

Pengaruh ventilasi terhadap morfologi, stomata dan kadar klorofil tunas karet yang diperbanyak melalui *microcutting*

Influence of ventilation on morphology, stomata and chlorophyll content of Hevea shoots propagated through microcutting

NURHAIMI-HARIS^{1*)}, Nurul Siti AYUNINGTIAS²⁾ & Irma Herawati SUPARTO²⁾

¹⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No.1, Bogor 16151, Indonesia

²⁾ Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor, Jl Agatis, Kampus Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima tgl 4 Agustus 2011/Disetujui tgl 11 Nopember 2011

Abstract

In plant tissue culture, the culture vessels are usually covered tightly with screw caps, aluminium foils, parafilm, or plastic wrap. This condition restricts the exchange of gases in culture vessels and will affect negatively the growth of explants. The use of ventilated closure improves the air quality in culture vessels. Microboxes provided with different types of filter (yellow filter with Kv value 13.09 Gas Exchange (GE)/day, green filter with Kv value 81.35 GE/day and without filter) on their closure were examined as culture vessels for growing rubber explants at multiplication step. The purpose of this research was to observe the plant condition in different types of microbox corresponding to the morphology, stomata and chlorophyll content of the shoots. The results showed no significant difference of shoot height on each microbox. The use of ventilated closure increased significantly new leaf formation and decreased leaf fall. Normal size and color of leaves were found on shoots grown in microbox with green filter. Chlorophyll analysis revealed no significant differences on three types of microbox, however visual observation showed that leaves were greener on microbox with green filter. The stomata condition of shoots on microbox with green filter were similar with those of mother plants in green house, while different condition of stomata were found on shoots grown in microbox with yellow filter or without filter. In normal environment such as at the field and green house, most of stomata were closed, in microbox provided with filter on the closure, most of stomata were half open, while on microbox without filter most of stomata were wide open.

[Keywords: *Hevea brasiliensis*, *microcutting*, *in vitro* culture]

Abstrak

Dalam kultur jaringan tanaman, tabung/botol kultur ditutup rapat dengan penutup yang dilengkapi ulir, aluminium foil, parafilm atau plastik *wrap*. Kondisi tersebut menghambat pertukaran udara dalam tabung kultur sehingga sering memberikan pengaruh negatif terhadap pertumbuhan eksplan. Penggunaan penutup berventilasi dapat meningkatkan kualitas udara dalam lingkungan tabung/botol kultur. Oleh karena itu microbox dengan penutup berfilter diuji sebagai wadah untuk menumbuhkan

eksplan karet pada tahap multiplikasi, yaitu microbox berfilter kuning dengan nilai Kv sebesar 13,09 (Gas Exchange (GE)/hari dan berfilter hijau dengan nilai Kv sebesar 81,35 GE/hari, sedangkan sebagai kontrol adalah microbox tanpa filter (tertutup rapat). Penelitian bertujuan mengamati kondisi tunas di dalam microbox berfilter, meliputi morfologi, stomata dan kandungan klorofil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tinggi tunas tidak berbeda nyata pada masing-masing microbox. Jumlah daun baru dan daun gugur berbeda nyata, dimana pembentukan daun baru terbanyak terdapat pada tunas dalam microbox berfilter kuning maupun hijau. Ukuran dan warna daun terlihat normal pada tunas dalam microbox berfilter hijau. Analisis kandungan klorofil tidak menunjukkan perbedaan nyata, namun pengamatan visual menunjukkan bahwa daun lebih hijau pada microbox dengan filter hijau. Kondisi stomata daun dari tunas dalam microbox dengan penutup berfilter hijau menyerupai stomata tanaman induk yang terdapat di rumah kaca dan lapangan, sedangkan kondisi stomata berbeda ditemukan pada tunas dalam microbox berfilter kuning atau tanpa filter. Pada lingkungan normal seperti lapangan dan rumah kaca, sebagian besar stomata menutup, pada wadah dengan tutup berfilter stomata agak membuka sedangkan pada microbox tanpa filter sebagian besar stomata terbuka lebar.

[Kata kunci: *Hevea brasiliensis*, *microcutting*, kultur *in vitro*]

Pendahuluan

Hevea brasiliensis adalah spesies penting dalam genus *Hevea* karena merupakan sumber karet alam yang banyak digunakan dalam industri, terutama industri otomotif. Permintaan bahan tanam karet belakangan ini meningkat dengan tajam, baik untuk penanaman ulang maupun penanaman baru, disebabkan membaiknya harga karet dan meningkatnya permintaan pasar. Akan tetapi pemenuhan terhadap kebutuhan bahan tanam tersebut relatif sulit disebabkan batang bawah yang berasal dari biji sebagai salah satu komponen dalam penyediaan bibit karet tidak selalu tersedia. Kendala utama adalah musim biji yang hanya berlangsung sekali dalam setahun dan terbatasnya klon karet yang dapat digunakan sebagai sumber biji. Di samping itu,

*) Penulis korespondensi: nurhaimi@yahoo.com

terjadinya pergeseran musim juga mempengaruhi ketersediaan biji.

