

PENGARUH UMUR BIAK DAN POSISI DAUN TERHADAP MORFOGENESIS DARI DAUN KENTANG HITAM (*Solenostemon rotundifolius* (POIR) JK Morton) *IN VITRO*

Tatin Suherlina, Aryani Leksonowati dan Witjaksono¹

Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong Science Center,

Jl Raya Bogor-Jakarta Km 46, Cibinong, Bogor 16911

Telp/Fax: (021) 8765066/(021) 8765067

Email: mentari_herlin@yahoo.com/tats@bio.its.ac.id

¹Penulis untuk surat menyurat: tjak_witjaksono@yahoo.com

ABSTRACT

Plant regeneration via somatic embryogenesis or organogenesis is a key for manipulation of somatic cells in vitro. Organogenesis from leaf inoculum, petiole and stem segments of in vitro black potato (Solenostemon rotundifolius (Poir) JK Morton) is influenced by the balance of the concentration of BA and NAA in the culture medium. However, organogenesis could also be affected by factors inherent to the inoculums. This paper reports the influence of leaf position on the in vitro shoots and culture age on the formation and production of shoot adventives from leaf inoculum. Leaves excised from shoots of 3–8 week-old culture and leaf position 1-5 from apical to basal was used as inocula. The highest percentage (83.3%) of adventitious bud develops at cultures age of 5 weeks with the average number of shoots 6.1. The highest percentage of bud development occurs at leaf position number 2-4, with the percentage of buds of 83.3, 76.2 and 76.2, respectively with the average number of shoots of 3.19, 2.10 dan 2.38 respectively. Organogenesis that produces the highest shoot production of 18.6 per Petri dish was obtained from leaves derived from the 2nd leaf from apical of 5 week-old culture inoculated on MS medium enriched with 5 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA.

Key words: culture age, in vitro culture, leaf position, organogenesis, *Solenostemon rotundifolius* (Poir) JK Morton.

PENGANTAR

Tanaman kentang hitam (*Solenostemon rotundifolius* (Poir) JK Morton, *Plectranthus rotundifolius*, *Coleus tuberosus* Benth.) merupakan salah satu tanaman penghasil umbi. Umbi kentang hitam dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbohidrat alternatif karena itu penting untuk diversifikasi pangan guna menunjang ketahanan pangan. Kentang hitam dikonsumsi sebagai sayuran, direbus atau sebagai campuran sajian sebagai pengganti kentang dan diolah menjadi makanan sampingan (jajan). Selain itu pati kentang hitam juga dapat dipakai sebagai bahan penyatu atau pemencar dalam industri farmasi (Jansen, 1996).

Tanaman kentang hitam di Indonesia diperkirakan memiliki keragaman genetik yang rendah, karena diperbanyak secara vegetatif dan serbuk sari tanaman dalam keadaan steril (Vasudevan dalam Vimala & Nambisan, 2005). Hal ini dimungkinkan akibat desinapsis dan meiosis tidak teratur (Ramachandran, 1967 dalam Vimala dan Nambisan, 2005) yang berakibat pada kegagalan pembentukan biji (Vimala & Nambisan, 2005). Dengan demikian diperlukan adanya suatu manipulasi sel untuk meningkatkan keragaman genetik tanaman kentang hitam, guna pemuliaan kentang hitam sebagai sumber karbohidrat alternatif.

Kemampuan regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik atau organogenesis menjadi kunci manipulasi sel somatik *in vitro*. Tanaman kentang hitam sangat responsif terhadap manipulasi *in vitro*. Regenerasi kentang hitam secara kultur jaringan telah berhasil dilakukan (Hoesen, 1991; Prematilake, 2005; Witjaksono dan Leksonowati, 2008a). Tunas dapat diregenerasikan melalui organogenesis potongan daun. Pembentukan tunas pada biak jaringan kentang hitam terjadi melalui pertumbuhan tunas adventif (Witjaksono dan Leksonowati, 2008b; Leksonowati & Witjaksono, 2010). Menurut Prematilake (2005) tanaman kentang hitam yang diregenerasi dari kalus menunjukkan adanya variasi somaklonal.

