah (2006), hambatan utama yang dihadapi dalam pengembangan biodisel dari minyak jarak pagar adalah ketersediaan bahan baku yang masih sangat rendah, mengingat perkebunan baru dikembangkan. Karena itu, diperlukan percepatan usaha budidaya jarak pagar yang produktif untuk memenuhi kebutuhan bahan baku industri biodiesel nasional.

Seiring dengan meningkatnya permintaan dan kebutuhan akan bahan tanaman jarak pagar, maka perlu dilakukan upaya perbanyak tanaman dalam jumlah besar dan dalam waktu yang singkat. Penyediaan bibit unggul merupakan salah satu faktor pendukung keberhasilan pengembangan jarak pagar. Perbanyak tanaman secara konvensional masih dibatasi oleh kemampuan tanaman untuk menghasilkan bibit baru dalam jumlah banyak, seragam dan dalam waktu singkat. Sampai saat ini bibit jarak pagar diproduksi dengan dua cara, yaitu dengan menggunakan biji dan stek. Usaha perbanyak

tanaman jarak pagar menggunakan stek atau biji memiliki kendala, yaitu pada penggunaan biji untuk perbanyak tanaman dalam jumlah banyak akan mengurangi jumlah biji yang dapat diolah menjadi minyak. Sedangkan teknik perbanyak melalui stek menghasilkan tanaman dengan jumlah terbatas, membutuhkan pohon induk yang banyak sementara pohon induk yang tersedia sangat terbatas selain itu dikhawatirkan akan merusak tanaman induk (Lizawati *et al.*, 2009).

Untuk mengatasi permasalahan ini diperlukan budidaya kultur jaringan (*in vitro*). Kultur jaringan tanaman merupakan teknik menumbuhkembangkan bagian tanaman, baik berupa sel, jaringan, atau organ dalam kondisi kultur yang aseptik secara *in vitro* (Yusnita, 2004). Perbanyak secara kultur jaringan akan menawarkan peluang besar untuk menghasilkan jumlah bibit yang banyak dalam waktu relatif singkat. Selain itu kultur jaringan juga dapat mempertahankan sifat induk yang unggul dan dapat menghasilkan bibit yang bebas cendawan, bakteri, virus dan hama penyakit (Prihandana dan Hendroko, 2006).

Prinsip dari teknik kultur jaringan ini adalah bahwa semua bagian tanaman baik berupa sel, jaringan, dan organ tanaman, dapat menjadi tanaman baru apabila ditumbuhkan dalam kondisi yang aseptik, dengan cara steril. Teknik kultur jaringan jarak pagar akan berhasil dengan baik apabila syarat – syarat yang diperlukan terpenuhi. Teknik tersebut meliputi pemilihan eksplan sebagai bahan tanam, penggunaan medium yang cocok, keadaan yang aseptik, dan pengaturan udara yang baik (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Salah satu faktor yang mempengaruhi berhasil tidaknya pengadaan bibit jarak pagar melalui kultur jaringan adalah adanya zat pengatur tumbuh (ZPT). Namun, kandungan hormon pada tanaman juga harus diperhatikan. Hormon pada tanaman disebut juga fitohormon. Menurut (Pierik, 1987) fitohormon adalah senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tanaman tingkat tinggi secara endogen. Senyawa tersebut berperan merangsang dan meningkatkan pertumbuhan serta perkembangan sel, jaringan, dan organ tanaman menuju arah diferensiasi tertentu. Senyawa-senyawa lain yang

memiliki karakteristik yang sama dengan hormon, tetapi diproduksi secara eksogen, dikenal sebagai ZPT. Wetter dan Constabel (1991) mengemukakan bahwa salah satu senyawa yang paling sering digunakan untuk menginduksi pembelahan sel adalah asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D). Dalam budidaya *in vitro*, menginduksi kalus merupakan salah satu langkah penting. Jika endosperm tanaman dikotil dipakai dan pada medium ditambahkan hormon dari kelompok auksin yaitu 2,4-D atau IAA, maka harus ditambahkan pula hormon dari kelompok sitokinin yaitu kinetin atau BAP (Suryowinoto, 1996).

B. Perumusan Masalah

Kultur jaringan merupakan salah satu alternatif pemecahan masalah untuk mendapatkan bibit jarak pagar dalam jumlah banyak dalam waktu yang singkat. Dalam pembentukan kalus, secara kultur jaringan dibutuhkan adanya zat pengatur tumbuh. Penggunaan modifikasi zat pengatur tumbuh dapat menjadi faktor penentu keberhasilan kultur jaringan. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dikaji pengaruh penggunaan berbagai konsentrasi BAP (6-Benzil Amino Purin) dan 2,4-D (Dichlorophenoxyacetic Acid) terhadap induksi kalus secara *in vitro*. Adapun permasalahan yang ingin dikaji dari penelitian ini adalah berapa konsentrasi BAP dan 2,4-D yang tepat untuk menginduksi kalus jarak pagar.

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi BAP dan 2,4-D yang tepat untuk menginduksi kalus jarak pagar secara *in vitro*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Jarak pagar

Tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) merupakan tanaman asli Amerika Tengah yang saat ini telah menyebar ke seluruh dunia terutama daerah tropika (Makkar *et al.*, 1998 *cit.* Widyawati, 2010). Tanaman jarak pagar mulai banyak ditanam di Indonesia sejak masa penjajahan Jepang untuk membudidayakan tanaman jarak. Hasilnya yang berupa biji digunakan untuk membuat bahan bakar bagi pesawat-pesawat tempur Jepang. Oleh karenanya dalam waktu singkat tanaman jarak pagar menyebar cukup luas, khususnya di Jawa Tengah dan Jawa Timur. Wilayah Jawa Tengah meliputi daerah Semarang serta Solo dan sekitarnya. Sementara, wilayah Jawa Timur meliputi Madiun, Lamongan, Bojonegoro, Besuki, dan Malang. Dalam perkembangan selanjutnya, tanaman jarak pagar meluas sampai di Kawasan Indonesia Timur, seperti Nusa Tenggara, Sulawesi, dan sebagainya. Jadi, nama-nama lokal untuk jarak pagar dapat ditemukan di daerah-daerah (Nurcholis dan Sumarsih, 2007).

Jarak pagar termasuk famili Euphorbiaceae, satu famili dengan karet dan ubi kayu. Klasifikasi tanaman jarak pagar adalah sebagai berikut (Hambali *et al.*, 2006).

Divisio : Spermatophyta
Subdivisio: Angiospermae
Klasis : Dicotyledoneae
Ordo : Euphorbiales
Familia : Euphorbiaceae
Genus : *Jatropha*
Spesies : *Jatropha curcas* L.

Menurut Kusuma (2009), tanaman jarak pagar memiliki beberapa nama daerah (lokal) antara lain jarak budeg, jarak gundul, arak cina (Jawa); baklawah, nawaih (NAD); dulang (Batak); jarak kosta (Sunda); jarak kare (Timor); peleng kaliki (Bugis); kalekhe paghar (Madura); jarak pager (Bali);

lulu mau, paku kase, jarak paged (Nusa Tenggara); kuman nema (Alor); jarak kosta, jarak wolanda, bindalo, bintalo, tondo utomene (Sulawesi); dan ai huwa kamala, balacai, kadoto (Maluku). Tanaman jarak pagar termasuk perdu dengan tinggi 1-7 m, bercabang tidak teratur. Batangnya berkayu, silindris dan bila terluka akan mengeluarkan getah.

Jarak pagar tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian sekitar 500 mdpl. Curah hujan yang sesuai untuk tanaman jarak pagar adalah 625 mm/tahun. Namun, tanaman ini dapat tumbuh pada daerah dengan curah hujan antara 300–2.380 mm/tahun. Kisaran suhu yang sesuai untuk tanaman jarak adalah 20–26°C. Pada daerah dengan suhu terlalu tinggi (di atas 35°C) atau terlalu rendah (di bawah 15°C) akan menghambat serta mengurangi kadar minyak dalam biji dan mengubah komposisinya (Hambali *et al.*, 2006).

Biasanya jarak pagar ditanam sebagai tanaman hias atau tanaman pagar yang serba guna, meskipun manfaatnya yang paling menonjol adalah sebagai tanaman obat. Para pakar botani menggolongkannya sebagai tanaman perdu. Tingginya biasanya 3-6 meter, terkadang juga bisa mencapai tinggi lebih dari itu pada lahan yang subur dan perkembangannya tidak terganggu (terutama oleh manusia). Daunnya biasanya berlekuk 3-5, terkadang ada yang sampai 7. Lekukan bisa dangkal atau agak dalam. Panjang helaiannya 10-19 cm, urat daun menjari, warna helaian daun hijau muda sampai hijau tua polos. Warna pucuk daun kebanyakan hijau muda tetapi ada juga yang kecoklatan atau kemerahan. Kedudukan daun berselang-seling, sekilas seperti berhadapan melingkari batang (spiral). Bunganya muncul di bagian ujung batang, pada ketiak daun. Panjang tangkai bunga 3-12 cm. Bunga jantan dan betina terpisah, terdapat di ujung-ujung tangkai bunga. Bunga betina sedikit lebih besar dibandingkan dengan jantan. Bunganya berwarna kuning kehijauan (Prana, 2006).

Menurut penelitian Saparni (2007), jumlah cabang primer jarak pagar antara lima sampai delapan. Berdasarkan bunga yang dimiliki, tanaman jarak pagar dapat dibedakan atas tiga macam. Karakter pertama, tanaman hanya memiliki bunga jantan saja. Karakter kedua, tanaman memiliki bunga jantan

dan betina dalam satu tanaman. Karakter ketiga, tanaman memiliki bunga jantan dan hermaphrodith dalam satu tanaman. Jumlah kapsul per pohon antara 3 sampai 72 kapsul. Bentuk kapsul bulat, oblong, dan *ovoid*. Jumlah biji per kapsul tiga, berat kering rata-rata 20 biji antara 9 sampai 15 kg.

