

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Wasabi

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Wasabi (*Wasabia japonica*) adalah tanaman asli Jepang dari suku kubis-kubisan (*Brassicaceae*). Parutan rimpang (rizoma) yang juga disebut wasabi, di makan sebagai penyedap masakan Jepang dan rizoma memiliki aroma harum, sekaligus rasa tajam menyengat hingga ke hidung seperti mustar, tapi bukan pedas di lidah seperti cabai (Chadwick, 2000). Tanaman wasabi ini telah dibudidayakan sejak berabad yang lalu karena dimanaatkan sebagai bahan pangan dan obat khususnya bumbu masakan. Habitat wasabi di alam bebas hanya tumbuh liar di daerah beriklim sejuk, di lembah pinggiran sungai atau di tengah air bersih yang mengalir perlahan-lahan. Wasabi tumbuh liar di sepanjang aliran sungai yang bersih dan sejuk (10°C - 17°C) di daerah pegunungan pulau Honshu, Kyushu, dan Shikoku. Kondisi lingkungan tempat tumbuh wasabi biasanya pada ketinggian diatas 1.000 m dan kelembaban sekitar 70% - 90 % (Clemensen, 2010).

Berdasarkan morfologinya, tanaman wasabi terdiri beberapa bagian yaitu bunga, buah, daun, dan akar (gambar 2). Daun tanaman wasabi membentuk rumpun dengan daun – daun yang keluar dari akar tunggangnya. Tingginya antara 2 kaki (61 cm) hingga 3 kaki (91,7 cm) atau dapat lebih tinggi ketika sedang berbunga. Bentuk dan panjang tangkai daun bervariasi sesuai masa pertumbuhannya (Wedelsback, 2014). Buah wasabi berbentuk bulat, sedikit bergelombang dan

berwarna coklat, dapat menampung 4-6 biji (wright, 2011). Bijinya oval, berwarna gelap dan sangat kecil (300 – 500 biji per 1 gram). Bila biji berukuran lebih besar maka memiliki kualitas terbaik. Perkecambahan biji sangat rendah (20 – 25%) (Shehata, 2008). Jenis akar tanaman wasabi ini yaitu akar tunggang dan bercabang, permukaannya berwarna putih hingga coklat muda, sedangkan bagian dalamnya berwarna putih kecoklatan. Panjang akar utamanya dapat mencapai satu kaki (30, 48 cm). Seluruh sistem perakarannya mampu memperluas areanya hingga beberapa kaki ke dalam tanah tergantung usia tanaman (Chadwick, 2000).



Gambar 2 Tanaman Wasabi

Wasabi merupakan tanaman herba tahunan, seluruh bagian tanaman memiliki aroma harum sekaligus rasa pedas menyengat bila dimakan. Rizoma berwarna hijau terang, berbentuk bulat panjang dan mengecil di bagian bawah. Daun keluar langsung dari bagian rizoma, tangkai agak panjang dan tumbuh ke atas dengan daun yang melebar. Daun berbentuk seperti jantung, diameter sekitar 10cm. Di musim semi, dari rizoma keluar tangkai untuk bunga, letak daun bersilangan, dan ukuran daun lebih kecil dari daun yang keluar langsung dari rizoma. Bunga keluar di ujung

tangkai, mekar di akhir bulan Februari-Maret, berwarna putih, daun mahkota 4 helai, dan mekar tidak secara berturut-turut (Miles dan Catherine, 2008)

Klasifikasi ilmiah wasabi menurut Miles *dkk*, (2000) sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Brassicales
Famili : Brassicaceae
Genus : Wasabia
Spesies : *Wasabia japonica*

2.1.2 Tanaman wasabi dalam kultur *in vitro*

Perbanyakan tanaman wasabi dapat dikembangkan dengan biji. Masalah yang dihadapi pada budidaya tanaman ini yaitu bijinya mempunyai viabilitas yang sangat rendah (kurang dari 3%) dan tidak mempunyai masa dormansi (wedelsback, 2014). Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan melakukan perbanyakan melalui kultur jaringan. Pertumbuhan tanaman ini juga sering terganggu oleh infeksi virus. Oleh karena itu, agar memperoleh tanaman yang bebas virus dapat dilakukan dengan perbanyakan vegetatif secara *in vitro*.