Untuk penyediaan batang bawah karet, saat ini di Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia sedang dikembangkan cara perbanyak klonal dengan teknologi *microcutting*, yaitu suatu teknik mikropropagasi berbasis kultur *in vitro* dengan menggunakan eksplan potongan batang muda yang memiliki mata tunas aksiler (*axillary buds*) (Nurhaimi-Haris *et al.*, 2009a). Keuntungan sistem perbanyak tersebut adalah tersedianya batang bawah tanpa dipengaruhi musim biji serta tersedianya batang bawah dalam bentuk klon yang selama ini belum pernah bisa dihasilkan pada tanaman karet. Penggunaan batang bawah klonal diduga dapat meningkatkan keseragaman tanaman karet di lapangan sehingga akan berdampak positif terhadap pertumbuhan tanaman dan produksi lateks. Di samping itu, kemampuan melakukan perbanyak batang bawah secara klonal membuka peluang untuk menghasilkan batang bawah dengan karakteristik tertentu, seperti toleran terhadap penyakit serta kondisi lingkungan yang kering.

Meskipun perbanyak batang bawah karet dengan teknologi *microcutting* telah dapat dilakukan, namun aplikasinya dalam skala besar masih terkendala. Penyebab utamanya adalah banyaknya tanaman yang hilang akibat kontaminasi, rendahnya laju multiplikasi, terjadinya kelainan morfologis dan fisiologis dari tanaman yang dihasilkan, serta banyaknya tanaman yang mati dalam proses aklimatisasi. Semua kendala tersebut menyebabkan biaya produksi per satuan bibit menjadi mahal.

Tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* biasanya diletakkan dalam tabung atau botol kultur dengan tutup rapat untuk menghindari kontaminasi bakteri dan jamur serta untuk menjaga kelembaban lingkungan kultur. Akan tetapi tutup yang rapat tersebut sering mempengaruhi komposisi gas di dalam tabung/botol sehingga menghambat pertumbuhan tanaman (Kitaya, 2005). Tutup tabung/botol seperti aluminium foil, parafilm, plastik *wrap* atau tutup dengan drat menyebabkan pertukaran gas terhambat antara di dalam dan di luar tabung/botol. Oleh karena itu udara di dalam tabung/botol berbeda dengan udara *ex vitro* sehingga sering menyebabkan malfungsi stomata, rendahnya kandungan klorofil, memanjangnya daun serta hiperhidrasi. Kondisi yang demikian mengakibatkan laju multiplikasi dan daya hidup tanaman menjadi rendah.

Untuk meningkatkan kualitas udara dan meminimalkan perbedaan udara di dalam dan di luar lingkungan kultur dapat digunakan wadah kultur yang dilengkapi dengan ventilasi. Penggunaan ventilasi biasanya merupakan bagian dari mikropropagasi fotoautotropik, yaitu suatu sistem mikropropagasi yang memanfaatkan bahan anorganik endogen untuk memenuhi kebutuhan tanaman dengan menggunakan cahaya sebagai sumber energi (Kozai & Kubota, 2005). Salah satu wadah kultur dengan

ventilasi adalah "the full-gas microbox" karena tutup box dilengkapi dengan berbagai ukuran filter sehingga memungkinkan terjadinya pertukaran udara (*gas exchange*) secara pasif ke dalam maupun ke luar lingkungan kultur. Ventilasi tersedia dalam empat macam nilai Kv (koefisien nilai pertukaran gas per unit waktu) yang ditandai dengan warna filter putih, kuning, merah dan hijau. Filter kuning dan hijau digunakan dalam penelitian ini karena perbedaan nilai Kv yang cukup signifikan. Dengan adanya pertukaran udara melalui filter, diduga pertumbuhan tunas karet akan lebih baik.

Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh penggunaan microbox berventilasi (tutup microbox dilengkapi filter kuning dan hijau) terhadap pertumbuhan tunas karet dalam proses kultur *in vitro*, meliputi morfologi tunas, stomata dan kadar klorofil daun.