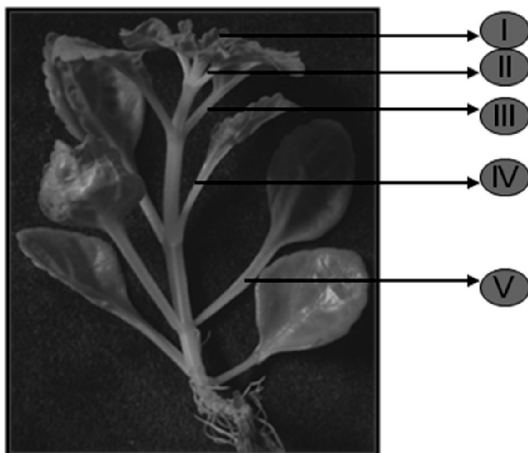
Terdapat beberapa faktor fisiologi eksplan yang dapat mempengaruhi morfogenesis maupun organogenesis pada daun. Menurut Lo (1997) organogenesis tunas pada *African violet* sangat dipengaruhi oleh umur daun dan perlakuan perlakuan eksplan. Lo (1997) menginformasikan bahwa potensi regenerasi tunas tidak berbanding langsung dengan kelompok usia muda pada jaringan daun. Sedangkan perlakuan perlakuan mampu meningkatkan organogenesis tunas ketika luka kontak langsung dengan media. Berbeda dengan Lo (1997) penelitian Tornero *et al.* (2000) menunjukkan hasil regenerasi tunas adventif tertinggi

diperoleh dengan memperluas kontak daun muda pada sisi atas daun (*adaxial*) menyentuh media kultur. Morfogenesis daun juga dipengaruhi variabilitas genotif (Tornero *et al.*, 2000; Nhut *et al.*, 2007), usia kuncup bunga, serta ukuran eksplan (Nhut *et al.*, 2007).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh umur biak dan posisi daun terhadap morfogenesis daun kentang hitam dan mendapatkan umur biak dan posisi daun yang paling baik sebagai metoda standar morfogenesis.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian meliputi dua percobaan yaitu pengaruh umur biak dan pengaruh posisi daun terhadap morfogenesis daun kentang hitam. Medium yang digunakan adalah medium regenerasi yang terdiri dari garam formulasi MS (Murashige & Skoog, 1962) dengan penambahan kombinasi BA 5 mg/l dan NAA 0.1 mg/l (Witjaksono dan Leksonowati, 2008b). Medium diatur pH-nya 5.7–5.8, kemudian diautoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 15 Psi selama 20 menit, selanjutnya dibawa ke Laminar Air Flow (LAF) dan dibagi ke *Petri dish* berukuran 98 × 15 mm yang telah disterilkan terlebih dahulu sebanyak masing-masing 30 ml. Medium tumbuh disimpan pada ruangan dengan suhu 25° C setidaknya semalam sebelum dipakai.



Gambar 1. Penentuan posisi daun kentang hitam yang digunakan.

Inokulum berupa potongan daun diambil dari biak tunas kentang hitam *in vitro* klon Nganjuk 1 yang dibiakkan sesuai Witjaksono dan Leksonowati (2008a). Umur inokulum yang digunakan antara 3–8 minggu. Pada percobaan ini daun yang dipakai sebagai inokulum adalah daun ke-2 sampai sebelum dua daun yang terbawah. Pada percobaan posisi daun, daun yang digunakan adalah posisi 1–5 (posisi di

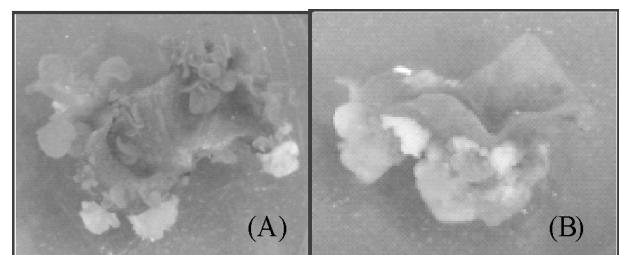
hitung dari pucuk ke bawah) (Gambar 1) dari biak tunas yang berumur 5 minggu.

