

Respon Pertumbuhan Kultur Tunas Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) terhadap Benziladenin dan Modifikasi Hara Nitrogen

Growth Response of *Moringa oleifera* Lam. Shoot Culture to Benzyladenine and Nitrogen Modification

Tri Handayani^{1*}, Aryani Leksonowati¹, Indira Riastiw¹, Ridwan¹, Witjaksono¹

Diterima 24 Desember 2020/Disetujui 15 April 2021

ABSTRACT

*In plant micropropagation, cytokinin and nitrogen are the essential components that affect plant growth and morphogenesis. In this research, we evaluated the effect of BA concentration and modification of MS medium with variation in total nitrogen concentration and $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio on the growth of moringa plant. The treatments tested were (1) BA concentrations of 0.00, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 mg L⁻¹; (2) the total N concentrations of 20, 40, 60, 80 mM; (3) the $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio of 1:0, 1:3, 1:1, 3:1, 0:1. The experimental design used was a completely randomized design with 10 replications. The results showed that the treatment of 0.25 mg L⁻¹ BA produced the best shoot proliferation with the highest number of nodes (8.07 ± 3.48). The shoot growth response to nitrogen level tended to be parabolic with an optimum concentration of 40-60 mM. Modification of MS medium with different $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio showed differences in the growth and biomass of moringa shoots, and the optimal growth was obtained at the 3:1 ratio. Therefore, MS medium with total nitrogen concentration of 40-60 mM with $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ratio of 3:1 can be used for *in vitro* propagation of Moringa selected genotypes.*

Keywords: Benzyladenine, Moringa oleifera, nitrate/ammonium ratio, shoot, total N

ABSTRAK

Pada perbanyakan tanaman secara *in vitro*, sitokinin dan hara nitrogen merupakan beberapa komponen utama yang mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis tanaman. Pada penelitian ini, komponen utama tersebut diuji untuk optimasi pertumbuhan kultur tunas kelor dengan perlakuan berikut: (1) konsentrasi BA yaitu 0.00, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 1.00 mg L⁻¹, (2) total konsentrasi N dalam medium yakni 20, 40, 60, 80 mM; (3) perlakuan nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ yakni 0:1, 1:3, 1:1, 3:1, 1:0. Rancangan yang digunakan adalah acak lengkap dengan 10 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan BA 0.25 mg L⁻¹ menghasilkan proliferasi tunas terbaik dengan jumlah buku tertinggi (8.07 ± 3.48). Respon pertumbuhan tunas terhadap perbedaan konsentrasi nitrogen cenderung bersifat parabolik dengan konsentrasi optimum 40–60 mM pada medium standar MS. Perlakuan nisbah nitrat/amonium menunjukkan pertumbuhan dan biomassa tunas *in vitro* yang optimal pada nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 3:1. Medium MS dengan modifikasi total konsentrasi nitrogen 40-60 mM dengan nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 3:1 dapat digunakan untuk proliferasi tunas kelor secara *in vitro* untuk tujuan perbanyakan klonal dari genotipe terpilih.

Kata kunci: *Benzyladenin, in vitro, kelor, nisbah nitrat/ amonium, total N*

¹Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi LIPI
Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong, Kabupaten Bogor 16911, Indonesia
E-mail : trihandayani08@gmail.com (*penulis korespondensi)

PENDAHULUAN

Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) adalah tanaman yang memiliki kandungan antioksidan dan anti-mikrobia yang tinggi (Khor *et al.*, 2018) dan digunakan untuk bahan baku dalam industri kosmetik (Baldisserotto *et al.*, 2018). Daun dan polong muda kelor banyak dimanfaatkan sebagai sumber pangan sayuran dan diketahui bernutrisi tinggi (Aminah *et al.*, 2015). Daun dari tanaman kelor tetraploid hasil induksi memiliki kandungan gizi yang lebih tinggi dari kelor biasa (Ridwan dan Witjaksono, 2020).