Bahan dan Metode

Wadah kultur dan media tumbuh

Untuk pertumbuhan eksplan digunakan 'full-gas microbox' dengan dua macam tutup, masing-masing dengan filter kuning atau hijau. Microbox dengan filter kuning mempunyai koefisien nilai pertukaran gas per unit waktu (Kv) sebesar 13,09 (Gas Exchange (GE)/hari dan filter hijau dengan nilai Kv sebesar 81,35 GE/hari (Combiness, nv, Belgium). Sebagai kontrol digunakan microbox yang ditutup rapat dengan plastik. Masing-masing microbox diisi dengan 100 mL media dasar MA yang dilengkapi dengan zat pengatur tumbuh BAP 1 mg/L, IBA 0,25 mg/L serta glukosa dan fruktosa, masing-masing 30 g/L (Carron *et al.*, 2005). pH media ditetapkan 5,8 dan sebagai pematat media digunakan agar. Sterilisasi media dilakukan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

Eksplan, kondisi kultur dan perlakuan

Eksplan diambil dari kultur aseptik karet genotipe 78 pada tahap multiplikasi. Pada tahap tersebut eksplan terdapat dalam tiga macam bentuk, yaitu *stock explants* (SE), *shoot explants* (ST) dan *nodal explants* (NE) yang diperoleh melalui pemotongan masing-masing bagian tersebut pada saat akan dilakukan subkultur (Carron *et al.*, 2005). Dalam penelitian ini hanya digunakan eksplan tunas (ST). Eksplan tunas tersebut dikulturkan dalam microbox, masing-masing dengan tutup berfilter kuning (nilai Kv: 13,09 GE/day), berfilter hijau (nilai Kv: 81,35 GE/day) dan tutup tanpa filter (tertutup rapat). Setiap perlakuan yang diuji terdiri atas tujuh tunas dengan tiga ulangan.

Eksplan dalam microbox diletakkan di rak dalam ruang kultur dengan suhu ruang diatur pada kisaran 26-28°C, kelembaban relatif 60-80 % dan pencahayaan dengan lampu TL 40 W dengan intensitas

cahaya $\pm 30 \mu\text{mol foton/m}^2/\text{detik}$, selama 12 jam/hari. Penyimpanan eksplan dalam ruang kultur dilakukan selama empat minggu dan setelah itu dilakukan pengamatan terhadap tinggi batang (tunas), bobot basah tunas, jumlah daun baru dan daun gugur. Untuk mengetahui kualitas tunas juga diamati ukuran dan warna daun.

Ekstraksi dan analisis klorofil daun

Kandungan klorofil dari daun tunas karet ditetapkan melalui ekstraksi dengan menggunakan pelarut aseton 80%. Setelah dikulturkan selama empat minggu, daun diambil dan diiris tipis, ditimbang sebanyak 1 g, kemudian dihaluskan dalam mortar, lalu ditambahkan 10 mL aseton 80% ke dalam mortar, digerus kuat dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditampung dalam labu takar 50 mL. Ekstraksi diulang kembali dengan menambahkan aseton 80% sebanyak 3 mL, lalu disaring. Filtrat kedua yang diperoleh disatukan dengan filtrat pertama. Perlakuan ekstraksi seperti tersebut di atas dilakukan sebanyak tiga kali. Volume filtrat ditetapkan hingga tanda tera dengan menambah aseton 80%.

Ekstrak pigmen dalam pelarut aseton 80% diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 663 nm untuk klorofil a dan 646 nm untuk klorofil b. Konsentrasi klorofil a dan b maupun total dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Wellburn, 1994):

$$\text{Klorofil total (mg/g)} = 17,30.A_{646} + 7,18.A_{663}$$

$$\text{Klorofil a (mg/g)} = 12,21.A_{663} - 2,81.A_{646}$$

$$\text{Klorofil b (mg/g)} = 20,13.A_{646} - 5,03.A_{663}$$

Pengamatan stomata

Pengamatan stomata menggunakan alat *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dilakukan terhadap daun tunas masing-masing perlakuan kultur serta daun dari tanaman induk dari genotipe yang sama (genotipe 78), yang ditumbuhkan dan dipelihara di rumah kaca dan di lapang. Daun diambil pada posisi yang sama dari masing-masing sampel tanaman.