Daun kentang hitam dipotong dengan ukuran 7 × 7 mm, kemudian ditanam pada medium dengan posisi tengkurap (permukaan atas daun menempel pada medium). Tiap perlakuan terdiri dari 6 ulangan (*Petri dish*) dan setiap *Petri dish* berisi 7 inokulum potongan daun.

Biak diinkubasi pada suhu 27° C pada rak kultur dengan penyinaran dari cahaya difuse, tanpa lampu khusus (261–352 lux). Biak diamati setelah 6 minggu meliputi persentase bertunas, jumlah tunas per inokulum, dan produksi tunas per petri. Sebagai data pendukung diamati pula persentase hidup dan persentase kalus yang terbentuk.

HASIL

Potongan daun mulai membesar setelah 4 hari diinokulasi pada medium regenerasi. Beberapa daun terutama pada daun muda (posisi I) daun membesar secara tidak beraturan sehingga permukaan daun menggelombang dan menggulung. Pada potongan daun tumbuh sel-sel seperti kalus yang menyerupai kapas (berwarna putih) setelah 10 hari diinokulasi pada medium regenerasi. Selanjutnya pada bekas sayatan daun tumbuh mata tunas dan sedikit kalus pada hari ke-11 s.d. ke-16. Mata tunas selanjutnya tumbuh membesar menjadi tunas setelah 18 hari diinokulasi pada medium regenerasi. Sebagian besar kalus tumbuh pada permukaan daun yang menempel pada media (Gambar 2).



Gambar 2. Morfogenesis pada inokulum daun kentang hitam: (A) Tunas, (B) Kalus.

Pengaruh Umur Biak terhadap Morfogenesis Daun Kentang Hitam

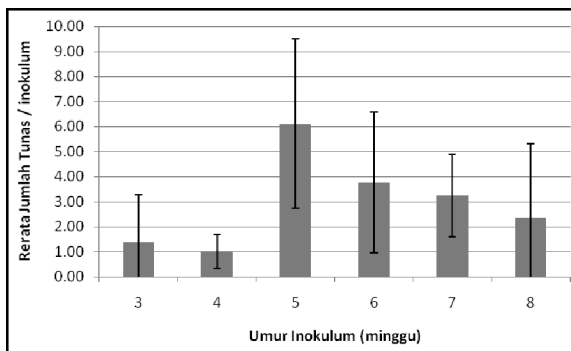
Umur biak asal inokulum daun diambil berpengaruh terhadap morfogenesis daun kentang hitam. Respon persentase hidup dari inokulum bersifat parabolik, umur optimum dengan persentase hidup tertinggi (85%) dicapai pada umur biak 5 minggu. Respon yang sama ditunjukkan oleh pembentukan tunas, yaitu persen inokulum membentuk tunas tertinggi (83%) juga dicapai pada umur biak 5 minggu. Pada pembentukan kalus, respon parabolik terhadap umur

asal biak juga teramati walaupun umur optimum bergeser ke 6 minggu (Tabel 1).

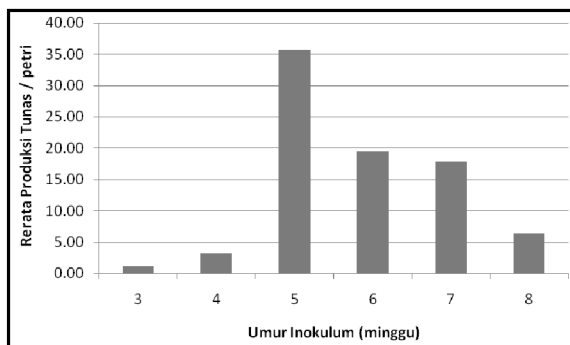
Tabel 1. Pengaruh umur inokulum terhadap morfogenesis eksplan daun kentang hitam *in vitro* pada pengamatan minggu ke-6.