Tanaman kelor mudah dibudidayakan dan dapat diperbanyak dengan menggunakan biji atau stek batang (Wasonowati *et al.*, 2018), namun perbanyak dengan biji menimbulkan ketidakseragaman pertumbuhan tanaman. Teknik kultur jaringan dapat menjadi satu alternatif dalam produksi bibit kelor terpilih secara klonal, serta dapat diaplikasikan untuk anggota genus *Moringa* lain yang terancam punah (Stephenson dan Fahey, 2004), dan dapat dimanfaatkan untuk tujuan pemuliaan tanaman melalui induksi poliploidi (Poerba *et al.*, 2017), mutasi (Witjaksono dan Leksonowati, 2012), ataupun transfer gen (Dalton, 2020).

Medium MS (Murashige dan Skoog, 1962) merupakan salah satu medium dasar yang banyak digunakan untuk perbanyak secara *in vitro* pada berbagai jenis tanaman, namun modifikasi hara makro, mikro, vitamin, ataupun sumber karbon dapat memperbaiki pertumbuhan biak anggrek (Romeida *et al.*, 2013). Optimasi pertumbuhan dan proliferasi tunas *in vitro* banyak dilakukan dengan modifikasi komponen medium tumbuh, misalnya zat pengatur tumbuh (ZPT) seperti auksin, sitokinin, giberelin maupun dengan ZPT lainnya. *Benzyladenin* (BA) merupakan ZPT sintetik dari golongan sitokinin yang memiliki aktivitas tinggi dan murah, umumnya digunakan untuk menginduksi pembentukan tunas samping dan mengurangi dominasi apikal sehingga biasa digunakan untuk mikropropagasi pada berbagai jenis tumbuhan (George, 1993).

Perbanyak tunas kelor pada medium MS standar dengan total nitrogen 60 mM yang diperkaya dengan 2.5 μ M BA selama 3 minggu menunjukkan gejala vitrifikasi, terhambatnya pembentukan tunas, serta

nekrosis pada pucuk tunas (Hassanein *et al.*, 2018). Kondisi ini menunjukkan kemungkinan kurang optimalnya formulasi medium yang digunakan. Modifikasi sederhana seperti mengurangi konsentrasi hara atau merubah nisbah nitrat dan amonium dapat memperbaiki pertumbuhan kultur tunas seperti pada kultur tunas apokat (Witjaksono *et al.*, 1999). Nitrogen (N) merupakan salah satu hara utama pada medium MS yang tersedia bagi tanaman dalam bentuk ion amonium (NH_4^+) dan nitrat (NO_3^-). Di dalam medium MS, total konsentrasi nitrogen dan nisbah antara ion NH_4^+ dan NO_3^- diketahui berperan besar dalam mempengaruhi pertumbuhan tunas, morfogenesis dan pertumbuhan kultur embriogenik apokat (Witjaksono dan Litz, 1999) ataupun produksi metabolit primer dan sekunder (Gonda *et al.*, 2014). Pada penelitian ini, dipelajari pengaruh konsentrasi ZPT BA serta modifikasi medium MS dengan variasi total konsentrasi N dan nisbah nitrat/amonium dalam medium terhadap pertumbuhan dan biomassa tunas kelor *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman dan Kondisi Kultur

Bahan tanaman yang digunakan berasal dari pertanaman kelor aksesori Sumba berumur 2 tahun yang ditanam di kebun percobaan Pusat Penelitian Biologi LIPI. Eksplan yang digunakan yaitu buku tunas ke 1-3 yang diambil dari bagian pucuk tunas muda berwarna hijau dari tanaman induk yang sehat.

Eksplan buku tunas direndam dalam larutan campuran bakterisida dan fungisida (masing-masing 2 g L⁻¹) selama 30 menit dan dibilas akuades steril. Di dalam laminar eksplan kemudian direndam dalam 20% dan 10% larutan pemutih (bahan aktif NaOCl 5.25%) masing-masing selama 5 dan 10 menit, selanjutnya dibilas akuades steril, dan direndam dalam alkohol 70% selama 5-10 menit. Eksplan yang telah steril dipotong dengan ukuran 1-1.5 cm dan dikulturkan di medium antibiotik selama 3 hari. Medium antibiotik mempunyai komposisi medium dasar MS yang diperkaya dengan antibiotik (dalam mg L⁻¹): 400 *Streptomycin*, 150 *Rifampicin*, dan 400 *Cefotaxime*). Selanjutnya eksplan disubkultur ke medium inisiasi tunas yang terdiri dari medium dasar MS yang

diperkaya dengan 0.1 mg L⁻¹ BA. Subkultur tunas pada medium yang baru dilakukan setiap 4 minggu dengan menanam inokulum potongan buku tunas. Tunas yang tumbuh digunakan untuk percobaan selanjutnya.