Sumanto (2005), menyebutkan kelebihan minyak jarak pagar dibanding dengan solar adalah pada minyak jarak pagar banyak terdapat oksigen sehingga pembakarannya sempurna. Hal ini menimbulkan gas buangan yang lebih bersih dan tidak berbahaya. Sementara solar tidak memiliki oksigen sehingga gas buangnya berkarbon monoksida, berasap, kotor, dan berbahaya.

B. Kultur *In Vitro*

Kultur jaringan didefinisikan sebagai suatu teknik menumbuhkembangkan bagian tanaman, baik berupa sel, jaringan, atau organ dalam kondisi aseptik secara *in vitro*, yang dicirikan oleh kondisi kultur yang aseptik, penggunaan media kultur buatan dengan kandungan nutrisi lengkap dan ZPT (Zat Pengatur Tumbuh) serta kondisi ruang kultur yang suhu dan pencahayaannya terkontrol (Yusnita, 2004).

Pengetahuan yang baik tentang kebutuhan hara sel dan jaringan yang dikulturkan akan mempengaruhi keberhasilan dalam teknologi serta penggunaan metode *in vitro*. Hara yang terdapat dalam media terdiri atas komponen utama meliputi garam mineral, sumber karbon (gula), vitamin dan zat pengatur tumbuh (Wetter dan Constabel, 1991).

Aplikasi kultur jaringan pada awalnya ialah untuk propagasi tanaman. Selanjutnya penggunaan kultur jaringan lebih berkembang lagi yaitu untuk menghasilkan tanaman yang bebas penyakit, koleksi plasma nutfah, memperbaiki sifat genetika tanaman, produksi dan ekstraksi zat-zat kimia yang bermanfaat dari sel-sel yang dikulturkan (George dan Sherrington, 1984).

Sifat kompeten, dediferensiasi dan determinasi sel atau jaringan eksplan sangat penting agar terjadi organogenesis atau embriogenesis pada eksplan. Suatu sel atau jaringan dikatakan kompeten jika sel atau jaringan

tersebut mampu memberikan tanggapan terhadap signal lingkungan atau signal hormonal. Bentuk tanggapannya berupa pertumbuhan dan perkembangan diri yang mengarah ke proses organogenesis atau embriogenesis. Eksplan yang dikondisikan di lingkungan dengan penambahan ZPT yang cocok akan menjadi kompeten untuk membentuk organ atau embrio. Istilah lain proses ini adalah induksi (inductive event). Dediferensiasi adalah berubah kembalinya fungsi sel-sel yang tadinya sudah terdiferensiasi menjadi tidak terdiferensiasi. Sedangkan determinasi adalah ditentukan nasibnya. Contohnya, sel atau jaringan eksplan yang dikulturkan terdeterminasi menjadi organ atau embrio (Yusnita, 2004).

Perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan (*in vitro*) menawarkan peluang besar untuk menghasilkan jumlah bibit tanaman yang banyak dalam waktu relatif singkat sehingga lebih ekonomis. Teknik perbanyakan tanaman ini dapat dilakukan sepanjang waktu tanpa tergantung musim. Selain itu, perbanyakan tanaman dengan teknik *in vitro* mampu mengatasi kebutuhan bibit dalam jumlah besar, serentak, dan bebas penyakit sehingga bibit yang dihasilkan lebih sehat serta seragam. Oleh sebab itu, kini perbanyakan tanaman secara kultur jaringan merupakan teknik alternatif yang tidak dapat dihindari bila penyediaan bibit tanaman harus dilakukan dalam skala besar dan dalam waktu relatif singkat (Hambali *et al.*, 2006).

Teknik kultur *in vitro* mempunyai keuntungan diantaranya menghemat waktu dan tenaga (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Keuntungan lain yang dapat diperoleh menurut Suryowinoto (1996) adalah tidak tergantung musim, dapat diproduksi dalam jumlah cukup banyak dengan kondisi terkontrol dan dapat diproduksi sesuai dengan kebutuhan.

C. Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. Zat pengatur tumbuh dapat dibagi menjadi beberapa golongan yaitu golongan auksin, sitokinin, giberelin dan

inhibitor. 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 Kinaetin, Zeatin, Ribosil dan Bensil Aminopurin (BAP). Sedangkan golongan giberelin adalah GA1, GA2, GA3, GA4, dan golongan inhibitor adalah fenolik dan asam absisik (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan dalam kultur jaringan adalah auksin dan sitokinin. Salah satu zat pengatur tumbuh yang digolongkan auksin adalah asam 2,4-D. Peran auksin adalah merangsang pembelahan dan perbesaran sel yang terdapat pada pucuk tanaman dan menyebabkan pertumbuhan pucuk-pucuk baru. Penambahan auksin dalam jumlah yang lebih besar, atau penambahan auksin yang lebih stabil, seperti asam 2,4-D cenderung menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi pucuk tanaman (Wetherell, 1987). Pemakaian zat pengatur tumbuh asam 2,4-D biasanya digunakan dalam jumlah kecil dan dalam waktu yang singkat, antara 2-4 minggu karena merupakan auksin kuat, artinya auksin ini tidak dapat diuraikan di dalam tubuh tanaman (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Sebab pada suatu dosis tertentu asam 2,4-D sanggup membuat mutasi-mutasi (Suryowinoto, 1996).

Sitokinin adalah senyawa yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sama halnya dengan kinetin (6-furfurylaminopurine) (Zulkarnain, 2009). Sitokinin berperan merangsang pertumbuhan sel dalam jaringan yang disebut eksplan dan merangsang pertumbuhan tunas daun (Wetherell, 1987).

Penentuan ZPT yang akan digunakan memerlukan pengetahuan tentang cara menghitung dosisnya. Hal ini sangat penting karena apabila perhitungannya keliru dapat berakibat fatal bagi pertumbuhan jaringan. ZPT dengan dosis yang terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan kalus (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Pada umumnya media perbanyakan *in vitro* yang menggunakan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin, seperti BAP

merupakan salah satu zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan untuk memacu pembentukan tunas dengan daya aktivitas yang kuat mendorong proses pembelahan sel (George dan Sherrington, 1984).

Salah satu jenis ZPT dari golongan sitokinin yang sering dipakai dalam kultur jaringan yaitu BAP (6-benzylaminopurine). Menurut George & Sherrington (1984) 6-Benzilaminopurine (BAP) merupakan salah satu sitokinin sintetik yang aktif dan daya merangsangnya lebih lama karena tidak mudah dirombak oleh enzim dalam tanaman. Menurut Noggle dan Fritz (1983) BAP memiliki struktur yang mirip dengan kinetin dan juga aktif dalam pertumbuhan dan proliferasi kalus, sehingga BAP merupakan sitokinin yang paling aktif.

Menanam organ tanaman dalam media dengan penambahan 2,4-D menyebabkan pada kalus akan terbentuk tunas dan akar. Tetapi, 2,4-D ini mempunyai kelemahan juga, sebab tanaman yang dibudidayakan dapat mengalami mutasi sehingga terjadi banyak variasi genetik. Untuk tujuan cloning hal ini tentu saja merugikan, tetapi apabila tujuannya untuk mendapatkan variabel pada tanaman umur pendek, maka penambahan dengan 2,4-D dosis tinggi dapat ditempuh (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Secara umum diketahui bahwa auksin dalam konsentrasi tinggi mendorong embrio somatik secara efektif. Hasil pada embriogenesis somatik langsung telah menunjukkan bahwa BAP sangat penting untuk menginduksi embriogenesis somatik dari kotiledon eksplan *J. curcas*. Namun, Ramasamy *et al.*, (2005) *cit.* Kalimuthu *et al.*, (2007) melaporkan bahwa auksin dalam kombinasi dengan sitokinin sangat mempengaruhi frekuensi dan juga memiliki dampak yang signifikan terhadap pematangan embrio somatik. Embrio somatik ialah embrio yang berasal dari sel-sel somatik (tidak merupakan hasil peleburan gamet jantan dan gamet betina).

Pada penelitian Nofiyanti (2007) menyatakan bahwa perlakuan IBA dan BA mampu menumbuhkan tunas dan daun *Jatropha curcas* L., tetapi tidak mampu menumbuhkan akar, demikian halnya dengan kalus juga tidak berkembang. Sedangkan pada penelitian Hanifah (2007) mengungkapkan

bahwa induksi kalus tercepat terdapat pada media dengan penambahan NAA 0,5 ppm dan BAP 1 ppm (N2B2) dan penambahan NAA 0,5 ppm dan BAP 2 ppm (N2B3).

D. Hipotesis

Diduga penggunaan BAP dan 2,4-D berpengaruh terhadap induksi kalus jarak pagar secara *in vitro*.



III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli sampai Agustus 2010 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta.

B. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah pucuk tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) yang berasal dari biji yang dikecambahkan secara steril. Bahan kimia yang akan digunakan dalam penelitian ini meliputi media *Murashige and Skoog* (MS), zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4-D, agar-agar, gula, aquadest, sabun cuci, chlorox, spirtus, dan alkohol 70%.

2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah botol kultur, bunsen, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), petridish, peralatan diseksi (pinset besar, pinset kecil, dan pisau *scalpel*), timbangan analitik, plastik *prophopilen* (PP) 0,3 mm, *hand sprayer*, karet gelang, *magnetik stirer*, *hot plate*, labu takar, *beker glass*, erlenmeyer, pH meter, *autoclave*, pipet ukur, aluminium foil, kertas label, *oven*, lemari pendingin, dan rak kultur.