Persiapan preparat untuk SEM terdiri atas tiga tahap. Pertama adalah tahap fiksasi, sampel daun direndam dalam *cacodylate buffer* (*sodium cacodylate trihydrate*, HCl, dan H₂O dengan pH 7,4), selama kurang lebih dua jam, lalu direndam dalam larutan glutaraldehid 2,5% selama dua jam dan direndam dalam larutan asam tanat 2% selama semalam. Kedua adalah tahap dehidrasi, yaitu sampel direndam secara berurutan dengan alkohol 50% selama empat kali lima menit, alkohol 70% selama 20 menit, dan alkohol 85% selama 20 menit pada suhu 4°C. Kemudian secara berturut-turut sampel direndam dalam alkohol 95% selama 20 menit,

alkohol absolut dua kali 10 menit dan t-butanol selama dua kali 10 menit yang berlangsung pada suhu ruang, lalu dilakukan pembekuan kering. Selanjutnya sampel dengan ukuran 1×1 cm direkatkan pada silinder logam steril yang diletakkan ke dalam pelapis ion untuk divakum, lalu dilapisi dengan logam Pt-Au menggunakan pelapis ion. Hasil pengamatan dengan SEM difoto pada perbesaran 350 kali dan 1500 kali.

Analisis data

Analisis statistik yang digunakan adalah analisis varian (ANOVA) satu arah untuk parameter respons tinggi batang planlet, bobot basah planlet, dan kadar klorofil daun. Jika berbeda nyata ($P < 0,05$), dilakukan uji lanjut Duncan pada tingkat taraf kepercayaan 95%. Analisis pertumbuhan daun, yaitu penambahan dan pengurangan daun serta ukuran dan warna daun dilakukan secara diskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Morfologi tunas karet

Tunas karet yang ditumbuhkan dalam microbox dengan tutup berventilasi terdapat pada Gambar 1, sedangkan morfologi sebagian tunas setelah dikulturkan selama empat minggu dalam microbox tersebut terdapat pada Gambar 2. Penggunaan microbox berventilasi (Gambar 1) dimaksudkan untuk memberikan peluang pertukaran udara yang lebih baik ke luar dan ke dalam lingkungan kultur sehingga diharapkan dapat meminimalkan penyimpanan yang sering ditemui pada tanaman yang diperbanyak secara *in vitro*. Di samping itu, pertukaran udara diperlukan untuk meningkatkan pertumbuhan dan kualitas tunas sehingga tunas dapat menyesuaikan diri dengan mudah pada tahap aklimatisasi (Zobayed, 2005).

Dalam penelitian ini digunakan tutup microbox yang dilengkapi filter berwarna kuning atau hijau dengan nilai Kv yang berbeda, serta microbox tanpa filter sebagai kontrol. Nilai Kv merupakan koefisien pertukaran gas yang terjadi secara difusi melalui filter dan menggambarkan banyaknya pertukaran gas di dalam bejana per unit waktu.

Pengamatan secara visual menunjukkan bahwa perkembangan daun tunas yang terlihat normal secara morfologi (ukuran dan warna daun) umumnya terdapat pada tunas yang ditumbuhkan dan dipelihara dalam microbox dengan tutup berfilter hijau (Gambar 2c), sedangkan pada tutup berfilter kuning ukuran daun normal, namun warna daun agak kuning (Gambar 2b). Pada microbox yang ditutup rapat (tanpa filter) sebagian besar tunas mempunyai daun yang kecil memanjang dan berwarna kuning (Gambar 2a). Pengukuran luas daun menunjukkan bahwa rata-rata luas daun tunas pada microbox dengan tutup



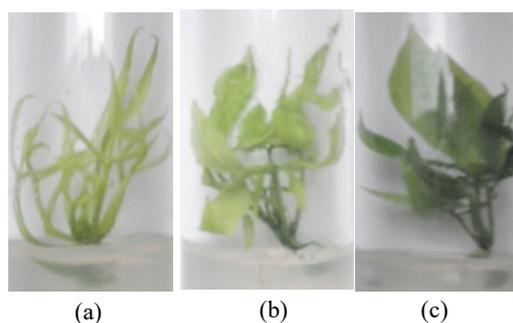
Gambar 1. Tunas karet dalam microbox dengan tutup ber-ventilasi; filter hijau dengan nilai Kv 81,35 Gas Exchange (GE)/hari dan filter kuning 13,09 GE/hari.

Figure 1. Hevea shoots in microbox with ventilated closure; green filter with Kv value 81,35 Gas Exchange/day, and yellow filter 13,09 GE/day.

berfilter hijau maupun kuning adalah $2,0 \text{ cm}^2$ sedangkan yang ditumbuhkan pada wadah dengan tutup rapat adalah $1,3 \text{ cm}^2$.

