

KULTUR IN-VITRO EKSPLAN RIMPANG *Zingiber zerumbet* var. *aromaticum* Val. [In-vitro Culture of Rhizome Explants of *Zingiber zerumbet* vsar. *aromaticum* Val.]

Djadja Siti Hazar Hoesen

Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi - LIPI

Jl. Ir. H. Juanda 22 Bogor

ABSTRACT

Zingiberaceae species *Zingiber zerumbet* var. *aromaticum* Val. usually propagated by vegetative part of the plant. Study on the proliferation of rhizome explants through in-vitro method were conducted on this species for propagation. The explants were cultured in MS (Murashige & Skoog) composition medium in normal and half strength concentration of macro elements, supplemented with micro elements and vitamins. Plant growth regulator (PGR) cytokinin (kinetin, adenine sulphate) were added in initiation stage. Benzyl adenine (BA), thidiazuron and 2,4D (dichlorophenoxy acetic acid) added in medium as treatments to induce shoot multiplication and adventitious shoot development or rooting plants. The media for induced multiple shoot and roots (plantlets) development, supplemented with PGR BA, thidiazuron, Indole butyric acid (D3A) as treatments and activated charcoal were added as antioxidant. In general, most of cultures were indicated have positively responds to PGR treatments. The ability of culture to produce multiple shoots and roots such as in medium with BAP (8 mg/l) + thidiazuron (0.1 mg/l) + IBA (1 mg/l)-indole butyric acid would give a better opportunity of rhizome explants proliferation and plantlets development of *Z. zerumbet* var. *aromaticum*.

Kata kunci/key words: *Zingiber zerumbet* var. *aromaticum* Val., Zingiberaceae, in-vitro, eksplan rimpang/rhizome explants.

PENDAHULUAN

Suku Zingiberaceae umumnya diperbanyak dengan bagian vegetatif dari tumbuhan, terutama pada jenis-jenis yang sukar menghasilkan bagian generatif/biji secara alami. Jenis umbi-umbian umumnya mengalami perioda dormansi termasuk lempuyang wangi; masa dorman tersebut termasuk salah satu kendala dalam pengelolaan dan penyediaan bibit. Tetapi kultur in-vitro dan perlakuan ZPT dapat mempercepat perioda tersebut (Hoesen, 2003). Salah satu varitas dari lempuyang adalah lempuyang wangi [*Zingiber zerumbet* var. *aromaticum* Val.]. Selainitu, terdapat varitas lainnya yaitu lempuyang gajah/kebo [*Z. zerumbet* L (Sm) var. *zerumbet*] dan lempuyang emprit (*Z. zerumbet* var. *amaricans* Bl.) (Wolff *et al*, 1999). Lempuyang umumnya dimanfaatkan sebagai bahan obat dan kosmetika alami oleh masyarakat di beberapa negara Asia seperti Cina, Malaysia, Filipina, Malagasi dan Indonesia (Perry, 1981; Wolff *et al*, 1999). Masyarakat di Indonesia juga telah lama memanfaatkan tumbuhan ini. Di Papua (Irian) rimpangnya dimanfaatkan oleh para pria untuk kepentingan upacara agama/kepercayaan yang mereka anut, sedangkan para wanitanya menggunakan tumbuhan tersebut untuk mencegah kehamilan.

Pemanfaatan yang hampir serupa juga dilakukan oleh masyarakat Jawa, untuk memulihkan tenaga setelah persalinan dengan cara mengkonsumsi campuran rimpang lempuyang wangi dan cabe jawa yang telah ditumbuk, serta ditambah gula jawa (Tampubolon, 1981). Masyarakat di Lembak Delapan Bengkulu, memanfaatkan rimpang lempuyang wangi tersebut untuk obat luar (kudis) dan seduhannya diminum untuk mengobati bau mulut, karena rimpangnya beraroma/harum (Siagiandan Sunaryo, 1996).

Lempuyang wangi tumbuh meliar di hutan jati; namun ada pula yang ditanam oleh penduduk di pedesaan, tetapi belum ada yang memproduksinya dalam skala besar ataupun membudidayakannya secara intensif (Sastrapradja, 1977).

Pada umumnya suku Zingiberaceae mengandung minyak atsiri. Demikian pula halnya dengan lempuyang wangi, yang mengandung senyawa *zerumbon* yang berkhasiat anti kejang (Tampubolon, 1981 sitasi Sulianti *et al* 1998).

Analisa terhadap berbagai bagian tumbuhan lempuyang wangi dari Vietnam dan Filipina menunjukkan bahwa risom dari tumbuhan tersebut mengandung senyawa *monocyclic sesquiterpene ketone zerumbon* (35-72%), bagian batang

mengandung 0,05 % *zerumbone*. Minyak esensial yang berasal dari daun mengandung 0,07% dan dari bunganya 0,15%. Senyawa *zerumbone* dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan *Micrococcus pyogenes* dan *Mycobacterium tuberculosis*. *Zerumbone epoxide* mempunyai aktifitas *cytotoxic* terhadap sel tumor (*hepatoma*) secara *in-vitro*. Senyawa kurkumin yang terdapat dalam tumbuhan tersebut mempunyai aktifitas sebagai antioksidan (Wolff *et al*, 1999).