C. Cara Kerja Penelitian

1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial dengan dua faktor perlakuan, yaitu :

a. Faktor pertama yaitu konsentrasi BAP yang terdiri atas 4 taraf, yaitu :

B₁ = Perlakuan dengan penambahan BAP 0,5 ppm

B₂ = Perlakuan dengan penambahan BAP 1 ppm

B₃ = Perlakuan dengan penambahan BAP 1,5 ppm

B₄ = Perlakuan dengan penambahan BAP 2 ppm

b. Faktor kedua yaitu konsentrasi 2,4-D yang terdiri atas 4 taraf, yaitu :

D₁ = Perlakuan tanpa penambahan 2,4-D (0 ppm)

D₂ = Perlakuan dengan penambahan 2,4-D 0,25 ppm

D₃ = Perlakuan dengan penambahan 2,4-D 0,5 ppm

D₄ = Perlakuan dengan penambahan 2,4-D 0,75 ppm

Dengan demikian diperoleh 16 kombinasi perlakuan dan masing-masing diulang sebanyak tiga kali.

2. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini meliputi:

(1) Sterilisasi Alat

Peralatan meliputi botol kultur, *scalpel*, *petridish*, dan pinset dicuci dengan menggunakan sabun cuci, dibilas, kemudian dikeringkan. Alat-alat yang sudah kering dibungkus dengan kertas koran (kecuali botol kultur). Semua alat tersebut disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121⁰C dan tekanan 1,5 Psi (kg/cm²) selama 45 menit.

(2) Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok dilakukan dengan cara menimbang bahan-bahan kimia, hara makro, hara mikro, serta ZPT sesuai komposisi media MS (Lampiran 1). Bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan aquadest steril lalu diaduk hingga benar-benar homogen menggunakan *magnetic stirrer*, lalu dimasukkan ke dalam botol yang diberi label (sesuai dengan perlakuannya) dan disimpan dalam lemari pendingin.

(3) Pembuatan media tanam

Pembuatan media dengan mengambil dan menakar masing-masing larutan stok sesuai dengan perlakuan dan ukuran yang telah ditentukan kemudian memasukkannya ke dalam labu takar. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan aquadest sampai volume larutan

mencapai 250 ml ($\frac{1}{4}$ liter). Kemudian ditambahkan gula sebanyak 7,5 g. Larutan dimasukkan dalam *beker glass* dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirer*. Larutan dikondisikan pada pH 6,3 dengan menambahkan NaOH bila pH terlalu rendah dan bila pH terlalu tinggi ditambahkan dengan HCl. Kemudian larutan ditambahkan agar-agar sebanyak 2 g. Larutan tersebut diaduk serta dididihkan dengan menggunakan *magnetic stirer* dan *hot plate*. Setelah mendidih, larutan tersebut dituangkan ke botol kultur \pm 25 ml setiap botolnya. Botol ditutup dengan plastik PP 0,3 mm dan diikat dengan karet. Media disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C , tekanan $1,5 \text{ kg/cm}^3$ selama 45 menit. Setelah itu, botol-botol ditempatkan pada rak-rak kultur.

(4) Pengecambahan biji

Pengecambahan biji dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) yang telah dibersihkan terlebih dahulu dengan spirtus. Sebelum dikecambahkan, biji dicuci terlebih dahulu dengan menggunakan air sabun dan dibilas hingga bersih. Kemudian kulit biji dikupas dengan menggunakan tang.

Penanaman diawali dengan mendekatkan mulut botol kultur dengan lampu bunsen. Selama penanaman mulut botol harus berada dekat dengan lampu bunsen guna mencegah kontaminasi. Biji disterilisasi dengan larutan chlorox 100% selama 1 menit. Setelah itu, biji dibuka dan diambil embrionya dengan menggunakan pinset dan *scalpel*. Lalu menanamnya pada media MS tanpa ZPT. Botol ditutup dengan aluminium foil dan melapisinya dengan plastik PP 0,3 mm. Botol-botol yang telah ditanam diberi label sesuai tanggal penanaman.

(5) Penanaman eksplan

Eksplan yang digunakan adalah bagian pucuk tanaman berumur 11 hari yang telah dikecambahkan secara steril. Penanaman eksplan dilakukan dengan cara mengambil tanaman dari botol dengan pinset lalu meletakkannya pada petridish, pucuk tanaman siap

dipotong dengan menggunakan *scalpel*. Bagian mulut botol dipanaskan terlebih dahulu dengan lampu bunsen untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Kemudian ekplan ditanam pada media perlakuan dengan pinset steril. Untuk menjaga sterilisasi dari alat, maka *scalpel* dan pinset selalu dipanaskan sebelum digunakan. Sebelum ditutup, mulut botol dipanaskan kembali. Setelah itu, botol ditutup dengan aluminium foil dan melapisinya dengan plastik PP 0,3 mm. Botol diberi label sesuai perlakuan dan tanggal penanamannya.

(6) Pemeliharaan

Pemeliharaan botol-botol kultur dilakukan dengan cara meletakkan pada rak-rak kultur. Untuk mencegah kontaminasi, botol-botol tersebut disemprot dengan spirtus setiap dua hari sekali.

3. Variabel Penelitian

a. Saat Muncul Kalus

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menghitung hari saat muncul kalus pertama kali yang dinyatakan dalam HST (hari setelah tanam). Ditandai dengan adanya pembengkakan atau munculnya jaringan berwarna putih kehijauan pada permukaan eksplan.

b. Warna Kalus

Pengamatan warna kalus dilakukan pada akhir pengamatan (30 HST) dengan mengamati secara visual. Penentuan warna kalus ditetapkan berdasarkan skoring :

0 : putih

1 : hijau keputihan

2 : hijau kekuningan

3 : hijau

4 : hijau kecoklatan

c. Tekstur Kalus

Pengamatan tekstur kalus dilakukan pada akhir pengamatan (30 HST) dengan mengamati tekstur kalus yang terbentuk, apakah termasuk kalus yang kompak atau remah.

d. Saat Muncul Akar

Pengamatan saat muncul akar dilakukan dengan menghitung hari sejak penanaman sampai muncul akar, dinyatakan dalam HST. Ditandai dengan adanya tonjolan-tonjolan putih kekuningan (± 2 mm) pada permukaan eksplan bagian bawah.

e. Jumlah Akar

Jumlah akar diamati dengan cara menghitung total akar dalam setiap eksplan yang tumbuh, dilakukan pada akhir pengamatan (30 HST).

f. Saat Muncul Tunas

Pengamatan saat muncul tunas dilakukan dengan menghitung hari saat muncul tunas pertama kali, dinyatakan dalam HST. Terbentuknya tunas ditandai dengan adanya tonjolan berwarna putih kehijauan (± 2 mm) pada permukaan eksplan bagian atas.

g. Jumlah Tunas

Jumlah tunas diamati pada akhir pengamatan (30 HST), dilakukan dengan menghitung jumlah tunas yang muncul dari permukaan eksplan.

h. Saat Muncul Daun

Pengamatan saat munculnya daun dilakukan dengan metode penelitian yang sama dengan Nofiyanti (2007) yaitu menghitung jumlah hari sejak penanaman sampai terbukanya daun secara sempurna. Dinyatakan dalam HST.

i. Jumlah Daun

Jumlah daun diamati dengan cara menghitung total daun dalam setiap eksplan yang tumbuh, dilakukan pada akhir pengamatan (30 HST).

j. Berat Segar Kalus

Variabel ini diamati pada akhir pengamatan (30 HST). Berat segar kalus diukur dengan cara menimbang pada timbangan analitik

berat segar kalus beserta botol kultur lengkap dengan penutupnya dikurangi dengan berat botol kultur (tanpa kalus) dan penutupnya.

$$WW = WW_t - WW_o$$

Keterangan: WW : berat segar kalus (g)

WW_t: berat segar kalus+botol kultur+penutup (g)

WW_o: berat botol kultur+penutup (g)

4. Analisis Data

Analisis kualitatif meliputi data visual yang dianalisis dengan menggunakan metode deskriptif. Sedangkan data kuantitatif dianalisis dengan menggunakan analisis ragam berdasarkan uji F taraf 5% dan apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji DMRT taraf 5%.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

E. Saat Muncul Kalus

Salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro* adalah munculnya kalus pada eksplan. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) kalus merupakan sel-sel yang belum terdeferensiasi yang terbentuk pada salah satu atau seluruh irisan eksplan. Pada penelitian ini, kalus pertama kali terbentuk pada ujung eksplan yang kontak dengan media. Diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian kalus muncul pada dasar eksplan berwarna kehijauan. Menurut Hartmann *et al.* (1990) *cit.* Dwiyono (2009), kalus yang dihasilkan melalui propagasi secara *in vitro* terbentuk karena adanya pelukaan pada jaringan dan respon terhadap hormon. Rata-rata saat muncul kalus eksplan jarak pagar pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D disajikan dalam Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Saat muncul kalus eksplan jarak pagar pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D secara *in vitro* (HST)

BAP (ppm)	2,4-D (ppm)			
	0	0,25	0,5	0,75
0,5	~	6	6	7
1	~	6	6	6
1,5	~	6	6,33	6,33
2	~	5,67	6	6,33

Keterangan : ~) = tidak muncul kalus, HST= hari setelah tanam, ppm = part per million (mg/l)

Tabel 1 menunjukkan bahwa kalus terinduksi pada hampir semua perlakuan. Auksin umumnya ditambahkan ke dalam nutrisi media untuk menginduksi kalus dari eksplan (George dan Sherrington, 1984). Pada penelitian ini, kalus tidak terbentuk pada eksplan yang tidak diberi tambahan 2,4-D. Kalus yang tidak muncul ini dimungkinkan karena auksin endogen pada eksplan jarak pagar belum mampu menginduksi kalus, dengan kata lain eksplan mempunyai kandungan auksin yang rendah, sehingga masih membutuhkan tambahan auksin eksogen pada media kultur. Seperti yang dikatakan oleh Pierik (1987) bahwa auksin dikenal sebagai hormon yang