Dalam kebanyakan *in vitro*, eksplan mendapatkan kondisi dan lingkungan pertumbuhan yang berbeda dengan kondisi alami sehingga menyebabkan vitrifikasi atau hiperhidrisitas karena gangguan fisiologis yang akan berdampak pada malformasi daun dan batang (Lucchesini *et al.*, 2006). Umumnya, beberapa gejala yang dapat diamati secara morfologi adalah batang mengeras dan memendek, daun berbentuk roset, translusen dan mengkerut atau menggulung serta ruas batang pendek. Kondisi ini sering dipicu oleh kondisi kultur yang kurang sesuai, antara lain karena wadah kultur tertutup terlalu rapat. Kejadian vitrifikasi tersebut dapat diminimalkan dan dicegah pada beberapa tanaman dengan memberikan pertukaran gas yang sesuai melalui penggunaan tutup wadah kultur selama proses kultur berlangsung (Lai *et al.*, 2005; Winarto *et al.*, 2004). Dalam penelitian ini penggunaan microbox dengan tutup dilengkapi filter hijau cenderung menghasilkan tunas dengan daun yang terlihat normal (Gambar 2c). Diduga pertukaran udara yang terjadi melalui filter tersebut memberikan lingkungan mikro yang lebih sesuai untuk pertumbuhan tunas.

Hasil pengukuran tinggi dan berat basah tunas pada masing-masing perlakuan setelah dikulturkan selama empat minggu dalam microbox menunjukkan tidak beda nyata antara ketiga perlakuan tersebut (Tabel 1). Nampaknya pemberian udara secara alami melalui ventilasi tidak mempengaruhi secara langsung pertambahan tinggi maupun bobot basah tunas pada tahap multiplikasi. Hal ini sangat berbeda dengan tahap *primary culture* (tahap sebelum multiplikasi), dimana ventilasi sangat diperlukan untuk pertumbuhan tunas (Nurhaimi-Haris *et al.*, 2009b). Berbeda dengan tinggi dan berat basah tunas,



Gambar 2. Tunas karet yang ditumbuhkan dalam microbox dengan tutup (a) rapat; (b) filter warna kuning (nilai Kv 13,09 GE/hari); dan (c) filter ukuran warna hijau (nilai Kv 81,35 GE/hari).

Figure 2. Hevea shoots grown in microbox with closure (a) tight (without filter), (b) yellow filter (Kv value 13,09 GE/day), and (c) green filter (Kv value 81,35 GE/day).

pertukaran udara secara alami melalui filter pada tutup microbox berpengaruh nyata terhadap pembentukan daun baru maupun pengguguran daun lama selama masa kultur (Tabel 2). Pembentukan daun baru dalam microbox dengan tutup berfilter, baik dengan filter kuning maupun hijau, adalah sekitar empat kali lipat dibandingkan dengan yang ditutup rapat, sedangkan jumlah daun yang gugur hanya sekitar sepertiganya.

Lambatnya perkembangan tunas serta banyaknya daun yang gugur dalam microbox tanpa filter dapat disebabkan oleh kondisi lingkungan di dalam microbox tersebut seperti kelembaban tinggi, kandungan gas etilen meningkat, kandungan CO_2 berfluktuasi dan sirkulasi udara sangat minim. Di samping itu, kondisi lingkungan yang demikian akan menghasilkan tunas dengan daun yang kecil (Gambar 2a) sehingga dapat mengurangi kapasitas fotosintesis. Terjadinya variasi tunas, baik secara morfologi, anatomi dan fisiologi pada kondisi wadah kultur tertutup rapat telah dilaporkan pada berbagai tanaman lain (Chaum *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2007; Nguyen & Kozai, 2001; Zobayed *et al.*, 2001).

Kadar klorofil tunas karet

Secara umum terlihat bahwa kandungan klorofil tunas tertinggi terdapat pada microbox dengan tutup berfilter hijau (nilai Kv 81,35 GE/hari), meskipun dari analisis statistik tidak terdapat beda nyata pada ketiga perlakuan tersebut (Tabel 3). Namun dari pengamatan visual terlihat bahwa daun berwarna lebih hijau pada microbox dengan tutup hijau (nilai Kv 81,35 GE/hari) dibandingkan daun pada microbox dengan tutup kuning maupun yang tertutup rapat (Gambar 2).

Pertukaran udara yang sangat terbatas dari dalam ke luar tabung kultur menyebabkan lingkungan udara

Tabel 1. Pengaruh ventilasi pada tutup microbox terhadap tinggi dan bobot basah tunas karet.

Table 1. Effect of ventilation on microbox closure on height and fresh weight of Hevea shoots.