Meskipun belum banyak orang yang membudidayakan tanaman wasabi secara *in vitro*, namun penelitian mengenai wasabi ini khususnya dalam pertumbuhan tunas cukup banyak. Seperti percobaan yang dilakukan oleh Yoshida

(2015), menunjukkan bahwa media MS yang ditambahkan dengan 0,1 mg/l 2,4-D dan 0,1 mg/l BA dapat membentuk tunas baru wasabi. Sedangkan pada medium yang mengandung lebih dari 0,1 mg/l 2,4-D, eksplan membentuk jaringan kalus dan pada media dengan 10 mg/l 2,4-D membentuk kalus berwarna coklat tetapi tidak beregenerasi.

Tanaman wasabi dalam kultur *in vitro* ini lebih menekankan terhadap regenerasi dalam hal multiplikasi tanaman. Shehata (2008), juga mencoba menumbuhkan tanaman wasabi ini dengan media MS dengan penambahan 1 mg/l NAA dan 0,1 – 0,5 mg/l kinetin untuk menghasilkan tunas. Tunas adventif tumbuh setelah 56 hari, mudah berakar dan teraklimatisasi dengan baik dalam rumah kaca.

2.2 Kultur Jaringan

Kultur jaringan merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian tanaman, seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan atau organ serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh kembali. Melalui teknik ini bibit dapat diproduksi dalam jumlah yang besar, seragam, bebas hama dan penyakit serta penyediaannya secara kontinyu. Teknik ini juga memungkinkan manipulasi sel dan molekul untuk memperbaiki sifat tanaman serta mempertinggi produksi dan kualitasnya (Lawalata, 2011).

Perbanyakannya secara alami nutrisi diperoleh secara alami dari dalam tanah, tanaman dapat membuat makanannya sendiri (autotrof), sumber tanaman harus cukup umur, fotosintesis dengan bantuan matahari sehingga dipengaruhi oleh musim sedangkan perbanyakannya dengan kultur jaringan media terbuat dari nutrisi

kimia, tanaman tidak membuat makanannya sendiri, sumber tanaman sedikit, fotosintesis dengan cahaya lampu, tidak dipengaruhi musim (Lestari, 2011). Adapun kelebihan dari kultur jaringan diantaranya sifat identik dengan induknya, perbanyak dalam waktu singkat, tidak perlu areal pembibitan yang luas, tidak dipengaruhi oleh musim, dan tanaman bebas jamur dan bakteri. Sedangkan kekurangan dari kultur jaringan ini yaitu bibit hasil kultur jaringan sangat rentan terhadap hama penyakit dan udara luar, bagi orang tertentu cara kultur jaringan dinilai mahal dan sulit, membutuhkan modal investasi awal yang tinggi untuk bangunan (laboratorium khusus), peralatan dan perlengkapan, diperlukan persiapan SDM yang handal untuk mengerjakan perbanyak kultur jaringan agar dapat memperoleh hasil yg memuaskan, serta produk kultur jaringan pada akhirnya kurang kokoh.

2.3 Kendala Dan Masalah yang Dapat Terjadi Pada Kultur Jaringan

Adapun masalah-masalah yang terjadi dalam kultur jaringan menurut Hayati dkk, (2010) yaitu:

1. Kontaminasi

Kontaminasi adalah gangguan yang sangat umum terjadi dalam kegiatan kultur jaringan. Munculnya gangguan ini bila dipahami secara mendasar adalah merupakan sesuatu yang sangat wajar sebagai konsekuensi penggunaan yang diperkaya. Fenomena kontaminasi sangat beragam, keragaman tersebut dapat dilihat dari jenis kontaminasinya (bakteri, jamur, virus, dll). Hal yang mengakibatkan terjadinya kontaminasi diantaranya

karena tidak kuatnya tutup botol, penyimpanan media steril yang kurang steril, pembukaan autoclave pada saat sterilisasi yang berpeluang untuk masuknya kontaminan kedalam botol, terjadinya pengerasan pada media saat pemasakan media atau masuknya kontaminan pada saat pemasakan media, dan kondisi praktikan yang tidak aseptik.

2. Pencoklatan / browning

Pencoklatan adalah suatu karakter munculnya warna coklat atau hitam yang sering membuat tidak terjadinya pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Peristiwa pencoklatan sesungguhnya merupakan peristiwa alamiah yang biasa yang sering terjadi. Pencoklatan umumnya merupakan suatu tanda-tanda kemunduran fisiologi eksplan dan tidak jarang berakhir pada kematian eksplan. Browning terjadi akibat adanya senyawa fenol yang beroksidasi dengan oksigen membentuk senyawa kinon, dan membuat terjadinya perubahan warna coklat atau hitam pada tanaman.