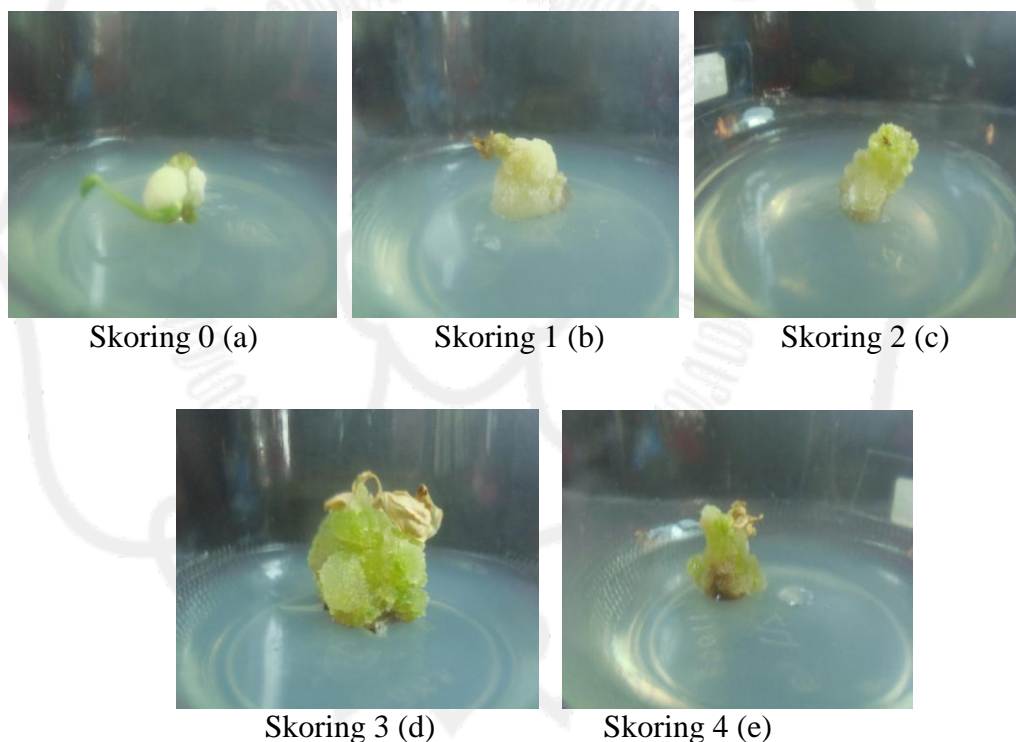
mampu berperan menginduksi kalus. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Klaus dan Haensch (2007) bahwa kombinasi tanpa 2,4-D tidak menunjukkan apapun embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik adalah proses terbentuknya embrio yang berasal dari sel-sel somatik (tidak merupakan hasil dari peleburan gamet jantan dan gamet betina). Eksplan sering mati atau tidak mengalami perubahan. Sebagian dari eksplan tersebut membentuk sedikit kalus.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan B4D2 (BAP 2 ppm dan 2,4-D 0,25 ppm) mampu menginduksi kalus tercepat yaitu pada 5,67 HST. Hal ini selaras dengan penelitian Hanifah (2007), pada perlakuan NAA 0,5 ppm dan BAP 1 ppm dan perlakuan NAA 0,5 ppm dan 2 ppm memberikan saat muncul kalus tercepat yaitu 13,33 HST. Walaupun auksin dikenal sebagai hormon yang mampu berperan menginduksi kalus namun sitokinin sering pula digunakan sebagai bahan kombinasi untuk induksi kalus.

Menurut Gustian (2009), secara umum penambahan auksin pada konsentrasi rendah akan memacu pembentukan kalus, sebaliknya jika perbandingan auksin dan sitokinin di dalam media lebih tinggi akan memacu eksplan kalus beregenerasi membentuk organ. Selain itu, Tabel 1 menunjukkan bahwa induksi kalus terlama diperoleh pada perlakuan B1D4 (BAP 0,5 ppm dan 2,4-D 0,75 ppm) yaitu pada 7 HST. Hal ini diduga karena konsentrasi 2,4-D yang diberikan pada eksplan termasuk tinggi sehingga menghambat pertumbuhan kalus pada eksplan. Pada kadar yang tinggi, auksin lebih bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Terhambatnya pertumbuhan kalus tersebut dikarenakan massa kultur yang ditumbuhkan terlalu lama dalam media yang tetap menyebabkan terjadinya kehabisan hara dan air. Kehabisan hara dan air dapat terjadi karena selain terhisap untuk pertumbuhan juga karena media menguapkan air dari masa ke masa. Selain kehabisan unsur hara, kalus juga mengeluarkan persenyawaan-persenyawaan hasil metabolisme yang akhirnya akan menghambat pertumbuhan kalus itu sendiri (Anonim, 2010).

F. Warna Kalus

Indikator pertumbuhan eksplan pada budidaya *in vitro* berupa warna kalus menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui apakah suatu kalus masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda. Kualitas kalus yang baik memiliki warna yang hijau. Menurut Fatmawati (2008), warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik.



Gambar 1. Kategori skoring warna kalus pada eksplan jarak pagar (a) kalus berwarna putih (b) kalus berwarna hijau keputihan (c) kalus berwarna hijau kekuningan (d) kalus berwarna hijau (e) kalus berwarna hijau kecoklatan.

Tabel 2. Warna kalus eksplan jarak pagar pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D secara *in vitro*

BAP (ppm)	2,4-D (ppm)			
	0	0,25	0,5	0,75
0,5	~	hijau kekuningan	hijau kekuningan	hijau kecoklatan
1	~	hijau keputihan	hijau kekuningan	hijau kecoklatan
1,5	~	hijau kekuningan	hijau kekuningan	hijau kekuningan
2	~	hijau kekuningan	hijau kekuningan	hijau kekuningan

Keterangan : ~) = tidak muncul kalus, ppm= part per million (mg/l)

Gambar 1 menunjukkan bahwa warna yang terlihat pada kalus *J. curcas* memiliki rentang mulai dari putih (ditunjukkan oleh skoring 0) hingga hijau kecoklatan (ditunjukkan oleh skoring 4). Berdasarkan tabel 2, warna kalus yang terlihat berkisar antara hijau keputihan, hijau kekuningan dan hijau kecoklatan. Perbedaan warna kalus menunjukkan bahwa tingkat perkembangan kalus berbeda-beda. Hampir semua perlakuan menunjukkan warna hijau kekuningan pada kalus yang terbentuk. Menurut Hanifah (2007), pada penambahan sitokinin dengan konsentrasi yang semakin meningkat cenderung menunjukkan warna hijau (cerah) pada kalus lebih tahan lama. Warna hijau pada kalus adalah akibat efek sitokinin dalam pembentukan klorofil. Sedangkan warna kalus hijau keputihan ditunjukkan pada perlakuan BAP 1 ppm dan 2,4-D 0,25 ppm.

Warna kalus hijau kecoklatan terdapat pada perlakuan 2,4-D 0,75 ppm yang ditambahkan BAP 0,5 ppm dan BAP 1 ppm. Warna kalus yang semakin gelap (menjadi coklat) berarti pertumbuhan kalus semakin menurun. Dalam penelitian ini, kalus yang berwarna hijau kecoklatan dihasilkan pada media yang mengandung 2,4-D dengan konsentrasi yang terbilang tinggi. Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian Dwiyono (2009) bahwa penambahan 2,4-D yang semakin meningkat dapat menyebabkan peningkatan terbentuknya kalus dengan warna coklat tanaman mahkota dewa.

Warna kecoklatan pada kalus (*browning*) ini akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat toksik, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan, yang menghambat pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kematian jaringan (Yusnita, 2004). Santoso dan Nursandi

(2004) menyatakan bahwa peristiwa pencoklatan tersebut sesungguhnya merupakan suatu peristiwa alamiah dan proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik seperti pengupasan, dan pemotongan. Gejala pencoklatan merupakan tanda-tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan. Selain menandakan terjadinya sintesis senyawa fenol, warna coklat disebabkan oleh semakin bertambahnya umur sel atau jaringan kalus. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Palupi *et al.* (2004), bahwa kalus yang berwarna coklat merupakan kalus yang mengalami proses penuaan (*senescensi*) sel, hal ini disebabkan karena tidak adanya BA dalam media sehingga mempercepat terjadinya proses penuaan (*senescensi*) sel. Konsentrasi tinggi 2,4-D dan BA (2,4-D 1,0 mg/l dan BA 1,0 mg/l) mampu memacu terjadinya proses penuaan yang dapat menghambat proses pertumbuhan kalus.