Hasil analisa yang dilakukan di Laboratorium Treub, Bidang Botani dengan menggunakan GCMS, terdeteksi bahwa rimpang lempuyang wangi yang dihasilkan dari tanaman yang berumur 12 bulan, mengandung minyak atsiri yang terdiri dari 17 komponen penyusunnya yaitu: *afarnesona* (1,38%), *germakrena* (10,05%), *kamfena* (14,677%, yang berkhasiat sebagai antiseptik dan obat telinga), *kamfor* (3,92%, berkhasiat sebagai antiinfeksi, *carminativum*, *antipurporetik*, kontraksi amarfik), *3Karena* (1,8%, untuk parfum dan flavor), *4Karena* (1,25%), *a kariofilena* (9,49%), *iso kariofilena* (0,76%), *kariofilena oksida* (3,13%), *b linalool* (14,16%, bahan untuk flavor), *4 metil-1-(1-metil etil)-3 sikloheksan-1-ol* (2,06%), *patchoulena* (0,67% bahan untuk parfum), *b cis osimena* (3,41%), *b trans osimena* (16,075%), *Sineol*(6,36%, bahan untuk parfum, flavor, *carminativum*), *a terpinena* (0,84% bahan untuk flavor) (Suliantie/a/, 1998).

Dari hasil pengkajian/analisa pada rimpang tumbuhan lempuyang wangi, menunjukkan bahwa tumbuhan tersebut sangat potensial untuk digunakan sebagai bahan dasar industri farmasi dan kosmetika. Apabila akan diproduksi dalam skala industri, maka penyediaan bahan baku dalam jumlah besar dan berkesinambungan merupakan hal yang sangat penting. Kultur *in-vitro* sangat menguntungkan dalam perbanyakan tanaman, karena dengan teknik tersebut memungkinkan dikembangkannya agroindustri.

Teknik budidaya dengan kultur *in-vitro* yang relatif lebih cepat, intensif dan berkesinambungan berhasil memperbanyak sejumlah jenis tanaman hias dan tumbuhan obat termasuk jenis-jenis dari suku Zingiberaceae yaitu beberapa klon jahe (gajah, merah), kencur, temu glenyeh, temu hitam, dan kunir

putih (Ikeda dan Tanabe, 1989; Hoesen dan Poerba, 1994; Imelda, 1994; Hoesen, 1996; Kyte dan Kleyn, 1996; *Mariskaet al*, 1996; Hoesen *et al*, 1998; Hoesea 1998).

Percobaan ini bertujuan untuk mendapatkan teknik perbanyakan cepat dan komposisi media yang terbaik untuk budidaya lempuyang wangi, dengan cara mengevaluasi konsentrasi hara makro dalam media dasar formulasi MS, penambahan zat pengatur tumbuh sitokinin (adenin sulfat, BA, kinetin), thidiazuron dan auksin (2,4D dan IBA) terhadap tingkat proliferasi (pembentukan dan pertumbuhan) eksplan lempuyang wangi. Dari percobaan ini diharapkan dapat menghasilkan cara perbanyakan yang paling ekonomis untuk diaplikasikan dalam agroindustri lempuyang wangi. Dengan demikian penyediaan bahan baku industri farmasi dan kosmetika dalam skala besar menjadi lebih terjamin.

BAHANDANMETODE

Bahan eksplan yang digunakan pada percobaan ini berupa mata tunas/calon tunas dari rimpang yang masih muda. Eksplan disterilkan dalam larutan klorox 25-30% (5,25 % natrium hipoklorit) selama 30 menit serta dibilas air suling steril 4 kali. Selanjutnya bahan eksplan tersebut dipotong-potong hingga berukuran 0,3 cm - 0,5 cm.

Medium dasar yang digunakan adalah formulasi garam anorganik makro dan mikro MS dengan konsentrasi normal dan Vi konsentrasi. Masing-masing media dasar tersebut diberi tambahan 0.4 mg/1 tiamin HCl, 100 mg/1 myo-inositol, 0,5 mg/1 asamnikotinat, 2 mg/1 glisin, 30 gram gula pasir, dan 2 gram/1 phyta gel serta zat pengatur tumbuh sesuai perlakuan. Keasaman medium diatur hingga mencapai nilai pH 5,7±0,1.

Percobaan ini terdiri dari 4 tahap. Tahap pertama adalah tahap *inisiasi* bertujuan untuk mendapatkan kultur yang bebas dari kontaminasi untuk mempercepat pembentukan tunas dan mempercepat periode dormansi dengan penambahan 2 jenis ZPT sitokinin.