Medium dasar yang digunakan adalah MS dengan hara makro, mikro dan vitamin MS (dalam mg L⁻¹) *thiamine* HCl 0.1, *Pyridoxin* HCl 0.5, *nicotinic acid* 0.5, glisin 2.0, *myo-Inositol* 100, sukrosa 30000, 0.3% gelrite sebagai pematid, keasaman media diatur pada pH 5.7-5.8 dengan penambahan 1N NaOH atau HCl. Medium kemudian dibagikan ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 25 ml ditutup dengan 2 lembar plastik bening dan diamankan dengan karet gelang, diautoklaf pada 121 °C selama 20 menit dan selanjutnya disimpan di ruang penyimpanan sebelum digunakan.

Rancangan Perlakuan

Penelitian terdiri dari tiga perlakuan sebagai berikut: (1) beberapa taraf konsentrasi BA yaitu: 0.00; 0.05; 0.10; 0.25; 0.50; dan 1.00 mg L⁻¹ pada medium dasar MS; (2) total konsentrasi N yaitu 20, 40, 60, dan 80 mM pada medium dasar MS dengan kandungan KNO₃, NH₄NO₃ tiap taraf konsentrasi sesuai dalam medium (Tabel 1); dan (3) nisbah NO₃⁻ : NH₄⁺ yaitu 0:1, 1:3, 1:1, 3:1, 1:0 dengan tingkat N total 60 mM yang diatur menggunakan senyawa KNO₃, NH₄NO₃ dan (NH₄)₂SO₄ sebagai sumber ion NO₃⁻ atau NH₄⁺ seperti dalam medium (Tabel 1). Misal pada perlakuan NO₃⁻ : NH₄⁺ = 0:1 maka digunakan (NH₄)₂SO₄ sebagai sumber N, sedangkan

untuk rasio NO₃⁻ : NH₄⁺ = 1:0 maka sumber N hanya ditambahkan dari KNO₃ (Tabel 1). Untuk senyawa makro elemen yang lain tetap sesuai dengan komposisi standar medium MS yakni (dalam mg L⁻¹) CaCl₂ 332.02, MgSO₄ 180.54 dan KH₂PO₄ 170.00. Medium perlakuan-perlakuan nitrogen di atas diperkaya dengan BA 0.25 mg L⁻¹. Selanjutnya dilakukan evaluasi dengan membandingkan dua medium terbaik dari percobaan ke 3 terhadap medium MS standar (MS dengan nisbah NO₃⁻ : NH₄⁺ 2:1).

Rancangan Percobaan dan Pengamatan

Percobaan disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap, dengan 10 ulangan. Setiap ulangan terdiri dari 1 botol yang diisi 6 potongan buku ruas. Botol kultur disusun di dalam rak kultur dan disimpan dalam ruang inkubasi dengan intensitas cahaya 46 μmol m⁻² detik⁻¹ selama 16 jam pada kisaran suhu 22 - 25°C dan kelembaban udara 60%.

Pengamatan respon pertumbuhan dan perkembangan tunas dilakukan pada 4 minggu setelah tanam (MST) meliputi meliputi jumlah tunas, tinggi tunas, jumlah daun dan jumlah buku. Pada perlakuan total konsentrasi N dan pengaruh nisbah NO₃⁻ : NH₄⁺ pengamatan ditambah dengan peubah bobot basah dan bobot kering secara total (tajuk dan kalus), dengan sampling sebanyak 4 ulangan untuk masing-masing perlakuan. Selain itu disajikan data kadar air yang dihitung dengan formula: KA (%) =

$$\left(\frac{\text{bobot basah} - \text{bobot kering}}{\text{bobot basah}} \right) \times 100\%$$

Tabel 1. Konsentrasi ion NO₃⁻ dan NH₄⁺ dalam satuan mM dan g L⁻¹ pada perlakuan modifikasi medium dasar MS dengan perbedaan total N dan Nisbah NO₃⁻:NH₄⁺