G. Tekstur Kalus

Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai kualitas suatu kalus. Kalus yang baik diasumsikan memiliki tekstur remah (*friable*). Tekstur kalus yang remah dianggap baik karena memudahkan dalam pemisahan menjadi sel-sel tunggal pada kultur suspensi, di samping itu akan meningkatkan aerasi oksigen antar sel. Dengan demikian, dengan tekstur tersebut upaya untuk perbanyakkan dalam hal jumlah kalus yaitu melalui kultur suspensi lebih mudah. Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam, yaitu : kompak (*non friable*), intermediet dan remah (*friable*) (Turhan, 2004). Secara visual, kalus remah yang terbentuk pada eksplan *J. curcas* ikatan antar selnya tampak renggang, mudah dipisahkan dan jika diambil dengan pinset, kalus mudah pecah dan ada yang menempel pada pinset. Kalus yang kompak mempunyai tekstur yang sulit untuk dipisahkan dan terlihat padat (Fitriani, 2008). Sedangkan kalus yang sebagian bertekstur kompak dan remah disebut kalus intermediet (Widiarso, 2010). Tekstur kalus yang terbentuk pada eksplan jarak pagar pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Tekstur kalus eksplan jarak pagar pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D secara *in vitro*

BAP (ppm)	2,4-D (ppm)			
	0	0,25	0,5	0,75
0,5	~	remah	remah	Remah
1	~	remah	remah	remah
1,5	~	remah	remah	remah
2	~	remah	remah	remah

Keterangan : ~) = tidak muncul kalus, ppm = part per million (mg/l)

Pierik (1987) menyatakan tekstur pada kalus dapat bervariasi dari kompak hingga meremah, tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi media, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan kultur. Hasil pada Tabel 3 menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan yang digunakan membentuk kalus bertekstur remah, kecuali pada perlakuan tanpa 2,4-D. Menurut Fatmawati (2008), kalus yang sebagian besar bertekstur remah pada eksplan daun *A. annua* disebabkan oleh penggunaan 2,4-D dalam media kultur. Hal serupa juga diperoleh pada penelitian Ratnadewi (1991) dan Fatmawati (2008), auksin 2,4-D yang dipadukan dengan kinetin 1 mg/l dipakai untuk menginduksi pembentukan dan perbanyakan kalus *friable* pada tanaman tebu. Terbentuknya kalus yang bertekstur remah menurut Widyawati (2010) dipacu oleh adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan yang telah tumbuh membentuk kalus tersebut.

H. Saat Muncul Akar

Keberadaan akar bagi pertumbuhan tanaman memegang peranan sangat penting, sebab akar langsung berkolaborasi dengan media tanam yang tersimpan nutrisi di dalamnya. Zulkarnain (2009) mengatakan bahwa akar berfungsi sebagai alat untuk menyerap unsur hara dan nutrisi serta sebagai penopang tubuh tanaman. Selain itu, akar juga berfungsi sebagai pengangkut dan tempat penyimpanan makanan seperti pada wortel, bit gula dan ubi jalar. Kehadiran akar sangat dibutuhkan tanaman, oleh karena itu pada pembiakan vegetatif termasuk kultur jaringan, dilakukan berbagai upaya untuk membentuk perakaran. Saat muncul akar pada eksplan jarak pagar pada

berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D secara *in vitro* disajikan dalam Tabel 4 berikut ini.

Tabel 4. Saat muncul akar pada eksplan jarak pagar pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D secara *in vitro* (HST)

BAP (ppm)	2,4-D (ppm)			
	0	0,25	0,5	0,75
0,5	~	~	~	~
1	9	~	~	~
1,5	~	~	~	~
2	~	~	~	~

Keterangan : ~) = tidak muncul kalus, ppm= part per million (mg/l), HST=hari setelah tanam

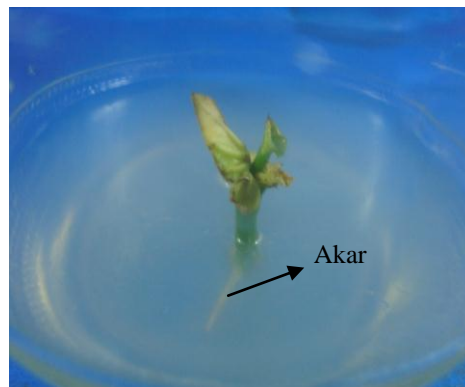
Tabel 4 menunjukkan bahwa perlakuan BAP 1 ppm tanpa pemberian 2,4-D telah mampu memunculkan akar. Pada penelitian ini, pembentukan akar hanya terjadi pada kombinasi perlakuan B2D1 (BAP 1 ppm, 2,4-D 0 ppm) pada 9 HST. Sebagian besar eksplan tidak mampu menumbuhkan akar. Hal ini diduga bahwa dengan penambahan 2,4-D pada media kultur, eksplan lebih terfokus pada induksi kalus daripada memunculkan akar. Selain itu, hal ini kemungkinan terjadi karena konsentrasi auksin (2,4-D) yang diberikan dalam media kurang tinggi. Dilihat dari kombinasi perlakuan pada penelitian ini, rasio konsentrasi auksin dan sitokinin rendah, sehingga pada perlakuan tersebut tidak dapat memunculkan akar. Hal ini selaras dengan pernyataan Yunus *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa apabila rasio konsentrasi auksin dengan sitokinin rendah, maka perlakuan tersebut tidak mampu menumbuhkan akar. Terlihat bahwa perlakuan yang memunculkan akar adalah perlakuan yang memiliki perbandingan auksin dan sitokinin yang tinggi antara lain IBA 0 ppm dan BA 3 ppm, IBA 0,25 ppm dan BA 1 ppm, serta IBA 0,5 ppm dan BA 1 ppm. Hal ini menyimpang dari pendapat Wetherell (1982) bahwa untuk pembentukan akar diperlukan perbandingan auksin dan sitokinin yang rendah. Penyimpangan ini terjadi kemungkinan karena zat tumbuh endogen (auksin endogen) yang terdapat dalam eksplan pada perlakuan tersebut sudah cukup tersedia.

Dalam organogenesis terdapat tiga kemungkinan yang dapat menyebabkan eksplan gagal berorganogenesis. Pertama, sel-sel pada eksplan kekurangan totipotensi. Totipotensi adalah *total genetic potential*, yaitu bahwa setiap sel tumbuhan yang hidup dilengkapi dengan perangkat genetik dan fisiologis yang lengkap untuk dapat ditumbuhkan menjadi tanaman utuh, jika kondisinya sesuai. Kedua, sel-sel pada eksplan tidak mampu berdiferensiasi dan berdediferensiasi karena kurangnya rangsangan induksi esensial setiap jenis atau konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tidak tepat (Tripepi, 1997 *cit.* Prihatmanti dan Mattjik, 2004).

I. Jumlah Akar

Jumlah akar yang banyak dapat mengoptimalkan penyerapan nutrisi yang ada pada media kultur. Nickell (1982) *cit.* Rahmaniari (2007) menyatakan bahwa auksin aktif yang digunakan untuk pembentukan akar adalah Naphthalene acetic acid (NAA) dan Indol Buteric acid (IBA). Beberapa jenis lain yang dapat digunakan adalah 2,4-D dan 2,4,5-T. Kedua jenis tersebut membentuk akar jika digunakan pada konsentrasi rendah. Tipe sistem perakaran yang dihasilkan juga tergantung dari zat pengatur tumbuh yang digunakan. Asam phenoxy pada 2,4-D dan 2,4,5-T menghasilkan sistem perakaran yang banyak, tebal dan kokoh. Sedangkan IBA menghasilkan sistem perakaran serabut yang kuat.

Pada penelitian ini, hanya kombinasi perlakuan tanpa 2,4-D dengan penambahan BAP 1 ppm yang mampu menumbuhkan akar. Akar yang dihasilkan pada penelitian ini hanya 1 akar tunggal. Pada eksplan batang, akar tidak selalu muncul pada bagian nodusnya (Rahmaniari, 2007) tetapi dapat juga muncul pada pangkal batang di dalam media (Gambar 2). Secara visual, akar yang terbentuk pada eksplan pucuk jarak pagar berwarna putih kekuningan tanpa bulu akar, tipis dan tidak kokoh. Seperti yang dinyatakan Rahmaniari (2007) bahwa pada perlakuan tanpa 2,4-D, akar yang terbentuk merupakan akar tunggal yang tipis dan tidak kokoh.



Gambar 2. Akar yang terbentuk pada eksplan jarak pagar pada kombinasi perlakuan B2D1 (BAP 1 ppm dan 2,4-D 0 ppm).

Sel-sel dalam eksplan diduga memiliki kemampuan untuk memproduksi auksin sendiri sehingga mampu mendorong proses metabolisme sel. Oleh karena itu, penambahan auksin pada media kultur akan menyebabkan interaksi yang tidak seimbang dengan auksin endogen dan tidak dapat menghasilkan jumlah akar yang lebih banyak (Mujiyanto, 2003 *cit.* Rahmaniari, 2007).

J. Saat Muncul Tunas

Tunas merupakan bagian tanaman yang diperoleh dari cara perbanyakan vegetatif, yang tumbuh dalam rangka melangsungkan keturunan pada tanaman tersebut. Terbentuknya tunas menunjukkan keberhasilan regenerasi eksplan yang diinokulasi pada media kultur jaringan. Kalus yang dihasilkan dari induksi kalus eksplan jarak pagar dapat berdiferensiasi membentuk tunas. Namun dalam penelitian ini, tidak semua kalus yang terbentuk mampu berdiferensiasi menjadi tunas, sehingga ada beberapa tunas yang terbentuk secara langsung. Semakin cepat muncul tunas maka semakin cepat pula dihasilkan bahan untuk perbanyakan tanaman. Rata-rata saat muncul tunas eksplan jarak pagar pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D disajikan dalam Tabel 5.