Perlakuan (<i>Treatments</i>)	Tinggi tunas <i>Shoot height</i> (cm)	Bobot basah tunas <i>Shoot fresh weight</i> (g)
Tanpa filter (tertutup rapat) <i>Without filter (tight closed)</i>	0,89 ± 0,10	6,60 ± 0,43
Filter kuning (13,09GE*/hari) <i>Yellow filter (13,09GE/day)</i>	0,74 ± 0,09	7,00 ± 0,46
Filter hijau (81,35 GE/hari) <i>Green filter (81,35 GE/day)</i>	0,82 ± 0,17	6,10 ± 0,89

*GE: Gas exchange, ANOVA P >0,05 untuk semua data (*for all data*)

Tabel 2. Pengaruh ventilasi pada tutup microbox terhadap jumlah daun baru dan jumlah daun yang gugur pada tunas karet.

Table 2 Effect of ventilation on microbox closure on number of new leaf and leaf fall of Hevea shoots

Perlakuan (<i>Treatments</i>)	Jumlah daun baru <i>Number of new leaves</i>	Jumlah daun yang gugur <i>Number of leaf fall</i>
Tanpa filter (tertutup rapat) <i>Without filter (tight closed)</i>	2,00 b*	2,72 a
Filter kuning (13,09GE/hari) <i>Yellow filter (13,09GE/day)</i>	8,52 a	1,00 b
Filter hijau (81,35 GE/hari) <i>Green filter (81,35 GE/day)</i>	8,38 a	1,05 b

* Angka dalam kolom yang sama yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak ganda Duncan (P=0,05)

* Means in the same columns followed by similar letter is not significantly different according to Duncan Multiple Range Test (P=0.05)

di dalam tabung kultur tidak normal dibandingkan dengan lingkungan udara di luar tabung. Kondisi tersebut dapat menghambat proses fotosintesis, transpirasi, serta serapan air, hara dan CO₂, sehingga akan mempengaruhi kualitas tanaman. Dalam penelitian ini penggunaan microbox dengan peluang pertukaran udara lebih banyak (filter hijau) menghasilkan daun yang lebih baik dilihat dari warna dan ukuran daun (Gambar 2), namun belum dapat meningkatkan jumlah klorofil. Couceiro *et al.* (2006) mengemukakan bahwa kandungan klorofil planlet dan kualitas tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* akan lebih baik dengan meningkatkan pertukaran udara di dalam tabung kultur. Untuk tunas karet yang dikulturkan *in vitro* diduga hal ini juga diperlukan, namun banyaknya pertukaran udara yang sesuai masih perlu diuji.

Stomata pada daun tunas karet

Stomata tanaman karet yang ditanam secara normal di lapangan terdapat pada Gambar 3a, dimana stomata terlihat tersebar merata. Penyebaran stomata

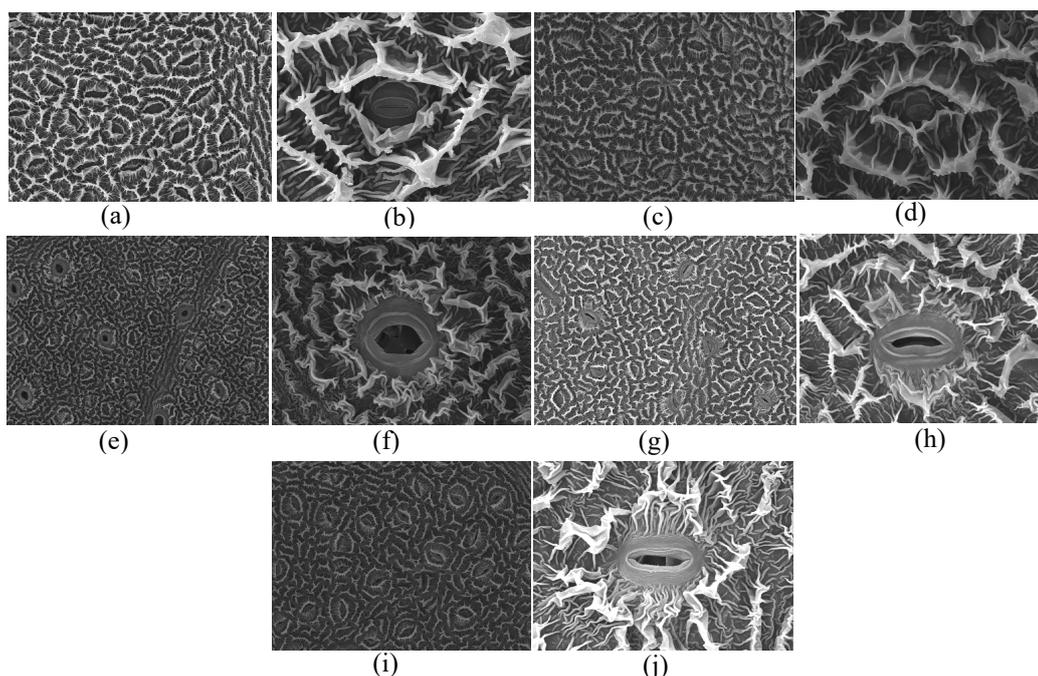
yang demikian juga terdapat pada tanaman karet yang ditanam di rumah kaca dan tunas yang ditanam dalam wadah kultur dengan tutup dilengkapi filter hijau (Gambar 3c & 3i). Stomata tanaman karet yang ditanam dalam wadah kultur dengan tutup dilengkapi filter kuning atau ditutup rapat terlihat jarang (Gambar 3e & 3g). Stomata dalam kondisi menutup terdapat pada daun karet yang ditanam di lapangan dan rumah kaca (Gambar 3b & 3d), agak membuka pada tanaman yang ditanam dalam wadah yang dilengkapi filter hijau dan kuning (Gambar 3h & 3j), dan terbuka lebar pada wadah yang ditutup rapat (Gambar 3f). Membuka dan menutupnya stomata merupakan mekanisme menahan laju transpirasi. Dalam penelitian ini, diduga dalam kondisi wadah tertutup rapat perkembangan daun terganggu sehingga stomata tidak berfungsi secara normal. Menurut Afreen (2005), membukanya stomata secara terus menerus mengindikasikan abnormalitas fungsi stomata tersebut.