Perlakuan	Ion N		Total N (mM)	Konsentrasi dalam mM (g L ⁻¹)			
	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺		KNO ₃	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	
Total Konsentrasi N	20 MS	13.3	6.7	20	6.7 (0.68)	6.7(0.54)	-
	40 MS	26.7	13.3	40	13.3 (1.34)	13.3(1.06)	-
	60 MS	41.2	18.8	60	18.8 (1.90)	20.6 (1.65)	-
	80 MS	53.3	26.7	80	26.6 (2.68)	26.6(2.12)	-
Nisbah NO ₃ ⁻ : NH ₄ ⁺ (% NO ₃ ⁻)	0:1 (0%)	0	60	60	-	-	30 (3.97)
	1:3 (25%)	15	45	60	-	15 (1.20)	15 (1.99)
	1:1 (50%)	30	30	60	-	30 (2.40)	-
	3:1 (75%)	45	15	60	30 (3.03)	15 (1.20)	-
	1:0 (100%)	60	0	60	60 (6.06)	-	-
MS Standard	2:1 (66.7%)	41.2	18.8	60	18.8 (1.90)	20.61(1.65)	-

Medium dasar yang digunakan adalah MS dengan kandungan nitrogen (NH₄NO₃ dan KNO₃) disesuaikan dengan sumber nitrogen sesuai perlakuan.

Analisis data

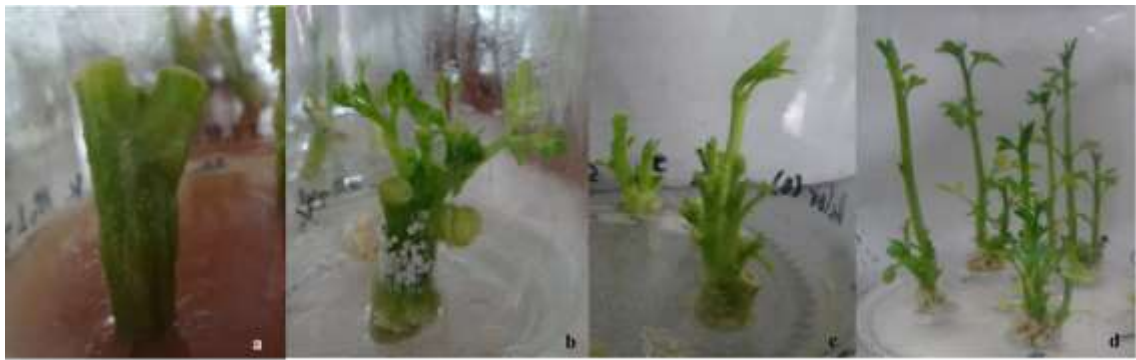
Data yang didapatkan dianalisis menggunakan ANOVA untuk melihat pengaruh nyata / tidak nyata perlakuan, dan jika perlakuan berpengaruh nyata maka dilakukan analisis uji lanjut DMRT untuk pengelompokkan respon pertumbuhan karena perlakuan. Nilai rata-rata disajikan bersama nilai *standard error* (SE) sebagai grafik maupun dalam tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Konsentrasi BA terhadap Pertumbuhan dan Proliferasi Tunas Kelor

Regenerasi *in vitro* tanaman kelor dari berbagai eksplan telah banyak dilaporkan, diantaranya dari buku tunas juvenil tanaman kelor dewasa (Marfori, 2010), tunas asal

kecambah dan embrio muda (Stephenson & Fahey, 2004), buku kotiledon (Steinitz *et al.*, 2009), daun muda (Jun-jie *et al.*, 2018). Pada percobaan ini, eksplan buku tunas dari tanaman kelor dewasa mengalami pertumbuhan dan proliferasi. Eksplan buku ruas dari batang tanaman kelor dewasa berhasil tumbuh pada medium inisiasi setelah melalui medium antibiotik selama 3 hari (Gambar 1a). Pada ketiak daun pada buku batang tumbuh beberapa tunas aksilar (Gambar 1b). Beberapa tunas aksilar yang tumbuh sebagian membentuk percabangan (Gambar 1c). Tunas aksilar membentuk daun majemuk yang berukuran kecil dengan jumlah anak daun tidak lebih dari 9 satuan (Gambar 1d). Pada pangkal eksplan yang bersentuhan dengan medium, kalus terbentuk secara ekstensif (Gambar 1d).