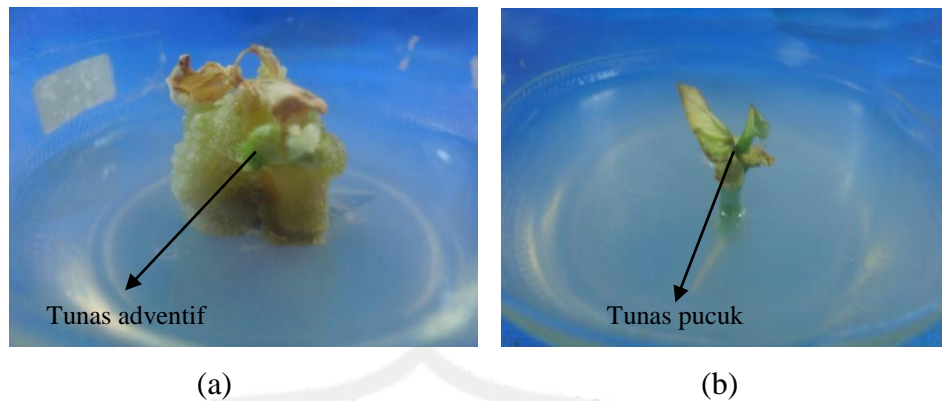
Tabel 5. Saat muncul tunas eksplan jarak pagar pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D secara *in vitro* (HST)

BAP (ppm)	2,4-D (ppm)			
	0	0,25	0,5	0,75
0,5	~	6	8	22
1	11	7	18	~
1,5	10	~	~	~
2	8	14	10,5	~

Keterangan : ~) = tidak muncul tunas, HST=hari setelah tanam, ppm = part per million (mg/l)

Berdasarkan Tabel 5 dapat diketahui bahwa rata-rata saat muncul tunas tercepat eksplan jarak pagar pada perlakuan pemberian BAP 0,5 ppm dengan penambahan 2,4-D 0,25 ppm yaitu 6 HST. Tunas yang dihasilkan pada perlakuan ini adalah tunas pucuk. Dari Tabel 5 juga terlihat bahwa pengaruh BAP dan 2,4-D memberikan respon yang berbeda-beda terhadap saat muncul tunas. Seperti yang dinyatakan oleh George dan Sherrington (1984) bahwa inisiasi tunas dan akar ditentukan oleh konsentrasi sitokinin dan auksin yang diberikan ke dalam media dan interaksinya dengan sitokinin atau auksin endogen yang dikandung oleh eksplan.

Pada perlakuan kombinasi BAP 0,5 ppm dan 2,4-D 0,75 ppm memberikan pengaruh paling lambat dalam merangsang kemunculan tunas yaitu pada 22 HST. Sedangkan eksplan jarak pagar pada perlakuan BAP 1 ppm, 1,5 ppm, dan 2 ppm yang ditambahkan dengan 2,4-D 0,75 ppm tidak memunculkan tunas. Hal ini berarti bahwa penambahan 2,4-D pada eksplan tidak mampu mempercepat saat muncul tunas. Seperti yang dikemukakan Hariyanti *et al.* (2004) bahwa pemberian auksin eksogen yang semakin meningkat, pengaruh hambatannya terhadap waktu pembentukan tunas semakin meningkat pula. Pada eksplan jarak pagar pada perlakuan BAP 1 ppm, 1,5 ppm, dan 2 ppm tanpa 2,4-D mampu memunculkan tunas. Pernyataan ini didukung oleh Nursetiadi (2008) bahwa auksin endogen yang terdapat pada eksplan telah mampu mendorong pembentukan tunas, sehingga hanya membutuhkan auksin yang tidak terlalu tinggi.



Gambar 3. Macam tunas yang terbentuk pada eksplan jarak pagar (a) tunas adventif (b) tunas pucuk.

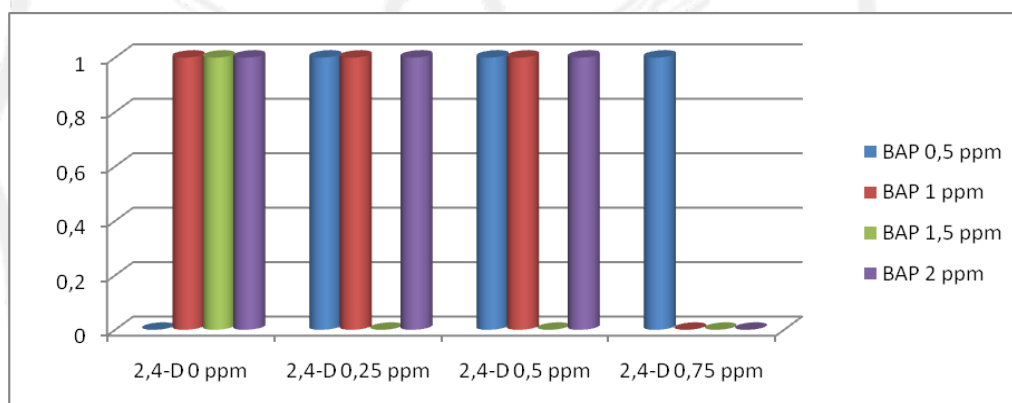
Tunas adventif juga muncul pada beberapa eksplan yang membentuk kalus. Tunas adventif merupakan tunas yang berasal dari sel atau jaringan eksplan yang sebelumnya tidak mempunyai mata tunas (Yusnita, 2004). Pada akhir pengamatan, terlihat adanya tonjolan-tonjolan (± 2 mm) berwarna hijau pada kalus yang telah terbentuk (Gambar 3a). Tonjolan-tonjolan tersebut merupakan tunas adventif yang akan tumbuh menjadi tunas baru. Tunas adventif muncul pada perlakuan kombinasi BAP 0,5 ppm dan 2,4-D 0,75 ppm, BAP 2 ppm dan 2,4-D 0,25 ppm, BAP 1 ppm dan 2,4-D 0,5 ppm, serta BAP 2 ppm dan 2,4-D 0,5 ppm. Terbentuknya tunas adventif ini diduga adanya pengaruh dari penambahan sitokinin dalam hal ini adalah BAP ke dalam media kultur. Sesuai dengan pendapat Yusnita (2004) yang menyatakan bahwa sitokinin dapat merangsang pembentukan tunas adventif. Namun, George dan Sherrington (1984) menyatakan bahwa terbentuknya tunas adventif dipengaruhi oleh adanya interaksi antara auksin dan sitokinin.

Hariyanti *et al.* (2004) melaporkan bahwa pemberian auksin eksogen yang semakin meningkat, pengaruh hambatannya terhadap waktu pembentukan tunas semakin meningkat pula. Namun, pada penelitian ini terlihat bahwa dengan meningkatnya konsentrasi 2,4-D, pengaruh hambatannya terhadap saat kemunculan tunas terlihat bervariasi (Tabel 5). Hal ini dimungkinkan bahwa di dalam eksplan telah terkandung auksin endogen yang kadarnya tidak persis sama. Keseragaman ukuran dan cara pengambilan eksplan kemungkinan besar tidak diikuti dengan keseragaman hormon

endogen tanaman sehingga penambahan auksin eksogen ke dalam media kultur akan menimbulkan respon yang bervariasi.

K. Jumlah Tunas

Jumlah tunas merupakan faktor terpenting dalam multiplikasi tanaman pada kultur jaringan. Dalam kultur jaringan jumlah tunas dapat diindikasikan sebagai keberhasilan dalam multiplikasi. Semakin banyak tunas yang terbentuk, dapat dilakukan multiplikasi kultur untuk mendapatkan tunas-tunas baru dalam jumlah yang semakin banyak juga. Perhitungan jumlah tunas dilakukan pada keseluruhan tunas yang muncul pada eksplan baik itu tunas yang berasal dari pemanjangan mata tunas maupun tunas adventif (bukan berasal dari mata tunas).



Gambar 4. Histogram rata-rata jumlah tunas jarak pagar dengan berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D.

Gambar 4 menunjukkan pada semua perlakuan yang dapat memunculkan tunas, rata-rata kemunculan tunasnya yaitu 1 buah. Berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D yang diberikan pada penelitian ini ternyata belum mampu menumbuhkan jumlah tunas lebih dari satu. Tunas yang terbentuk berasal dari hasil pemanjangan tunas pucuk batang tanaman dan tunas yang berasal dari diferensiasi jaringan kalus pada eksplan. Hal ini selaras dengan penelitian Nursetiadi (2008) yang menyatakan bahwa macam media maupun beberapa konsentrasi BAP yang diberikan pada penelitian ini ternyata belum mampu menumbuhkan jumlah tunas lebih dari satu. Penambahan konsentrasi BAP 1

sampai 3 ppm cenderung memberikan hasil yang sama, meskipun taraf konsentrasi BAP telah dinaikkan namun belum ada perubahan, hal ini kemungkinan dalam pemberian sitokinin dengan konsentrasi BAP 3 ppm belum mampu memacu multiplikasi tunas. Menurut George dan Sherrington (1984) bahwa konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi auksin akan memacu multiplikasi tunas. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Klaus dan Haensch (2007), bahwa kombinasi 0 ppm 2,4-D dengan 4 ppm BAP menyebabkan regenerasi tunas.

Peran auksin adalah merangsang pembelahan dan perbesaran sel yang terdapat pada pucuk tanaman dan menyebabkan pertumbuhan pucuk-pucuk baru. Penambahan auksin dalam jumlah yang lebih besar, atau penambahan auksin yang lebih stabil, seperti asam 2,4-D cenderung menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi pucuk tanaman (Wetherell, 1982).

L. Saat Muncul Daun

Daun merupakan organ vegetatif, pertumbuhannya dipengaruhi oleh kandungan nitrogen dalam media. Menurut Pierik (1987), sumber N organik dalam media kultur jaringan berupa NH_4^+ dan NO_3^- , dan dalam media dasar MS paling tinggi di antara media dasar yang lain. Penggunaan media MS dapat memacu pertumbuhan organ vegetatif. Hampir semua kombinasi perlakuan tidak memunculkan daun. Rata-rata saat muncul daun eksplan jarak pagar pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D disajikan dalam Tabel 6 berikut ini.