Umur Inokulum (Minggu)	% Inokulum Daun		
	Hidup	Membentuk Kalus	Membentuk Tunas
3	11.90	2.38	11.90
4	57.24	57.24	45.24
5	85.71	53.87	83.33
6	78.57	64.28	73.80
7	80.95	54.76	78.57
8	40.48	33.33	38.10

Jumlah tunas yang terbentuk pada inokulum daun juga dipengaruhi oleh umur biak asal daun dan pengaruh tersebut bersifat parabolik. Jumlah tunas tertinggi (6 tunas per inokulum) diperoleh pada daun dari biak umur 5 minggu (Gambar 3 A). Hasil ini konsisten dengan respon morfogenesis dari daun tersebut.



(A)



(B)

Gambar 3. Pengaruh umur eksplan terhadap morfogenesis daun kentang hitam: (A) Rerata jumlah tunas/inokulum, (B) Rerata produksi tunas/Petri dish.

Karena tiap *Petri dish* diisi 7 potongan daun, maka produksi tunas per *Petri dish* dapat dihitung sebagai hasil kali dari jumlah inokulum per *Petri dish* dengan rerata jumlah tunas dan persentase pembentukan tunas. Produksi tunas mengikuti pola rata-rata jumlah tunas yang terbentuk. Produksi tunas tertinggi sebanyak 35.6 diperoleh pada perlakuan umur biak 5 minggu (Gambar 3 B).

Pengaruh Posisi Daun terhadap Morfogenesis Daun Kentang Hitam

Setelah didapatkan hasil persentase tunas dan jumlah tunas yang paling optimal pada percobaan pengaruh umur biak kentang hitam. Hasil umur terbaik tersebut kemudian dipakai sebagai dasar bagi percobaan pengaruh posisi daun terhadap morfogenesis daun kentang hitam. Jadi, inokulum yang digunakan pada percobaan pengaruh posisi daun terhadap morfogenesis daun kentang hitam adalah kultur kentang hitam *in vitro* klon Nganjuk 1 yang berumur 5 minggu.

Persen inokulum hidup sangat dipengaruhi oleh posisi daun dalam tunas biak. Pengaruh posisi terhadap persen hidup inokulum bersifat parabolik dan posisi optimum yang menghasilkan respon maksimum (97–100%) adalah pada posisi II–III (Tabel 2). Pada posisi daun ke IV persen hidup telah menurun dan persen hidup tinggal 45% pada posisi daun terbawah (posisi V).

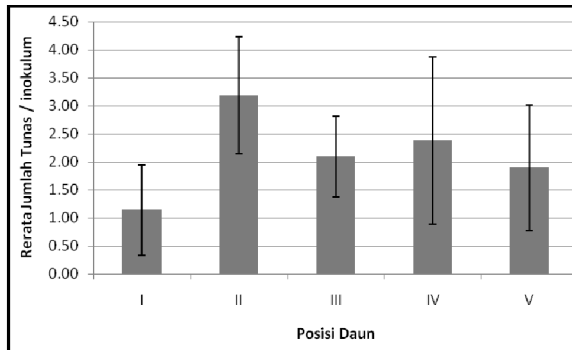
Persen pembentukan kalus mempunyai respon yang sama dengan persen hidup, yaitu parabolik dengan respon maksimum pada posisi daun optimum II–III. Seperti halnya respon persen hidup, pada daun ke-V, respon pembentukan kalus mencapai kurang dari 50%.

Tabel 2. Pengaruh posisi daun terhadap morfogenesis pada eksplan daun kentang hitam *in vitro* pada pengamatan minggu ke-6.

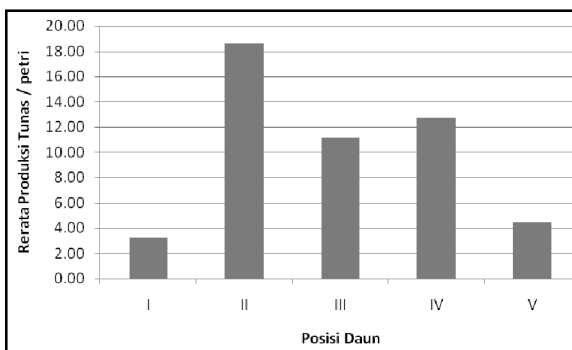
Posisi Daun	% Inokulum Daun		
	Hidup	Membentuk Kalus	Membentuk Tunas
I	92.86	85.71	40.48
II	100.00	90.48	83.33
III	97.62	95.24	76.19
IV	83.33	80.95	76.19
V	45.24	45.24	33.33

Respon pembentukan tunas mempunyai pola yang mirip dengan kedua variabel morfogenesis sebelumnya, persen hidup dan persen pembentukan kalus. Persen inokulum daun membentuk tunas yang tertinggi didapat pada posisi II.