3. Vitrifikasi

Vitrifikasi adalah suatu istilah problem pada kultur yang ditandai dengan: Munculnya pertumbuhan dan pertumbuhan yang tidak normal. Tanaman yang dihasilkan pendek-pendek atau kerdil. Pertumbuhan batang cenderung ke arah penambahan diameter Tanaman utuhnya menjadi sangat turgescens. Pada daunnya tidak memiliki jaringan palisade. Vitrifikasi ini disebabkan karena tingginya kelembaban dalam wadah kultur.

4. Variabilitas Genetik

Variasi genetik dapat terjadi pada kultur in vitro karena laju multiflikasi yang tinggi, variasi terjadi karena terjadinya sub kultur berulang yang tidak terkontrol. Penggunaan teknik yang tidak sesuai. Variasi genetik yang paling umum terjadi pada kultur kalus dan kultur suspensi sel, hal tersebut terjadi karena munculnya sifat instabilitas kromosom mungkin akibat teknis kultur, media atau hormon.

5. Pertumbuhan dan Perkembangan

Masalah utama berkaitan dengan proses pertumbuhan adalah bila eksplan yang ditanam mengalami stagnasi, dari mulai tanam hingga kurun waktu tertentu tidak mati tetapi tidak tumbuh. Untuk menghindari hal itu dapat dilakukan dengan preventif menghindari bahan tanam yang tidak juvenil atau tidak meristematik. Karena awal pertumbuhan eksplan akan dimulai dari sel-sel yang muda yang aktif membelah, atau dari sel-sel tua yang muda kembali.

6. Pra perlakuan

Pra perlakuan dilakukan umumnya untuk tujuan-tujuan tertentu, secara umum adalah dalam rangka menghilangkan hambatan. Hambatan dapat berupa hambatan kemikalis, fisik, biologis. Hambatan berupa bahan kimia penanganannya harus dimulai dari pengenalan senyawa aktif, potensi gangguan, proses reaksi dan alternatif pengelolaannya.

7. Lingkungan Mikro

Masalah lingkungan inkubator juga tidak bisa diabaikan karena ini juga sering menjadi masalah. Suhu ruangan inkubator sangat menentukan optimasi pertumbuhan eksplan, suhu yang terlalu rendah atau tinggi dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan pada eksplan.

2.4 Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh merupakan senyawa organik bukan nutrisi tanaman, aktif dalam konsentrasi rendah yang merangsang, menghambat atau merubah pertumbuhan serta perkembangan tanaman secara kuantitatif maupun kualitatif. Penggunaan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh tertentu dapat mengatur arah pertumbuhan suatu tanaman (Nugroho dan Sudito, 2000).

Kultur jaringan memerlukan media buatan yang terdiri dari unsur makro dan mikro dalam bentuk garam, asam amino, vitamin, suplemen organik lain, sumber karbon, dan ZPT. Media yang akan digunakan bergantung pada tujuan dan jenis tanaman serta jenis dan umur jaringan yang akan dikulturkan. Media MS, pertama kali digunakan oleh Skoog dalam penumbuhan kultur tembakau. Murashige disempurnakan dengan cara mengatur komposisi garam anorganiknya. Media MS mengandung 40 mM N dalam bentuk NO dan 29 mM dalam bentuk NH₄⁺. Konsentrasi ini lebih besar dibandingkan dengan media-media lainnya. Walaupun unsur-unsur makro dalam media MS dibuat untuk kultur kalus tembakau, namun komposisinya mampu mendukung kultur jaringan tanaman lain (Roostika *dkk*, 2005).

Teorinya pada kultur jaringan terdapat 2 golongan ZPT yang sangat penting, yaitu auksin dan sitokinin. Interaksi antara ZPT tersebut dengan hormon yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur. Menurut Lestari (2011) penambahan auksin dan sitokinin eksogen mengubah level ZPT endogen sel. Level ZPT ini merupakan *triggering* faktor untuk proses-proses yang tumbuh dan morfogenesis. Selain auksin dan sitokinin, terdapat ZPT lain yang diberikan dalam media kultur, yaitu giberelin dan asam absisat.

Sitokinin merupakan ZPT yang penting dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis. Salah satu jenis sitokinin sintetik adalah BAP (benzil adenin atau benzil aminopurin). Fungsi sitokinin bersama dengan auksin berpengaruh terhadap pembentukan batang dan akar. Perbandingan relatif konsentrasi ZPT golongan auksin dan sitokinin dapat mengatur proses diferensiasi secara *in vitro*. Perbandingan konsentrasi auksin yang lebih tinggi dari sitokinin dapat menyebabkan terangsangnya pembentukan akar. Sebaliknya bila konsentrasi sitokinin lebih tinggi dari auksin, maka akan terbentuk pucuk (Hendaryono, 2000).