Tabel 6. Saat muncul daun eksplan jarak pagar pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D secara *in vitro* (HST)

BAP (ppm)	2,4-D (ppm)			
	0	0,25	0,5	0,75
0,5	~	~	~	~
1	11	~	~	~
1,5	14	~	~	~
2	~	~	~	~

Keterangan : ~) = tidak muncul tunas, HST=hari setelah tanam, ppm = part per million (mg/l)

Hasil pada Tabel 6 diketahui bahwa daun hanya muncul pada perlakuan BAP 1 ppm dan BAP 1,5 ppm tanpa penambahan 2,4-D yang berturut-turut muncul pada 11 HST dan 14 HST. Faktor yang menyebabkan ketidakhadiran daun pada semua kombinasi perlakuan diduga karena pada eksplan terjadi pembelahan sel-sel secara dediferensiasi akibat penambahan 2,4-D. Hal tersebut seperti yang diungkapkan Yusnita (2004), sel-sel tanaman pada tahap induksi kalus akan mengalami dediferensiasi, yaitu proses perubahan sel-sel eksplan yang sebelumnya sudah terspesialisasi untuk membentuk organ-organ tanaman seperti akar dan daun atau tunas menjadi tidak lagi terspesialisasi. Pada kondisi tersebut sel-sel akan kembali menjadi meristematik. Wetter dan Constabel (1991) juga mengatakan bahwa sel-sel yang tumbuh pada kalus akan bersifat meristematik dan biasanya tak terdediferensiasi.

M. Jumlah Daun

Daun merupakan pusat terjadinya fotosintesis yang merupakan sumber bahan makanan bagi tanaman, sehingga semakin banyak daun maka diharapkan pertumbuhan tanaman akan semakin baik. Jumlah daun dipengaruhi oleh adanya penambahan zat pengatur tumbuh ke dalam media. Pada penelitian ini, rata-rata jumlah daun yang tumbuh pada kombinasi perlakuan tanpa 2,4-D dengan BAP 1 ppm dan BAP 1,5 ppm secara berurutan adalah sebanyak 2 helai dan 1 helai daun (Tabel 7).

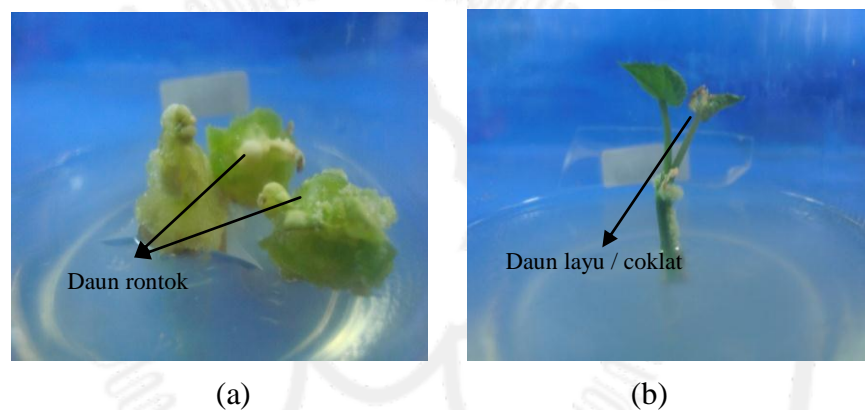
Tabel 7. Jumlah daun eksplan jarak pagar pada berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D secara *in vitro*

BAP (ppm)	2,4-D (ppm)			
	0	0,25	0,5	0,75
0,5	~	~	~	~
1	2	~	~	~
1,5	1	~	~	~
2	~	~	~	~

Keterangan : ~) = tidak muncul tunas, HST=hari setelah tanam, ppm = part per million (mg/l)

Pembentukan daun pada kultur jaringan juga dipengaruhi oleh hormon sitokinin. Seiring dengan pernyataan Yelnitis (1996) *cit.* Purwanto (2008)

bahwa penambahan sitokinin golongan BAP pada rasio sitokinin yang lebih tinggi dibandingkan auksin pada media dapat mendorong meningkatnya jumlah daun. Penelitian Widyawati (2010) juga menunjukkan bahwa hanya satu perlakuan saja yang mampu membentuk daun, yaitu pada perlakuan BAP 0,5 ppm tanpa NAA. Seperti pada penelitian Hanifah (2007) bahwa perlakuan tanpa NAA dengan pemberian BAP 1 ppm dapat memunculkan daun terbanyak yaitu 6 helai. Ini diduga dengan penambahan sitokinin (BAP) pada media dapat mendorong sel-sel meristem pada eksplan untuk membelah dan mempengaruhi sel lainnya untuk berkembang menjadi tunas dan membentuk daun.



Gambar 5. Eksplan pucuk tanaman jarak pagar (a) Daun rontok berwarna kuning kehijauan yang membentuk kalus (b) Daun berubah warna menjadi coklat (layu).

Pada penelitian ini, ada daun yang berubah warna menjadi coklat dan ada pula daun yang mengalami kerontokan, daun rontok dari pangkal tangkai daun (Gambar 5). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh nutrisi yang ada belum mencukupi kebutuhan keberlangsungan daun hingga eksplan dapat tumbuh sempurna. Diduga penyerapan tidak optimal karena tidak terbentuknya akar pada eksplan. Menurut Supriyanto *et al.* (1992) *cit.* Triatminingsih *et al.* (1995) daun yang terbentuk mengalami kerontokan karena klorosis. Klorosis merupakan peristiwa menurun atau berkurangnya klorofil akibat penambahan auksin sehingga terjadi kombinasi auksin endogen

dan eksogen dalam jaringan, kemudian mensintesis etilen yang akan menyebabkan penuaan daun.

N. Berat Segar Kalus

Pertumbuhan dicirikan dengan bertambahnya berat yang *irreversible*, sehingga pengukuran berat segar kalus dapat mewakili variabel pertumbuhan kalus yang berasal dari eksplan pucuk tanaman jarak pagar. Menurut Ruswaningsih (2007), berat segar secara fisiologis terdiri dari dua kandungan yaitu air dan karbohidrat.

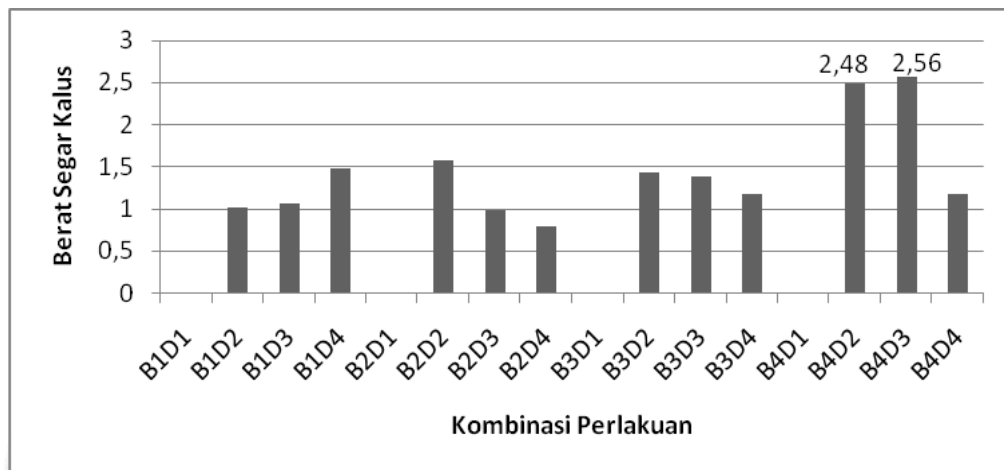
Tabel 8. Rerata berat segar kalus jarak pagar pada berbagai konsentrasi 2,4-D secara *in vitro*

2,4-D (ppm)	Rerata berat kalus
0	0,00 a
0,25	1,62 b
0,5	1,50 b
0,75	1,15 b

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%

Analisis ragam uji F 5% menunjukkan bahwa BAP dan interaksi antara BAP dan 2,4-D berpengaruh tidak nyata (*non significant*). Sedangkan pemberian 2,4-D dalam media berpengaruh sangat nyata terhadap berat segar kalus (Lampiran 16). Pada uji DMRT 5% menerangkan bahwa ketiga perlakuan 2,4-D (0,25; 0,5 dan 0,75 ppm) memberikan pengaruh yang berbeda dengan kontrol (0 ppm 2,4-D) dalam meningkatkan berat segar kalus (Tabel 8). Pada penelitian ini, perlakuan tanpa 2,4-D tidak mampu membentuk kalus. Hal ini mungkin terjadi karena kandungan auksin endogen pada eksplan tersebut belum cukup untuk membentuk kalus sehingga masih membutuhkan zat pengatur tumbuh eksogen untuk membentuk kalus. Menurut Santoso dan Nursandi (2004), arah perkembangan kultur ditentukan oleh interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diproduksi oleh sel tanaman secara endogen, sebab di dalam eksplan itu sendiri sebenarnya sudah ada zat pengatur tumbuh endogen, tapi dalam pertumbuhan dan perkembangan

tanaman secara *in vitro* zat pengatur tumbuh eksogen masih ditambahkan. Penambahan asam 2,4-D dilakukan karena asam 2,4-D berperan untuk mendorong proses morfogenesis kalus, induksi kalus dan dapat mempengaruhi kestabilan genetik sel tanaman.



Ket.:

B1: BAP 0,5 ppm

B2: BAP 1 ppm

B3: BAP 1,5 ppm

B4: BAP 2 ppm

D1: 2,4-D 0 ppm

D2: 2,4-D 0,25 ppm

D3: 2,4-D 0,5 ppm

D4: 2,4-D 0,75 ppm

Gambar 6. Histogram pengaruh kombinasi perlakuan BAP dan 2,4-D terhadap berat segar kalus jarak pagar secara *in vitro*.

Berdasarkan histogram (Gambar 6) berat segar kalus tertinggi sebesar 2,56 gram, diperoleh pada perlakuan B4D3 (BAP 2 ppm; 2,4-D 0,5 ppm) yang tidak berbeda jauh dengan berat segar kalus yang dihasilkan perlakuan B4D2 (BAP 2 ppm; 2,4-D 0,25 ppm) sebesar 2,48 gram. Kalus yang terbentuk pada kedua perlakuan ini, dipengaruhi oleh adanya auksin baik endogen maupun eksogen dengan penambahan 2,4-D.