Respon rerata jumlah tunas cenderung bersifat parabolik terhadap posisi daun. Perbedaan yang nyata hanya terjadi antara daun posisi I dan posisi II, dan tidak berbeda nyata dengan posisi daun yang lain (III-V). Produksi tunas yang dihitung berdasarkan rerata jumlah tunas pada perlakuan posisi daun II mencapai 18 per *Petri dish* (Gambar 4).



(A)



(B)

Gambar 4. Pengaruh posisi daun terhadap organogenesis daun kentang hitam: (A) Rerata jumlah tunas/inokulum, (B) Produksi tunas/*Petri dish*.

PEMBAHASAN

Umur biak dari inokulum daun diambil dan posisi daun pada tunas *in vitro* secara nyata berpengaruh pada frekuensi (persentase) morfogenesis maupun intensitas morfogenesis (jumlah tunas) pada kentang hitam. Fenomena ini juga banyak dilaporkan pada organogenesis dari daun beberapa tanaman herba lain dari famili yang sama dengan kentang hitam yaitu Lamiaceae, seperti *Coleus forskohlii* (Krishna *et al.*, 2010), *Mentha spicata* (Li *et al.*, 1999), *M. piperita* dan *M. citrata* (Van Eck & Kitto, 1992).

Pada kentang hitam umur biak yang paling baik untuk dipakai sebagai sumber inokulum adalah umur 5-7 minggu setelah subkultur. Pada umur 8 minggu, mungkin biak sudah mulai mengalami kemunduran karena sumber makan dalam

medium habis, sedangkan pada umur 4 minggu atau kurang, biak masih tumbuh. Pada *M. spicata*, regenerasi tunas malah terjadi pada daun yang diambil dari biak yang berumur 2-3 bulan, sedangkan daun dari biak muda (2-3 minggu) tidak menunjukkan respon pertumbuhan tunas adventif (Li *et al.*, 1999). Sebaliknya, eksplan daun tua dari tanaman di *green house* tidak membentuk tunas sama sekali sedangkan yang muda dapat membentuk tunas dengan cara dipotong dari bagian pangkal daun (Van Eck & Kitto, 1992). Pada markisa (*Passiflora edulis f. flavicarpa*), umur tanaman juga berpengaruh pada regenerasi daun, jumlah tunas tertinggi diperoleh dari daun yang diambil dari tanaman berumur 2 bulan dan menurun sampai tanaman berumur 6 bulan (Becerra *et al.*, 2004).

Pada kentang hitam posisi daun yang optimum untuk produksi tunas adalah pada daun ke-2 walaupun penurunan itu tidak terlalu drastis untuk peubah rata-rata jumlah tunas. Frekuensi pembentukan tunas yang rendah pada posisi ke-5 dapat menjelaskan rendahnya nilai produksi tunas tersebut. Daun ke-2 s.d. 4 adalah daun yang telah membuka penuh, sedangkan daun ke-1 masih pada tahap perluasan daun dan pada posisi ke-5 daun sudah mulai menua. Pengaruh posisi daun dari pucuk terhadap regenerasi tunas juga dilaporkan pada biak muda *M. spicata*, tetapi pengaruh posisi itu hilang pada biak tua (Li *et al.*, 1999).

Terjadinya gradien morfogenesis pada parameter umur biak/tanaman atau parameter umur daun atau posisi daun mungkin terkait adanya gradien zat pengatur tumbuh endogen dari masing-masing eksplan. Dari gradien tersebut, terdapat kondisi yang optimal yang dapat diperoleh dengan eksperimen.