Berbeda dengan tanaman di lapang yang tumbuh di lingkungan alami dan terbuka, eksplan (dalam hal ini tunas) adalah tanaman hasil kultur jaringan yang

Tabel 3. Pengaruh ventilasi pada tutup microbox terhadap kandungan klorofil tunas karet(mg/g)
 Table 3. Effect of ventilation on microbox closure on chlorophyll content of Hevea shoots (mg/g)

Perlakuan (Treatments)	Klorofil a Chlorophyll a	Klorofil b Chlorophyll b	Klorofil total Total Chlorophyll
Tanpa filter (tertutup rapat) Without filter (tight closed)	0,42	0,18	0,60
Filter kuning (13,09GE*/hari) Yellow filter (13,09GE/day)	0,35	0,16	0,50
Filter hijau (81,35 GE/hari) Green filter (81,35 GE/day)	0,50	0,20	0,70

*GE: Gas exchange, ANOVA P >0,05 untuk semua data (for all data)



Gambar 3. Stomata dari epidermis bawah daun karet genotipe 78 yang ditumbuhkan di lapang (a dan b), di rumah kaca (c dan d), di dalam wadah dengan tutup rapat (e dan f), di dalam wadah dengan tutup berfilter kuning (nilai Kv 13,09 GE/hari) (g dan h), dan di dalam wadah dengan tutup berfilter hijau (nilai Kv 81,35 GE/hari) (i dan j). Pengamatan dengan perbesaran 350× (a, c, e, g dan i) dan 1500× skala (b, d, f, h, dan j).

Figure 3. Stomata from lower epidermis of leaves of rubber genotypes 78 grown in the field (a and b), in a greenhouse (c and d), in tightly closed container (e and f), in container with a yellow filtered lid (Kv value 13.09 GE /day) (g and h), and container with green filtered lid (Kv value 81.35 GE /day) (i and j). Observations with a magnification of 350 x (a, c, e, g and i) and 1500 x (b, d, f, h, and j).

diperbanyak dan dipelihara dalam lingkungan buatan dan tertutup seperti tabung atau botol kultur. Lingkungan yang demikian sering menyebabkan malfungsi stomata, pemanjangan tunas, penurunan kadar klorofil serta hiperhidrisitas (Afreem, 2005). Malfungsi stomata umumnya berhubungan dengan hilangnya kemampuan stomata untuk menutup dan membuka. Dalam kondisi stomata terbuka lebar dan tidak bisa menutup maka laju transpirasi akan sangat tinggi sehingga sering menimbulkan efek yang merugikan, baik pada saat tunas masih dalam tahap pengembangan di laboratorium maupun pada saat aklimatisasi.

Menurut Zobayed *et al.* (2004), peningkatan kualitas tanaman hasil kultur jaringan dapat dilakukan melalui pemberian ventilasi, pengaturan konsentrasi CO₂ pada lingkungan *in vitro* dan pemberian cahaya yang cukup. Dalam penelitian ini pemberian ventilasi melalui filter hijau pada tutup wadah kultur memungkinkan terjadinya pertukaran udara dengan nilai Kv 81,35 GE/hari, sehingga tunas dapat memiliki daun dengan morfologi normal (Gambar 2c) dan sebaran stomata menyerupai tanaman induknya yang dipelihara di rumah kaca maupun lapangan.