Perlakuan percobaan meliputi:

Io (medium dasar MS konsentrasi Vi hara makro dan mikro)

I, (medium dasar MS konsentrasi hara makro dan mikro normal)

I_2 (1 MS + Kinetin 2 mg/l + Adenin sulfat 5 mg/l)

I_3 (1 MS + Adenin sulfat 5 mg/l)

I_4 (1/2 MS + Kinetin 2 mg/l + Adenin sulfat 5 mg/l)

I_5 (1/2 MS + Adenin sulfat 5 mg/l)

Tahap kedua adalah untuk merangsang *multiplikasi dan perakaran tunas*. Setelah kultur berumur 8 minggu, dipindahkan ke dalam media yang diberi tambahan kombinasi sitokinin dan auksin dengan komposisi:

M_1 (1/2 MS)

M_2 (1/2 MS + BA 2 mg/l + thidiazuron 0,01 mg/l + 2,4D 0,5 mg/l)

M_3 (1/2 MS + BA 2 mg/l + thidiazuron 0,01 mg/l)

M_4 (1MS)

M_5 (1 MS + BA 2 mg/l + thidiazuron 0,01 mg/l + 2,4D 0,5 mg/l)

M_6 (1 MS + BA 2 mg/l + thidiazuron 0,01 mg/l)

Pada tahap ini ke dalam medium ditambahkan auksin 2,4 D, diharapkan kultur dapat membentuk kalus (tunas adventif) atau akar, sehingga planlet (tunas berakar) dapat terbentuk.

Tahap ketiga peningkatan *pelipatgandaan, pertumbuhan dan perakaran tunas*. Setelah 8 minggu dari pemindahan tahap multiplikasi tunas (tahap kedua) dilakukan pemindahan kultur ke dalam media yang diberi tambahan BA dan thidiazuron dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari media sebelumnya. Tahap ini bertujuan untuk lebih meningkatkan lagi tingkat proliferasi eksplan. Media dasar yang digunakan adalah MS konsentrasi normal, karena dari hasil tahap sebelumnya respon kultur dalam media dasar 1/2 MS cenderung mempunyai respon yang kurang baik dalam merangsang pembentukan dan pertumbuhan tunas dibandingkan dengan hara makro dan mikro konsentrasi normal. Hasil penghitungan rata-rata jumlah tunasnya pada tahap tersebut, berpotensi untuk dapat ditingkatkan. Auksin ditambahkan pula dengan maksud untuk merangsang pembentukan akar yang tidak terjadi pada tahap kedua. Untuk mencegah terjadinya keracunan/efek toksik kultur dari metabolisme pertumbuhan eksplan karena penambahan zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi yang relatif tinggi, ditambahkan arang aktif sebagai

antioksidan. Komposisi media pada tahap ketiga adalah:

P_1 (MS + BA 8 mg/l + IBA 1 mg/l + arang aktif 2 g/l)

P_2 (MS + BA 8 mg/l + thidiazuron 0,01 mg/l + IBA 1 mg/l + arang aktif 2 g/l)

P_3 (MS + BA 8 mg/l + thidiazuron 0,1 mg/l + IBA 1 mg/l + arang aktif 2 g/l)

P_4 (MS + BA 8 mg/l + thidiazuron 1,0 mg/l + IBA 1 mg/l + arang aktif 2 g/l)

Pada tahap ini dievaluasi tingkat konsentrasi thidiazuron yang dikombinasikan dengan sitokinin dan auksin terhadap pembentukan, pertumbuhan dan perkembangan tunas kultur lempuyang wangi. Seluruh percobaan dirancang dengan rancangan acak lengkap yang masing-masing perlakuan diulang 10 kali. Peubah yang diamati pada tahap satu dan dua adalah jumlah tunas. Pada tahap ketiga peubah yang diamati meliputi jumlah tunas, jumlah daun, jumlah akar dan tinggi tajuk. Dari nilai rata-rata peubah yang diamati dihitung nilai galat bakunya.

Planlet (tunas berakar) yang morfologinya belum proporsional untuk dikeluarkan dari keadaan in-vitro, dipindahkan lagi pada medium MS + BA (1 mg/l) + IBA (1 mg/l) dan MS (IX) tanpa ZPT.

Selanjutnya untuk pemeliharaan/penyimpanan kultur dalam jangka pendek dan menengah, sebagian planlet dipindahkan ke dalam media yang mengandung hara makro dan mikro *Vi* MS tanpa ZPT untuk memperlambat pertumbuhan kultur, tetapi proses fisiologis masih dapat berlangsung. Hal tersebut dilakukan untuk menyediakan tanaman/kultur apabila diperlukan untuk percobaan selanjutnya dan memperpanjang masa subkultur.

Tahap keempat adalah *aklimatisasi*, tahap tersebut dilakukan pada planlet yang mempunyai perawakan proporsional dan dianggap mampu tumbuh dalam kondisi di luar botol. Pengadaptasian dari lingkungan yang terkontrol (in-vitro) planlet dipindahkan ke dalam media ke lingkungan di luar botol (ex-vitro) tersebut, tanaman dipindahkan pada medium tanah campur kompos dengan perbandingan (1:1), kemudian disimpan di ruangan yang terlindung dari matahari langsung. Planlet dibedakan antara planlet/tanaman berkelompok dan individu (terdiri dari satu tanaman), bertujuan untuk mengetahui

kemampuan hidup dari tanaman tersebut. Untuk menjagakelembaban, tunas-tunas tersebut disungkup dengan plastik transparan yang secara bertahap sungkup tersebut dibuka. Tahap aklimatisasi berlangsung selama 8 minggu, supaya tanaman betul-betul bertahan hidup di lingkungan *ex-vitro*. Selanjutnya tanaman dipindahkan ke luar ruangan, untuk mengetahui kemampuan hidup dan pertumbuhannya di lapangan yang terbuka dan mendapatkan sinar matahari penuh.