Gambar 1. Pertumbuhan tunas kelor *in vitro*. a) eksplan buku tunas muda asal tanaman dewasa (3 HST); b) tunas baru muncul setelah inisiasi pada medium pertumbuhan (4 MST); c) tunas yang tumbuh dari eksplan setelah pemindahan ke medium proliferasi (4 MST); d) proliferasi tunas dari buku tunas di medium proliferasi, (4 MST)

Tabel 2. Pertumbuhan tunas *in vitro* tanaman kelor pada perlakuan konsentrasi BA (4 MST)

Konsentrasi BA (mg L ⁻¹)	Jumlah tunas	Tinggi tunas (cm)	Jumlah daun	Jumlah buku
0.00	1.11 ± 0.212 b	3.22 ± 0.423 c	1.76 ± 1.914 b	4.89 ± 2.851 b
0.05	1.11 ± 0.320 b	3.45 ± 0.514 abc	2.32 ± 2.225 b	5.57 ± 2.802 b
0.10	1.18 ± 0.376 ab	3.98 ± 0.907 a	4.85 ± 3.423 a	8.12 ± 3.579 a
0.25	1.34 ± 0.616 a	3.81 ± 0.906 ab	5.47 ± 4.132 a	8.32 ± 4.144 a
0.50	1.40 ± 0.710 a	2.59 ± 1.136 c	4.80 ± 3.833 a	7.49 ± 4.257 a
1.00	1.25 ± 0.585 ab	1.90 ± 0.839 d	2.12 ± 2.487 b	4.52 ± 2.724 b

Keterangan: Nilai merupakan rata-rata ± SE; huruf yang sama pada kolom dan perlakuan yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5%

Respon pertumbuhan kultur yang ditunjukkan oleh jumlah tunas aksilar, tinggi tunas, jumlah daun dan jumlah buku tunas bersifat parabolik terhadap konsentrasi BA dalam medium, yaitu meningkat dengan meningkatnya konsentrasi BA dengan puncak pada konsentrasi 0.25 mg L⁻¹, lalu menurun pada konsentrasi 1.0 mg L⁻¹ (Tabel 2). BA dengan konsentrasi 0.5 – 1.0 mg L⁻¹ digunakan untuk menginduksi proliferasi dan perbanyak tunas kelor *in vitro* (Ravi *et al.*, 2019). Pada penelitian ini, BA dengan konsentrasi rendah yakni 0.25 mg L⁻¹ optimum untuk memacu pertumbuhan tunas dan perbanyak karena panjang ruas antar buku memudahkan subkultur. Pada konsentrasi BA rendah kalus yang tumbuh pada dasar potongan ruas buku juga berkurang (Afolabi *et al.*, 2018; Hassanein *et al.*, 2019), sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi (3 mg L⁻¹), BA dapat menginduksi organogenesis tidak langsung melalui pembentukan kalus (Gupta *et al.*, 2020).

Pengaruh Konsentrasi Total N dalam Medium terhadap Pertumbuhan Tunas Kelor

Perlakuan total N dalam medium dasar MS menunjukkan pengaruh parabolik, yaitu meningkatkan pertumbuhan tunas dengan meningkatnya konsentrasi dari 20 ke 40 dan 60 mM kemudian menurun pada konsentrasi 80