Hormon NAA adalah senyawa kimia yang termasuk dalam golongan auksin sedangkan BAP termasuk dalam golongan sitokinin yang berperan dalam pertumbuhan tunas. Zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin tidak bekerja sendiri-sendiri, tetapi kedua ZPT tersebut bekerja secara berinteraksi dalam mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Karjadi dan Buchory (2007) mengemukakan bahwa sitokinin merangsang pembelahan sel tanaman dan berinteraksi dengan auksin dalam menentukan arah diferensiasi sel. Apabila perbandingan konsentrasi sitokinin lebih besar dari auksin, maka pertumbuhan

tunas dan daun akan terstimulasi. Sebaliknya apabila sitokinin lebih rendah dari auksin, maka mengakibatkan menstimulasi pada pertumbuhan akar. Apabila perbandingan sitokinin dan auksin berimbang, maka pertumbuhan tunas, daun, dan akar akan berimbang pula.

NAA dan BAP berpengaruh positif terhadap percepatan munculnya tunas adventif pada eksplan, ini diduga karena penggunaan konsentrasi yang tepat pada NAA dan BAP sehingga memacu percepatan waktu inisiasi tunas. Hal ini sesuai dengan literatur Lestari (2011) yang menyatakan bahwa dalam proses pembentukan organ seperti tunas atau akar ada interaksi antara zat pengatur tumbuh eksogen yang ditambahkan ke dalam media dengan zat pengatur tumbuh endogen yang diproduksi oleh jaringan tanaman.

2.5 Peran NAA Dalam Kultur *In Vitro*

Auksin digunakan pada mikropropagasi dan ditambahkan ke dalam nutrisi media untuk mendukung pertumbuhan kalus, suspensi sel atau organ (seperti meristem, tunas atau ujung akar) dan untuk mengatur morfogenesis terutama jika digabungkan dengan sitokinin (George dan Sherrington, 1984). Selain itu NAA sebagai auksin berperan untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus (Rohmah, 2014).

Penambahan NAA pada media MS dengan konsentrasi diatas 0,1 ppm dapat mempercepat tumbuhnya tunas dan akar khususnya pada eksplan, karena konsentrasi NAA yang ditambahkan dapat merangsang pertumbuhan akar. Sedangkan penambahan NAA 0,9 ppm pada media MS dapat meningkatkan berat basah kalus asparagus dengan cepat. Kombinasi jenis sitokinin dan NAA yang

terbaik untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan eksplan asparagus ialah 0,3 ppm kinetin dan 0,9 ppm NAA (Simatupang, 1996).

Zia et al. (2007) melaporkan bahwa pada media dengan penambahan BAP yang dikombinasikan dengan NAA, 2,4-D atau IBA menghasilkan respon pembentukan kalus pada *Artemisia absinthium L.* sebesar 100%. Kalus ini merupakan salah satu indikator dari berkembangnya bagian akar akibat auksin. Kombinasi 0,5 mg/l BAP dan 0,05–0,25 mg/l NAA dapat memproduksi kalus yang hijau, lembut dan friable dari eksplan daun dan batang.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Hikmah (2008), terlihat bahwa hanya media dengan penambahan 0,5 ppm NAA dan 1 ppm NAA tanpa penambahan BAP yang mampu memunculkan akar pada eksplan *A. annua* secara *in vitro*. Namun, penambahan 0,25 ppm NAA pada media kultur belum mampu memunculkan akar. Hal ini diduga karena konsentrasi NAA yang ditambahkan terlalu rendah sehingga eksplan tidak mampu membentuk akar. Perlakuan penambahan 0,5 ppm NAA mampu memunculkan akar yang lebih cepat (15 HST) daripada perlakuan 1 ppm NAA (16,5 HST). Selain itu, Avivi dan Ikrarwati (2004), menyebutkan bahwa konsentrasi NAA yang lebih tinggi dari 1 ppm menyebabkan eksplan pisang abaka membentuk akar dalam waktu yang lebih lama. Jumlah akar ini berkaitan dengan kualitas dan ketahanan eksplan pada kultur itu sendiri. Jumlah akar yang banyak dapat mengoptimalkan penyerapan nutrisi yang ada pada media kultur. Secara visual, akar yang terbentuk pada eksplan *A. annua* berwarna putih, mempunyai percabangan dan terbentuk pada dasar eksplan.