HASIL

Tahap Inisiasi

Pada tahap ini teramati ada sebagian kultur terkontaminasi mikroorganisma yang mengganggu pertumbuhan eksplan; pada minggu pertama setelah inokulasi 10-20 % kultur terkontaminasi. Dari pengamatan pada kultur yang berumur 8 minggu, didapatkan hasil bahwa perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh sitokinin (kinetin dan adenin sulfat) secara tunggal atau dikombinasikan mampu merangsang pembentukan tunas. Sementara kultur dalam medium dasar tanpa ZPT yaitu ¹A MS (0) dan 1 MS (0) belum berhasil membentuk tunas, setelah 20 minggu dipindahkan ke dalam media dengan komposisi yang sama, eksplan tersebut berhasil membentuk tunas.

Rataan jumlah tunas yang cenderung meningkat, terjadi pada kultur yang ditambah kombinasi antara kinetin dan adenin sulfat. Perlakuan penambahan 2 jenis

sitokinin yaitu kinetin (2 mg/1) dan adenin sulfat (5 mg 1) berhasil membentuk tunas terbanyak (5-6), bila dibandingkan dengan kultur dalam medium yang ditambah kinetin ataupun adenine sulfat saja (Tabel 1).

Pada kultur lempuyang wangi, tampak ZPT sitokinin selain mendorong pembentukan tunas, berhasil pula mempercepat periode dormansi. Karena kultur dalam medium tanpa ZPT belum memperlihatkan adanya pertumbuhan dan tunas belum terbentuk, walaupun secara visual kultur masih tampak hidup.

Tahap Multiplikasi

Seluruh kultur yang ditanam dalam media yang diberi tambahan sitokinin BA (2 mg/1) yang dikombinasikan dengan thidiazuron (0,01 mg/1) tanpa ataupun ditambah auksin 2,4D (0,5 mg/1) berhasil membentuk sejumlah tunas, baik pada media dasar V4 MS ataupun 1 MS. Nilai rata-ran jumlah tunas pada kultur setelah 8 minggu dari saat pemindahan (tahap kedua), tampak cenderung menurun terutama pada kultur dalam media yang mengandung auksin 2,4D (0,5 mg/1). Walaupun pada tahap ini tingkat proliferasi eksplan belum optimal, tetapi pembentukan tunas sangat dipengaruhi oleh keberadaan sitokinin dalam media. Hal tersebut dapat diamati pada kultur dalam media tanpa sitokinin hanya berhasil membentuk 1-2 tunas saja, sedangkan kultur dalam media yang ditambah BA (2 mg/1) dan thidiazuron (0,01) menghasilkan nilai rata-ran tunas tertinggi sejumlah (8-9).

Tabel 1. Pengaruh perlakuan zat pengatur tumbuh sitokinin (kinetin dan adenin sulfat) terhadap pembentukan tunas kultur lempuyang wangi.

Konsentrasi Media Dasar (MS)	Kinetin (mg/1)	Adenin Sulfat (mg/1)	Rataan Jumlah Tunas
I, - Vi X	0	0	0,00 ± 0,00
I2-V2X	2	0	3,80 ± 0,40
I3-I/2X	2	5	4,33 ± 0,30
I4-IX	0	0	0,00 ± 0,00
Is-1X	2	0	5,33 ± 0,13
I ₆ -1X	2	5	5,73 ± 0,5*)

Keterangan : *) = nilai rata-ran yang tertinggi

Angka-angka yang tercantum pada tabel merupakan jumlah rata-ran ± galat baku

Tabel 2. Pengaruh perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh sitokinin (BA dan thidiazuron) dan auksin (2,4D) terhadap pembentukan tunas kultur lempuyang wangi

Media dasar (MS)	BA (mg/l)	Thidiazuron (mg/l)	2,4D (mg/l)	Jumlah tunas	Kalus (%)
M, - 1/2 X	0	0	0	1,00 ± 0,00	-
M ₂ - V* X	2	0,01	0	5,38 ± 0,20	-
M ₃ - 1/4 X	2	0,01	0,5	4,80 ± 0,60	10-15
M ₄ - IX	0	0	0	1,2 ± 0,8	-
M ₅ - IX	2	0,01	0	8,33 ± 0,7*)	-
M ₆ - 1X	5	0,01	0,5	7,13 ± 0,60	20-25

Keterangan : *) = nilai rata-rata yang tertinggi

Angka-angka yang tercantum pada tabel merupakan jumlah rata-rata ± galat baku

Tabel 3. Pengaruh perlakuan BA, thidiazuron dan IBA pada pembentukan dan perkembangan kultur lempuyangwangi