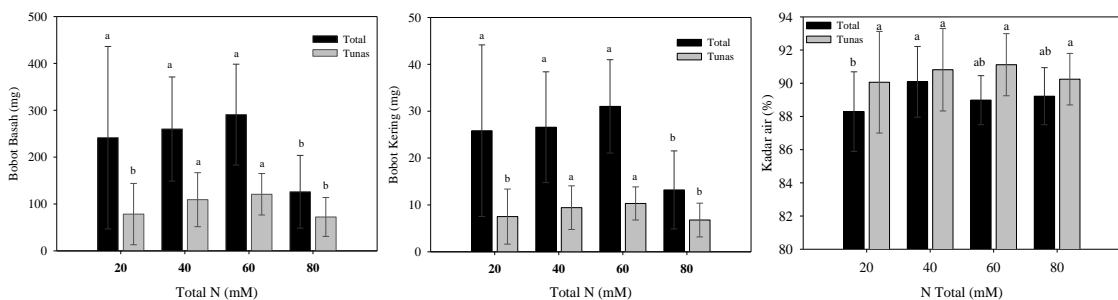
mM untuk peubah pertumbuhan rata-rata tinggi tunas, jumlah buku dan jumlah daun (Tabel 3). Bobot basah (Gambar 2a) dan bobot kering tunas (Gambar 2b) *in vitro* menunjukkan pola respon yang sama yaitu parabolik, bobot meningkat dari konsentrasi 20 mM ke 40-60 mM dan menurun pada konsentrasi 80 mM N (Gambar 2a, 2b). Kadar air (KA) tunas menunjukkan respon yang tidak berbeda nyata antar perlakuan, akan tetapi pada %KA secara total (tunas dan kalus) menunjukkan bahwa perlakuan total N 40 mM mempunyai kadar air yang lebih tinggi (Gambar 2c). Kadar air yang tinggi berkorelasi dengan tingkat hiperhidrik dan vigor tunas *in vitro* (Gao *et al.*, 2017). Tunas hiperhidrik pada kultur jaringan tidak bertahan hidup pada tahap aklimatisasi dan karena itu merupakan kegagalan dalam perbanyak tanaman.

Tunas kelor *in vitro* pada penelitian ini dapat tumbuh baik pada medium dengan total nitrogen 40 mM, walaupun tunas tumbuh lebih vigor pada konsentrasi 60 mM, namun pertumbuhan menjadi kurang optimal pada konsentrasi nitrogen 80 mM. Konsentrasi N 40-60 mM merupakan konsentrasi yang umum digunakan untuk berbagai jenis tumbuhan, walaupun pada tanaman tertentu, misalnya apokat, gejala seperti keracunan amonium, dapat terjadi pada konsentrasi N tersebut (Witjaksono *et al.*, 1999).

Tabel 3. Pertumbuhan tunas kelor *in vitro* pada perlakuan konsentrasi total N (4 MST)

Total N (mM)	Jumlah tunas	Tinggi tunas (cm)	Jumlah daun	Jumlah buku
20 MS	1.36 ± 0.763	2.52 ± 1.393 c	3.89 ± 2.855 b	4.94 ± 2.619 b
40 MS	1.35 ± 0.658	3.96 ± 1.669 a	6.00 ± 3.027 a	7.25 ± 3.149 a
60 MS	1.43 ± 0.619	3.87 ± 1.619 a	6.68 ± 3.133 a	8.07 ± 3.485 a
80 MS	1.20 ± 0.448	3.30 ± 1.587 c	4.37 ± 2.569 b	5.59 ± 2.475 b

Keterangan: Nilai merupakan rata-rata ± SE; Huruf yang sama pada kolom dan perlakuan yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5%



Gambar 2. Pengaruh total N dalam medium MS terhadap bobot basah (a), bobot kering (b) dan kadar air (c) tunas dan total biomasa *in vitro* kultur jaringan kelor.

Pengaruh Nisbah Nitrat dan Amonium terhadap Pertumbuhan Tunas Kelor

Perlakuan nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ pada taraf konsentrasi N 60 mM berpengaruh nyata dan menunjukkan pengaruh parabolik terhadap variabel rata-rata tinggi tunas, jumlah daun dan jumlah buku, tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap jumlah tunas yang terbentuk. Medium dengan konsentrasi NH_4^+ yang lebih tinggi ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+ = 1:3$) menghasilkan pertumbuhan tunas *in vitro* tanaman kelor yang kurang vigor. Tunas yang hanya mendapat N dalam satu jenis ion, yaitu NO_3^- (MS 1:0) atau NH_4^+ saja (MS 0:1), juga menunjukkan pertumbuhan tinggi serta jumlah daun yang lebih rendah dibandingkan tunas yang tumbuh pada medium dengan nisbah lainnya (Tabel 4).