Rahayu *et al.* (2003) menyatakan bahwa berat segar kalus yang besar ini disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus. Selain itu, Pierik (1987) menambahkan bahwa pertumbuhan kalus dalam satu spesies tanaman dapat berbeda tergantung faktor seperti posisi eksplan semula dalam tanaman dan kondisi pertumbuhan. Pertumbuhan dan morfogenesis *in vitro*

dipengaruhi oleh adanya interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media dan hormon pertumbuhan yang dihasilkan secara endogenous oleh sel-sel yang dikultur (George dan Sherrington, 1984). Oleh karena itu, perlakuan BAP dan 2,4-D berpengaruh tidak nyata (ns) terhadap berat segar kalus (Fatmawati, 2008). Dapat dikatakan bahwa pemberian 2,4-D 0,5 ppm paling baik untuk penambahan berat segar kalus. Namun, pemberian 2,4-D 0,25 ppm lebih menguntungkan karena selain memberikan pengaruh sangat nyata, dengan konsentrasi yang sedikit ini sudah bisa meningkatkan berat segar kalus jarak pagar.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Konsentrasi BAP 2 ppm dan 2,4-D 0,25 ppm paling optimal untuk menginduksi kalus tanaman *Jatropha curcas* L. secara *in vitro*.
2. Kalus yang dihasilkan rata-rata berwarna hijau kekuningan dan bertekstur remah.
3. Penambahan BAP 2 ppm dan 2,4-D 0,5 ppm mampu menghasilkan berat segar kalus tertinggi yaitu 2,56 gram.
4. Kombinasi perlakuan BAP 1 ppm tanpa 2,4-D mampu memunculkan akar pada 9 HST dengan jumlah 1 akar tunggal.
5. Pemberian BAP 0,5 ppm dengan penambahan 2,4-D 0,25 ppm memberikan saat muncul tunas tercepat yaitu 6 HST.
6. Rata-rata kemunculan daun tercepat pada perlakuan BAP 1 ppm tanpa 2,4-D, yaitu 11 HST dengan jumlah 2 helai daun.

B. Saran

Saran yang dapat diberikan adalah perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang sesuai untuk diferensiasi kalus agar membentuk planlet.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2010. Kultur Kalus Pada Tumbuhan. *www.gudangmateri.com*. Diakses 10 Oktober 2010.
- Dwiyono, E. 2009. *Induksi Kalus Tanaman Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.) dengan Perlakuan Kondisi Gelap dan 2,4-D*. Skripsi Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Fatmawati, A. 2008. *Kajian Konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap Induksi Kalus Tanaman Artemisia annua L. secara In Vitro*. Skripsi Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Fitriani, H. 2008. *Kajian Konsentrasi BAP dan NAA terhadap Multiplikasi Tanaman Artemisia annua L. secara In Vitro*. Skripsi Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- George, E. F. dan P. D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Eastern Press. England.
- Gustian. 2009. Upaya Perbanyak Tanaman Penghasil Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) secara In Vitro. <http://repository.unand.ac.id/562/1/>. Diakses 19 Agustus 2010.
- Hambali, E., A. Suryani, Dadang, Hariyadi, H. Hanafie, I. K. Reksowardojo, M. Rivai, M. Ihsanur, P. Suryadarma, S. Tjitrosemito, T. H. Soerawidjaja, T. Prawitasari, T. Prakoso, dan W. Purnama. 2006. *Jarak Pagar Tanaman Penghasil Biodiesel*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Hanifah, N. 2007. *Pengaruh Konsentrasi NAA dan BAP terhadap Pertumbuhan Eksplan Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) secara In Vitro*. Skripsi Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Hariyanti, E., R. Nirmala, dan Rudarmono. 2004. Mikropropagasi Tanaman Pisang Talas dengan Naphtalene Acetic Acid (NAA) dan Benzyl Amino Purine (BAP). *Jurnal Budidaya Pertanian* 10 (1): 26-34.
- Hendaryono, D. P. S. dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Kanisius. Yogyakarta.
- Kalimuthu, K., S. Paulsamy, R. Senthilkumar dan M. Sathy. 2007. In vitro Propagation of the Biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Culture & Biotechnology Journal* 17(2): 137-147

- Klaus dan T. Haensch. 2007. Influence of 2,4-D and BAP on callus growth and the subsequent regeneration of somatic embryos in long-term cultures of *Pelargonium x domesticum* cv. Madame Layal. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(1): 69-77.
- Kusuma, L. A. 2009. Kultur Jaringan Jarak. <http://leqi.files.wordpress.com/>. Diakses 2 Maret 2010.
- Noggle, G. R. dan G. J. Fritz. 1983. *Introductory Plant Physiology: Second Edition*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
- Nofiyanti, D. 2007. *Pengaruh Konsentrasi IBA dan BA terhadap Pertumbuhan Eksplan Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) secara In Vitro*. Skripsi S1 Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Nurcholis, M. dan S. Sumarsih. 2007. *Budi Daya Jarak Pagar dan Pembuatan Biodiesel*. Kanisius. Yogyakarta.
- Nursetiadi, E. 2008. *Kajian Macam Media dan Konsentrasi BAP terhadap Multiplikasi Tanaman Manggis (Garcinia mangostana L.) secara In Vitro*. Skripsi S1 Fakultas Pertanian UNS. Surakarta
- Palupi, A. D., Solichatun, dan S. D. Marlina. 2004. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benziladenin (BA) terhadap Kandungan Minyak Atsiri Kalus Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.). *BioSMART* 6(2): 99-103.
- Pierik, R. L. M., 1987. *In Vitro Culture of Hinger Plant*. Martinus Nijhoff Publisher. Netherlands.
- Prana, M. S. 2006. *Budidaya Jarak Pagar Sumber Biodiesel*. LIPI Press. Jakarta.
- Prihandana, R. dan P. Hendroko, 2006. *Petunjuk Budidaya Jarak Pagar*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Prihatmanti, D. dan N.A.Mattjik. 2004. Penggunaan ZPT NAA (Naphthaleine Acetic Acid) dan BAP (6-Benzil Amino Purin) serta Air Kelapa untuk Menginduksi Organogenesis Tanaman Anthurium (*Anthurium andraeanum* Lin). *Buletin Agronomi* 32(1): 20-25.
- Purwanto, A. 2008. *Kajian Macam Eksplan dan Konsentrasi IBA Terhadap Multiplikasi Tanaman Manggis (Garcinia mangostana L.) Secara In Vitro*. Skripsi Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret. Surakarta.

- Puslitbangbun. 2007. Bahan Bakar Nabati Asal Tanaman Perkebunan sebagai Alternatif Pengganti Minyak Tanah untuk Rumah Tangga. *Perspektif* 6(1): 10-18.
- Rahayu, B., Solichatun dan E. Anggarwulan. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Penentuan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofrms* 1(1): 1-6.
- Rahmaniar, A. 2007. *Pengaruh Macam Eksplan dan Konsentrasi 2,4-D-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) terhadap Pertumbuhan Anthurium (Anthurium plowmanii Croat) pada Medium MS*. Skripsi Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Ruswaningsih, F. 2007. *Pengaruh Konsentrasi Ammonium Nitrat dan BAP terhadap Pertumbuhan Eksplan Pucuk Artemisia annua L. pada Kultur In Vitro*. Skripsi Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Santoso, U. dan F. Nursandi. 2004. *Kultur Jaringan Tanaman*. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.
- Saparni, S. 2007. *Identifikasi Sifat Morfologi Tanaman Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) Akses Jawa Di Kebun Induk Jarak Pagar Pakuwon*. Skripsi Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Sumanto. 2005. Manfaat Tanaman Jarak Pagar Sebagai Tanaman Obat dan Bahan Baku Industri Minyak Biodisel yang Potensial. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* 11(1): 21-23.
- Suryowinoto, M. 1996. *Pemuliaan Tanaman secara In Vitro*. Kanisius. Yogyakarta.
- Syah, A. N. A. 2006. *Biodiesel Jarak Pagar : Bahan Bakar Alternatif yang Ramah Lingkungan*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Triatminingsih, R.E., Nazir, dan M. Winarno. 1995. Pengaruh Saat Penanaman dan Pemberian Zat Pengatur Tumbuh Pada Sumber Eksplan terhadap Keberhasilan Inisiasi Tunas Manggis Secara In Vitro Pada Beberapa Semaian Batang Bawah Alternatif Manggis. *Jurnal Hortikultura* 9(3):188-191.
- Turhan, H. 2004. Callus Induction and Growth in Transgenic Potato Genotypes. *African Journal of Biotechnology* 3(8): 375-378.

- Wetherell, D. F., 1982. *Pengantar Propagasi Tanaman secara In Vitro*. Terjemahan : Koensumardiyah. Avery Publishing Group Inc., Wayne, New Jersey.
- Wetter, L. R. dan F. Constabel. 1991. *Metode Kultur Jaringan Tanaman. Edisi Kedua*. ITB Press. Bandung.
- Widiarso, M. 2010. *Kajian Penggunaan BAP dan IBA untuk Merangsang Pembentukan Tunas Lengkeng (Dimocarpus longan Lour) Varietas Pingpong secara In Vitro*. Skripsi Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Widyawati, G. 2010. *Pengaruh Variasi Konsentrasi NAA dan BAP terhadap Induksi dan Pertumbuhan Kalus Jarak Pagar (Jatropha curcas L.)*. Tesis Program Pasca Sarjana UNS. Surakarta.
- Yunus, A., Samanhudi, dan D. Nofiyanti. 2007. Pengaruh Konsentrasi IBA dan BA terhadap Pertumbuhan Eksplan Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*) secara In Vitro. *Jurnal Agrosains* 9(2): 41-52.
- Yusnita. 2004. *Kultur Jaringan. Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Cetakan Ketiga. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman. Solusi Perbanyak Tanaman Budi Daya*. Bumi Aksara. Jakarta.