Media	BA (mg/l)	IBA (mg/l)	thidiazuron (mg/l)	arang aktif (mg/l)	Jumlah tunas	Jumlah daun	Jumlah akar	Panjang tajuk (cm)
P ₁	8	1	0	2000	6,8±0,22	*)4,2±0,08	*)22,0±0,2	11,1±0,17
P ₂	8	1	0,01	2000	9,2±0,29	3,20±0,08	15,0±0,31	3,82±0,09
P ₃	8	1	0,1	2000	*)17,0±0,35	2,20±0,080	19,8±0,24	*)13,6±0,06
P ₄	8	1	1,0	2000	6,20±0,22	0	15,6±0,34	3,04±0,08

Keterangan : *) = nilai rata-rata yang tertinggi

Angka-angka yang tercantum pada tabel merupakan jumlah rata-rata ± galat baku

Perlakuan penambahan kombinasi antara sitokinin dan thidiazuron, serta auksin cenderung menurunkan jumlah tunas yang terbentuk bila dibandingkan dengan kultur dalam media yang ditambah BA dan thidiazuron tanpa 2,4D. Sebagian kultur dalam media tersebut dapat membentuk akar walaupun jumlahnya relatif kecil (2-6) dan sebagian lagi membentuk kalus (20%), tetapi kalus tersebut belum mampu regenerasi (Tabel 2).

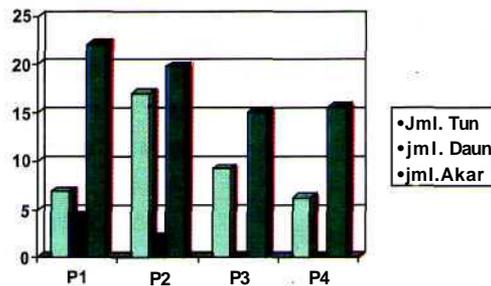
Tahap peningkatan pelipatgandaan tunas, perakaran dan pemeliharaan kultur

Pada percobaan tahap ketiga ini tampak, bahwa kultur yang diberi perlakuan kombinasi antara sitokinin, thidiazuron dan auksin berhasil membentuk tunas ganda dan akar. Respon positif dari eksplan tersebut tampak nyata pada kultur dalam media yang diberi perlakuan penambahan thidiazuron 0,1 mg/l,

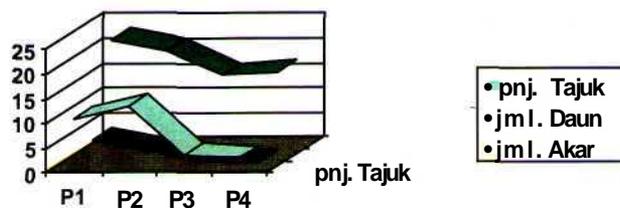
menunjukkan tingkat proliferasi ekplan yang optimal. Nilai rata-rata jumlah tunas, akar dan panjang tajuk tertinggi, dicapai oleh kultur dalam media tersebut. Ada kecenderungan jumlah tunas yang semakin banyak, menurunkan pembentukan daun. Penambahan thidiazuron >0,1 mg/l (1 mg/l) mengakibatkan menurunnya jumlah rata-rata tunas dan parameter lainnya yaitu jumlah akar, panjang tajuk dan jumlah daun (Tabel 3).

Planlet yang dihasilkan dari percobaan tahap ketiga setelah 8 minggu dari saat pemindahan mempunyai morfologi yang proporsional dan siap dipindahkan ke luar botol untuk diaklimatisasikan. Sementara tunas yang relatif masih kecil, karena ada kecenderungan jumlah tunas yang banyak dalam satu botol mempunyai ukuran panjang tajuk yang lebih pendek. Setelah 8 minggu dari saat pemindahan ke dalam media MS +

Gambar 1. Pengaruh perlakuan ZPT terhadap pertumbuhan dan perkembangan kultur lempuyangwangi



Gambar 2. Pengaruh penambahan ZPT terhadap pertumbuhan dan perkembangan planlet



IBA(1 mg/1) + BA(1 mg/1) dan MS (IX) tanpa ZPT, kultur berhasil membentuk tunas berakar. Sementara kultur dalam media V% MS tanpa ZPT masih tampak hijau/segar sampai 40 minggu dari saat pemindahan dan pertumbuhan tunas tampak berlangsung, sedangkan pembentukan tunas terhambat. Kultur tersebut setelah dipindahkan ke dalam media dengan perlakuan ZPT BA 1 mg/1, tampak tumbuh dan mempunyai respon yang baik. Dari hasil pengamatan, untuk penyimpanan kultur jangka pendek/menengah dapat diaplikasikan komposisi media 'A MS unsur makro tanpa ZPT, sehingga masa subkultur dapat diperpanjang hingga 10-12bulan.

Tahap Aklimatisasi

Planlets (tunas berakar) yang telah mempunyai morfologi yang proporsional yaitu yang berukuran panjang tajuk 13-15 cm, jumlah daun 6-7 dan jumlah akar 22-25, dipindahkan ke dalam media kompos campur tanah (1:1). Untuk menjaga kelembaban dan mendapatkan cahaya yang cukup, tanaman tersebut

diberi sungkup plastik transparan dan ditempatkan di tempat yang terlindung dari matahari langsung. Tanaman tersebut ditanam secara individu atau dikelompokkan (komuniti pot). Setelah 6 minggu dari saat pemindahan tampak ada kecenderungan bahwa tanaman yang ditanam dalam komuniti pot (95% hidup) lebih baik pertumbuhannya dibandingkan dengan tanaman individu (84% hidup). Nilai keberhasilan hidup di lapangan dari tanaman lempuyang wangi hasil perbanyakan *in-vitro* 80%-90%.