2.6 Peran BAP Dalam Kultur *In Vitro*

Sitokinin alami dihasilkan pada jaringan yang tumbuh aktif terutama pada akar, embrio dan buah. Sitokinin yang diproduksi di akar selanjutnya diangkut oleh xilem menuju sel-sel target pada batang. Sitokinin yang sering digunakan dalam kultur jaringan adalah BAP dan Kinetin. BAP adalah sitokinin yang sering digunakan karena paling efektif untuk merangsang pembentukan tunas, lebih stabil dan tahan terhadap oksidasi serta paling murah diantara sitokinin lainnya (Wattimena, 1992).

Sugiyarto et al., (2012), menyatakan bahwa pada kultur invitro tanaman nilam (*Pogostemon cablin Benth.*) pemberian sitokinin BAP 1 ppm pada media MS menunjukkan perkembangan yang baik yaitu bisa terbentuk planlet yang sempurna yang sudah memiliki akar, batang, daun, serta memunculkan tunas dari eksplan awalnya. Menurut Eni (2008), Penambahan BAP 1 mg/l + NAA 1 mg/l ke dalam media tumbuh zodia, memberikan laju pertumbuhan dengan rata-rata tinggi tunas 6,13 mm. Perlakuan BAP 2 mg/l + NAA 1 mg/l memberikan pengaruh yang tertinggi diantara kelima perlakuan dengan penambahan BAP yang dikombinasikan dengan NAA 1 mg/l, tinggi tunas yang dihasilkan rata-rata 9,50 mm.

Penelitian Rafiq (2007), melaporkan bahwa BAP 2 mg/l dapat menginduksi tunas stevia sebesar 78% dari eksplan dengan rata-rata delapan tunas per eksplan. Mencelupkan sebentar tunas stevia dalam larutan BAP 250 atau 500 mg/l sebelum dikultur pada medium MS meningkatkan multiplikasi tunas 2-5 kali. Sehingga fungsi hormon sitokinin dalam kultur in vitro diantaranya mempunyai beberapa fungsi, antara lain memacu pembelahan sel dalam jaringan meristematik, merangsang diferensiasi sel-sel yang dihasilkan dalam meristem, mendorong

pertumbuhan tunas samping, dominasi apikal dan perluasan daun, merangsang pembentukan pucuk dan mampu memecah masa istirahat biji (breaking dormancy) serta merangsang pertumbuhan embrio.,serta sintesis pembentukan protein akan meningkat dengan pemberian sitokinin.

2.7 Interaksi Antara BAP Dan NAA dalam Kultur *In Vitro*

Tunas adalah bagian vegetatif tanaman yang penting dalam proses pertumbuhan. Tunas yang mampu mendukung pertumbuhan tanaman dengan baik adalah tunas yang tumbuh kuat, tegar dan sempurna. Menurut Triatminingsih et al. (2003), pertumbuhan tunas yang kuat, tegar dan sempurna dipengaruhi oleh adanya konsentrasi BAP dan NAA yang optimum.

Tunas yang pertama kali muncul pada setiap eksplan terbentuk secara langsung dan merupakan hasil pemanjangan mata tunas di bagian ketiak daun (tunas aksilar) ataupun muncul dari nodus. Penambahan Kombinasi BAP dan NAA pada media memacu tumbuhnya tunas aksilar, tetapi eksplan pada perlakuan kontrol tanpa penambahan BAP dan NAA juga berhasil menunjukkan pertumbuhan tunas. Hal ini terjadi karena di dalam eksplan terdapat sitokinin dan auksin endogen dan kandungannya sudah cukup untuk memacu pertumbuhan tunas.

Namun, kemunculan tunas merupakan salah faktor penting dalam melakukan multiplikasi tanaman secara *in vitro*, dengan tingkat kemunculan tunas yang cepat maka tingkat multiplikasi tanaman akan semakin cepat pula. Kemunculan tunas yang cepat akan berpengaruh pada jumlah tunas yang dihasilkan meskipun tidak pada semua jenis tanaman. Oleh karena itu peran ZPT dalam penumbuhan tunas di

kultur *in vitro* ini sangat penting, khususnya pada keefektifan pengaruh BAP dan NAA yang dilakukan secara *in vitro* untuk menumbuhkan tunas.

Dalam perannya dalam membentuk tunas, eksplan dipengaruhi oleh peran sitokinin dan auksin yang keduanya saling mempengaruhi pembentukan planlet. Pengaruh kerja sitokinin dipengaruhi oleh konsentrasi auksin, begitupula sebaliknya. Sitokinin berperan dalam menghambat pertumbuhan akar melalui peningkatan konsentrasi etilen. Sitokinin menghambat pembentukan akar lateral melalui pengaruhnya pada sel perikel dan memblok program pengembangan pembentukan akar lateral, sehingga dapat terfokus pada tunas (Santoso, 2013).