Kesimpulan

Tunas dari eksplan karet yang ditumbuhkan dalam microbox dengan tutup dilengkapi filter hijau (nilai Kv 81,35 GE/hari) memiliki morfologi, stomata dan klorofil yang lebih baik dibandingkan dengan tunas yang ditumbuhkan dalam microbox dengan filter kuning (nilai Kv 13,09 GE/hari) maupun microbox tanpa filter (tertutup rapat). Pada microbox dengan filter hijau, morfologi dan warna tunas normal serta kandungan klorofilnya lebih tinggi dibandingkan tunas dalam microbox lainnya. Di samping itu, sebaran dan pembukaan stomata juga menyerupai tanaman induk yang ditumbuhkan di lapang dan rumah kaca. Penggunaan microbox dengan filter maupun tanpa filter tidak berpengaruh nyata terhadap laju multiplikasi, namun dapat meningkatkan kualitas tunas.

Daftar Pustaka

- Afreen F (2005). Physiological and anatomical characteristics of *in vitro* photoautotroph plants. In: T. Kozai *et al.* (eds.) Photoautotrophic (*sugar-free medium*) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System. The Netherlands, Springer, p. 61-90.
- Carron MP, L Lardet & P Montoro (2005). Hevea microcutting. *Technical Notes on The Process*. France, CIRAD.
- Couceiro MA, F Afreen, SMA Zobayed & T Kozai (2006). Enhanced growth and quality of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic *in vitro* conditions. *In Vitro Cellular Develop Biol-Plant*, 42, 278-282.
- Chaum S, K Supaibulwatana & C Kirdmanee (2005). Phenotypic responses of Thai jasmine rice to salt-stress under environmental control of *in-vitro* photoautotrophic system. *Asian J Plant Sci* 4, 85-89.
- Kitaya Y (2005). Importance of air movement for promoting gas and leaf exchange between plants and atmosphere under controlled environment. In: Omassa *et al.* (eds.) *Plant Responses to Air Pollution and Global Change*. Springer-Verlag Tokyo. p. 185-193.
- Kozai T & C Kubota (2005). Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. In: T. Kozai *et al.* (eds.) *Photoautotrophic (Sugar-Free Medium) Micropropagation As a New Micro-Propagation and Transplant Production System*. The Netherlands, Springer, p. 19-29.
- Lai CC, HM Lin, SM Nalawade, W Fang & HS Tsay (2005). Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. *J Plant Physiol* 162, 355-361.
- Liao F, B Wang, M Zhang, F Xu & F Lian (2007). Response to sucrose-free culture and diffusive ventilation of plantlets *in vitro* of *Gerbera jamesonii* and photoautotrophic growth potential. *Acta Horticult* 764, 257-264.
- Lucchesini M, G Monteforti, A Mensuali-Sodi & G Serra (2006). Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different *in vitro* culture conditions. *Biol Plantarum* 50, 161-168.
- Nguyen QT & T Kozai (2001). Growth of *in vitro* banana (*Musa* spp.) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *In Vitro Cellular Develop Biol-Plant* 37, 824-829.
- Nurhaimi-Haris, Sumaryono, Siswanto, Sumarmadji, PD Kasi & MP Carron (2009a). Teknologi *microcutting* untuk perbanyakan bahan tanam karet. Dalam: *Prosiding Lokakarya Nasional Pemuliaan Tanaman Karet*. Batam, 4-6 Agt 2009 p.188-198.
- Nurhaimi-Haris, Sumaryono, Carron MP (2009b). Pengaruh bahan pra-sterilan, tutup tabung kultur, dan musim terhadap tingkat kontaminasi eksplan pada kultur *microcutting* karet. *Menara Perkebunan* 77(2), 89-99.
- Wellburn AR (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoid, using various solvent with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144, 307-313.
- Winarto B, MA Aziz, AA Rashid & MR Ismail (2004). Effect of permeable vessel closure and gelling agent on reduction of hyperhydricity in *in vitro* culture of carnation. *Indonesian J Agricult Sci* 204, 11-19.
- Zobayed SMA (2005). Ventilation in micropropagation. In: T. Kozai *et al.* (eds.) *Photoautotrophic (Sugar-Free Medium) Micropropagation As a New Micro-Propagation and Transplant Production System*. The Netherlands, Springer, p. 147-186.
- Zobayed SMA, F Afreen, Y Xiao & T Kozai (2004). Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. *In Vitro Cellular Develop Biol-Plant* 40, 450-458.
- Zobayed SMA, J Armstrong & W Armstrong (2001). Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. *Plant Sci* 161, 537-548.