PEMBAHASAN

Pengaruh penambahan ZPT terhadap dormansi dan pembentukan tunas pada tahap inisiasi

Kultur yang bebas dari kontaminan merupakan modal yang penting dalam keberhasilan kultur *in-vitro*. Pada tahap ini bahan sterilant dengan konsentrasi dan waktu yang tepat menentukan keberhasilan pertumbuhan eksplan. Clorox (natrium hipoklorid) merupakan bahan sterilant yang umum digunakan

untuk sterilisasi bahan eksplan dan berhasil mensucihamakan eksplan *Z. zerumber* var. *aromaticum* hingga 80%.

Dormansi sering terjadi pada tumbuhan yang berumbi termasuk lempuyang wangi. Namun ZPT sitokinin dapat mempercepat masa dormansi tersebut, dari hasil pengamatan pada minggu pertama tampak kultur yang diberi penambahan sitokinin BA dan adenine sulfat baik secara tunggal ataupun dengan dikombinasikan telaji berhasil membentuk tunas, sementara kultur dalam medium tanpa ZPT belum berhasil membentuk tunas hingga tahap inisiasi selesai. Peran ZPT dapat mempercepat periode dormansi tersebut, teramati pula pada kultur sejumlah jenis tumbuhan / tanaman berkayu dan herba seperti apel dan amarilis (Powell *et al*, 1980; Hoesen, 2003).

Pembentukan dan perkembangan tunas (proliferasi eksplan) pada tumbuhan suku Zingiberaceae telah diketahui dipengaruhi oleh keberadaan sitokinin dalam media. Hal ini teramati pula pada kultur lempuyang wangi (Tabel 1) yang dirunjukkan oleh nilai rata-rata jumlah tunas yang lebih tinggi, pada kultur dalam media yang diberi tambahan kinetin (2 mg/l) dan adenine sulfat (5 mg/l) baik secara tunggal dan dikombinasikan dibandingkan dengan kultur pada media tanpa ZPT. Keadaan yang hampir sama terjadi pula pada kultur tanaman yang termasuk suku Zingiberaceae lainnya yaitu dari marga *Alpinia*, *Kaempferia*, *Curcuma* dan marga lainnya (Hoesen, 1994; Illg dan Faria, 1995; Hoesen, 1998; Hoesen *et al*, 1998).

Pengaruh zpt terhadap multiplikasi tunas

Dari hasil percobaan inisiasi dan tahap multiplikasi tunas tampak bahwa kultur lempuyang wangi ini mempunyai kecenderungan dipengaruhi oleh konsentrasi hara makro dan mikro dari medium dasarnya. Hal ini terlihat pada nilai rata-rata tunas kultur dalam media dasar Vi MS yang cenderung lebih kecil bila dibandingkan dengan nilai rata-rata tunas pada kultur dalam medium dasar MS konsentrasi normal (Tabel 1 dan 2). Kejadian yang serupa teramati pula pada percobaan kultur *Kaempferia rotunda* (Hoesen, 1998). Pada beberapa penelitian teramati bahwa selain zat pengatur tumbuh, yang menentukan keberhasilan kultur secara in-vitro antara lain adalah garam-garam

mineral makro terutama rasio antara amonium dengan nitrat yang mempengaruhi terjadinya diferensiasi, pertumbuhan dan perkembangan eksplan atau pembentukan organ (Preece, 1995).

Zat pengatur tumbuh BA yang ditambahkan secara tunggal atau dikombinasikan dengan auksin dilaporkan dapat menginduksi pembentukan tunas kultur pada sejumlah jenis tumbuhan termasuk jenis dari suku Zingiberaceae, yaitu beberapa klon jahe (jahe gajah dan jahe merah) dan kultur *Alpinia purpurata* (Imelda, 1992; Hoesen dan Poerba, 1992; Illg dan Faria, 1995).

ZPT lainnya ditambahkan pula pada media kultur lempuyang wangi yaitu thidiazuron. Thidiazuron adalah suatu senyawa yang mempunyai daya aktif seperti sitokinin dan diketahui dapat menstimulasi proliferasi kultur beberapa jenis tanaman berkayu, seperti tanaman apel, *Praximus americanus*, *Plumbago zeylanica* dan tanaman berbatang basah seperti jenis-jenis dari suku Zingiberaceae ini (*Kaempferia rotunda*) (van Niewkerk *et al*, 1986; Pierik, 1987; Bates *et al*, 1992; Hoesen, 1998).