Kesimpulannya adalah persen hidup dan persen pembentukan kalus serta tunas dari daun dipengaruhi oleh umur biak asal inokulum daun itu diambil dan posisi daun dari *apikal* sampai *basal* pada biak.

Produksi tunas tertinggi diperoleh dari inokulum daun yang diambil dari posisi daun ke-2 dan dari biak yang berumur 5 minggu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari Sub Kegiatan Kompetitif LIPI 2010 dan DIPA Pusat Penelitian Biologi 2008-2010.

KEPUSTAKAAN

Becerra DC, Forero1 AP & G'ongora GA, 2004. Age and Physiological Condition of Donor Plants Affect In Vitro Morphogenesis in Leaf Explants Of *Passiflora edulis f. flavicarpa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 87-90.

- Hoesen DSH, 1991. Biak Jaringan Kentang Hitam (*Coleus tuberosus* Benth.) in: Witjaksono, Marwoto RM & Supardiyono EK (eds.) *Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Hayati 1990/1991*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, LIPI. Bogor. p: 99–104.
- Jansen PCM, 1996. *Plectranthus rotundifolius* (Poir) Sprengel. In: Flach M & Rumawas F (eds.) *Plant Yielding non-seed Carbohydrates. PROSEA*, Bogor. p: 141–143.
- Krishna G, Reddy PS, Nair NA, Ramteke PW dan Bhattacharya PS, 2010. In Vitro Direct Shoot Regeneration from Proximal, Middle and Distal Segment of *Coleus forskohlii* Leaf Explants. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 16: 195–200.
- Leksonowati A & Witjaksono, 2010. Organogenesis pada Daun, Tangkai Daun dan Ruas Batang Kentang Hitam (*Solenostemon rotundifolius* (Poir) JK Morton) secara in vitro. *Jurnal Berkala Penelitian Hayati*.
- Li X, Niu X, Bressan RA, Weller SC & Hasegawa PM, 1999. Efficient Plant Regeneration of Native Spearmint (*Mentha spicata* L.). In vitro Cell. *Dev. Biol.--Plant* 35:333–338.
- Lo KH, 1997. Factors Affecting Shoot Organogenesis in Leaf Disc Culture of African Violet. *Scientia Horticulturae* 72: 49–57.
- Murashige T & Skoog F, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Nhut DT, An TTT, Huong NTD, Don NT, Hai NT, Thien NQ, & Vu NH, 2007. Effect of Genotype, Explant Size, Position, and Culture Medium on Shoot Generation of *Gerbera jamesonii* by Receptacle Transverse Thin Cell Layer Culture. *Scientia Horticulturae* 111:s 146–151.
- Prematilake DP, 2005. Inducing Genetic Variation of *Innala* (*Solanostemon rotundifolius*) via In Vitro Callus Culture. *J Natn Sci Foundation Sri Lanka* 33:123–131.
- Tornero OP, Egea F, Vanoostende A, & Burgos L, 2000. Assessment of Factors Affecting Adventitious Shoot Regeneration from In Vitro Cultured Leaves of Apricot. *Plant Science* 158: 61–70.
- Van Eck JM & SL Kitto, 1992. Regeneration of Peppermint and Orange Mint from Leaf Disks. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 41–49.
- Vimala B & Nambisan B, 2005. Tropical Minor Tuber Crops. Central Tuber Crops Research Institute. Indian Council of Agricultural Research. Kerala. India.
- Witjaksono & Leksonowati A, 2008a. Perbanyakan Kentang Hitam (*Coleus tuberosus* Benth.) secara In vitro. Laporan Teknik Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Bogor. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) 2008. P. 1484–1489 (ISSN 1907-4905).
- Witjaksono & Leksonowati A. 2008b. Regenerasi Organ Daun, Tangkai Daun dan Batang Kentang Hitam (*Coleus tuberosus* Benth.) secara In vitro. Laporan Teknik Pusat penelitian Biologi-LIPI. Bogor. Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) 2008. P. 1490-1499 ISSN 1907–4905.