Penambahan sitokinin dan auksin secara bersama-sama dalam media cenderung memperlihatkan respon yang kurang baik; hal ini teramati pada percobaan tersebut bahwa sitokinin (BA dan thidiazuron) yang dikombinasikan dengan 2,4D cenderung menurunkan jumlah rata-rata tunas kultur dibandingkan dengan kultur dalam media yang mengandung sitokinin saja tanpa 2,4D. Kejadian tersebut teramati pula pada kultur *Gynuraproscumbens* (Hoesen, 2001), diduga karena auksin yang terkandung dalam media bersifat antagonis terhadap aktifitas sitokinin. Sitokinin dalam medium menyebabkan terurainya sitokinin endogen, penguraian ini sejalan dengan peningkatan penambahan auksin sehingga aktifitas sitokinin menjadi berkurang. Dengan demikian pembentukan tunas menjadi terhambat (Palni *et al*, 1988). Di lain pihak efek sinergis dari auksin dan sitokinin memberikan respon yang baik terhadap eksplan kultur *Alpinia purpurata*, di mana jumlah tunas malahan semakin meningkat pada media yang mengandung kombinasi BA dan NAA atau IAA (Illg dan Faria, 1995). Efek sinergis antara auksin dan sitokinin tersebut

berpengaruh positif terhadap pembentukan tunas kultur amarilis (Hoesen, 2003). Dari kejadian tersebut tampak bahwa penambahan ZPT dari luar tidak mutlak tergantung pada jenis tumbuhannya, karena dalam konsentrasi tertentu ZPT dapat bersifat antagonis terhadap aktifitas hormon endogen dalam tanaman.

Sebagian kecil (10-25 %) kultur dalam medium yang mengandung 2,4D membentuk kalus (Tabel 2), tetapi kalus tersebut belum berhasil berdiferensiasi. Hasil pengamatan pada penelitian kultur jaringan sejumlah jenis tumbuhan dan tanaman, 2,4 D cenderung mendorong pembentukan kalus (Narayanawamy, 1994)

Pengaruh zpt terhadap pelipatgandaan tunas dan pembentukan akar

Pada percobaan tahap ini, thidiazuron dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari media tahap sebelumnya ditambahkan ke dalam media yang mengandung BA dan IBA. Kombinasi ZPT dengan konsentrasi yang tepat dapat meningkatkan pembentukan tunas kultur lempuyang wangi. Thidiazuron 0.1 mg/l + BA (8 mg/l) + IBA (1 mg/l) + arang aktif (2 g/l) tampak mendorong pembentukan tunas secara optimal, tetapi semakin ditingkatkan lagi konsentrasi thidiazuron hingga 1 mg/l tampak pertumbuhan dan perkembangan tunas menurun dengan nyata, walaupun diaplikasikan juga arang aktif sebagai zat antioksidan. Dari hasil pengamatan ini terlihat ada kecenderungan konsentrasi yang meningkatkan pembentukan tunas, menurunkan bahkan menjadi toksik dan berpengaruh pula terhadap pertumbuhan panjang tunas (Tabel 3, Gambar 1 dan Gambar 2). Konsentrasi thidiazuron 0,1 mg/l dalam media yang mengandung BA (8 mg/l), IBA (1 mg/l) dan arang aktif (2 g/l) menghasilkan nilai rata-rata tertinggi pada jumlah tunas dan peubah lainnya dibandingkan dengan kultur dalam media lainnya (thidiazuron 1 mg/l dan 10 mg/l). Zat antioksidan (arang aktif) pada percobaan tersebut tidak mampu menetralkan senyawa kimia yang dikeluarkan eksplan selama proses pertumbuhannya.

Seluruh kultur berhasil membentuk sejumlah akar, perlakuan penambahan IBA 1 mg/l + BA 8 mg/l + arang aktif 2 g/l tanpa thidiazuron menghasilkan jumlah rata-rata akar yang terbanyak. ZPT (auksin) dalam

proses morfogenesis mendorong pembentukan *Witr* atau akar, pada percobaan ini tampak sebagian *tu-aE* berakar (planlet) dapat langsung dipindahkan pada media untuk percobaan aklimatisasi karena mempunyai perawakan yang proporsional. Sementara tunas yang berukuran relatif lebih kecil walaupun telah mempunyai akar, dipindahkan ke dalam media yang mengandung BA 1 mg/l dan IBA 1 mg/l dan setelah 8 minggu berhasil membentuk tunas yang berakar dengan perawakan yang baik.

Pada percobaan ini diketahui metode pemeliharaan/penyimpanan kultur untuk jangka pendek atau menengah dengan mengisolasi tunas dalam media 'A MS tanpa ZPT. Cara penyimpanan *in vitro* tersebut telah berhasil diaplikasikan juga pada kultur tanaman sambung nyawa (Hoesen, 2001).

Aklimatisasi

Percobaan aklimatisasi dilakukan dalam ruangan yang terlindung dari sinar matahari langsung. Setelah 8 minggu dari saat pemindahan, planlet yang ditanam berkelompok berhasil tumbuh dengan perkembangan yang lebih baik dibandingkan dengan planlet yang ditanam secara individu. Tampaknya setiap planlet dalam kelompok tersebut dapat saling menunjang dalam mendapatkan hara dan air. Keadaan ini erat hubungannya dengan keberadaan akar dari planlet yang berkelompok jumlahnya lebih banyak dibandingkan dari individunya sehingga penyerapan hara dan air akan lebih optimal.

KESIMPULAN DAN SARAN

Teknik perbanyakan lempuyang wangi secara *in vitro* telah dikuasai; media dasar MS dengan perlakuan ZPT (auksin, sitokinin dan thidiazuron) dengan konsentrasi yang tepat dapat menginduksi proliferasi eksplan rimpang lempuyang wangi secara optimal. Pembentukan tunas kultur lempuyang wangi mencapai kelipatan 17 dalam kurun waktu 8 minggu. Dengan demikian dalam waktu satu tahun akan dihasilkan sejumlah besar tanaman. Media MS + BA 8 mg/l + IBA 1 mg/l dan MS + BA 1 mg/l + IBA (1 mg/l) dapat membentuk tunas berakar (planlet) dengan perawakan yang baik dan proporsional. Media 'Ax MS hara makro dapat memperpanjang masa subkultur hingga 12 bulan. Dengan dikuasainya teknik

perbanyakannya ini diharapkan dapat memenuhi ketersediaan bibit secara massal, sehingga untuk penyediaan bahan dasar industri farmasi dan kosmetika dapat terpenuhi dan agroindustri tumbuhan obat akan terwujud.

Percobaan selanjutnya berpeluang untuk mencoba menghasilkan rimpang secara *in vitro*, mengingat bagian rimpang tersebut dari tanaman lempuyang wangi yang bernilai ekonomi tinggi dibandingkan dengan bagian tumbuhan lainnya. **Sehingga** proses produksi relative lebih cepat dibandingkan dengan cara konvensional.

DAFTAR PUSTAKA

- Hoesen DSH dan Poerba YS. 1992.** Perbanyak tanaman jahe merah (*Zingiber officinale* Rose. var. Roebra.) dengan teknik kultur jaringan. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi*, 324-328. Puslitbang Bioteknologi-LIPI. Bogor.
- Hoesen DSH. 1996.** Pembentukan tunas kencur secara *in vitro*. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 3(2), 21-23.
- Hoesen DSH, Sumarnie dan Panggabean G. 1996.** Kultur jaringan temu gleyeh (*Curcuma soloensis* Val.). *Prosiding Simposium Nasional I Tumbuhan Obat dan Aromatik APINMAR* 272-277.
- Hoesen DSH. 1998.** Kultur jaringan kunir putih (*Kaempferia rotunda* L.) *Berita Biologi* 4(4), 175-182.
- Hoesen DSH, Syarif F dan Witjaksono. 1998.** Pembentukan dan pertumbuhan tunas temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) secara *in vitro*. *Makalah disampaikan pada Seminar Nasional XIV Tumbuhan Obat Indonesia tanggal 22-23 September 1998*.
- Hoesen DSH. 2003.** Perbanyak *Amaryllis* sp. (Amaryllidaceae) {*In vitro* propagation of *Amaryllis* sp. (Amaryllidaceae)}. *Gakuryoku*. IX (2), 159-163
- Ikeda RL and Takabe MJ. 1989.** *In vitro* subculture application for ginger. *Hort. Science* 24, 142-143.
- Linelda M. 1992.** Penyediaan bibit jahe gajah dengan teknik biak jaringan. *Prosiding Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi*, 335-340.
- Illg RD and Faria RT. 1995.** Micropropagation of *Alpinia purpurata* from inflorescence buds. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 40, 183-185.
- Mariska I, Seswita D dan Gati E. 1996.** Aplikasi kultur jaringan untuk perbanyak klonal tanaman kencur. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 3(2), 11-13.
- Narayanaswamy S. 1994. *Plant Cell and Tissue Culture*. Tata Me Graw Hill. New Delhi.
- Palni LMS, Burch L and Horgan R. 1988.** The effect of auxin concentration on cytokinin stability and metabolism. *Planta* 174, 231-234.
- Powell LE, Borkoskwa B and Singha S. 1980.** Dormancy status of apple buds and abscisic acid relationship. *Plant Physiology* 65, 92 (Suppl.) (Abstr. 502).
- Preece JE. 1995. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators (?). *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1(1), 26-27.
- Skoog F and Miller CO. 1957.** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symposium Society Experimental Biology* 15, 118-137.
- Sulianti SB, Agusta A and Chairul. 1998.** Perbandingan komposisi senyawa kimia penyusun minyak atsiri pada tiga jenis lempuyang (*Zingiber amaricans*, *Z. aromaticum* dan *Z. zerumbet*) sehubungan dengan pemanfaatan rimpang sebagai bahan obat tradisional. *Makalah disampaikan pada Seminar Nasional Etnobotani HI*, tanggal 5-6 Mei 1998, di Denpasar Bali.
- van Niewkwerk OP, Zimmerman RH and Fordham I. 1986.** Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. *Hort. Science* 21, 516-518.
- Wareing PF and Philipis IDJ. 1981.** *Growth Differentiation in Plants*. Pergamon. New York.
- Wolff XY, Astuti IP and Brink M. 1999.** *Zingiber* GR Boehmer. *Spices. PROSEA* 13, 233-238. Jakarta.