Data bobot basah dan bobot kering tunas *in vitro* menunjukkan pola respon yang sama dengan dengan pola respon jumlah buku, yaitu parabolik terhadap bobot basah dan bobot kering tunas, yaitu meningkat dari nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+ = 1:0$ ke nisbah 3:1 dan mencapai puncaknya pada nisbah 1:1 kemudian menurun pada nisbah 1:3 dan mencapai nilai terendah pada nisbah 0:1 (Gambar 3a, 3b). Pengaruh nisbah N terhadap berat kering dan berat basah total (tunas dan kalus) juga nyata dan menunjukkan pola

parabolik pada berat basah dan berat kering tunas (Gambar 3a, 3b). Penghitungan terhadap kadar air total menunjukkan respon yang tidak berbeda nyata antar perlakuan nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, sehingga nisbah nitrat/ amonium tidak banyak berpengaruh terhadap tingkat hiperhidrik pada tanaman kelor (Gambar 3c).

Hasil percobaan pengaruh nisbah nitrat/ amonium menunjukkan bahwa tunas kelor tumbuh lebih vigor pada media dengan konsentrasi ion nitrat (NO_3^-) sama atau lebih tinggi dibandingkan amonium (NH_4^+). Hasil evaluasi media dengan MS1:1 dan MS3:1 yang dibandingkan dengan media MS standar (Nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+ = 2:1$) menunjukkan bahwa pertumbuhan tunas *in vitro* yang diamati tidak berbeda nyata (Tabel 5). Akan tetapi, parameter bobot basah menunjukkan nilai yang secara nyata lebih tinggi pada nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+ = 3:1$ daripada nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+ = 1:1$ dan kontrol $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+ = 2:1$ (Gambar 4a), tetapi perbedaan nilai yang nyata itu tidak teramati pada variabel bobot kering tunas (Gambar 4b). Penghitungan terhadap kadar air tunas menunjukkan perlakuan nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+ = 3:1$ mempunyai kadar air yang tertinggi dibanding medium lainnya yang sejalan dengan tingkat pertumbuhan tunas serta bobot basah dan bobot keringnya (Gambar 4c).

Tabel 4. Pertumbuhan tunas kelor *in vitro* pada perlakuan nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (4 MST)

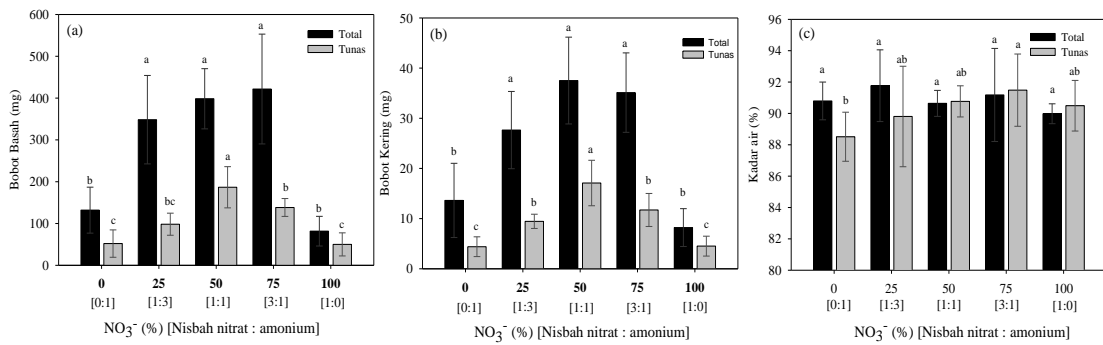
Nisbah $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$	Jumlah tunas	Tinggi tunas (cm)	Jumlah daun	Jumlah buku
MS 0:1	1.00 ± 0.000	1.31 ± 0.097 c	1.04 ± 0.583 b	2.21 ± 0.516 c
MS 1:3	1.00 ± 0.136	2.83 ± 0.499 b	5.71 ± 2.029 a	6.92 ± 1.908 b
MS 1:1	0.96 ± 0.083	4.39 ± 0.973 a	6.33 ± 2.819 a	8.04 ± 2.753 ab
MS 3:1	0.96 ± 0.250	4.42 ± 1.262 a	7.42 ± 2.817 a	9.46 ± 3.256 a
MS 1:0	0.96 ± 0.083	1.47 ± 0.420 c	0.92 ± 0.752 b	2.88 ± 1.212 c

Keterangan: Nilai merupakan rata-rata ± SE; Huruf yang sama pada kolom dan perlakuan yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5%

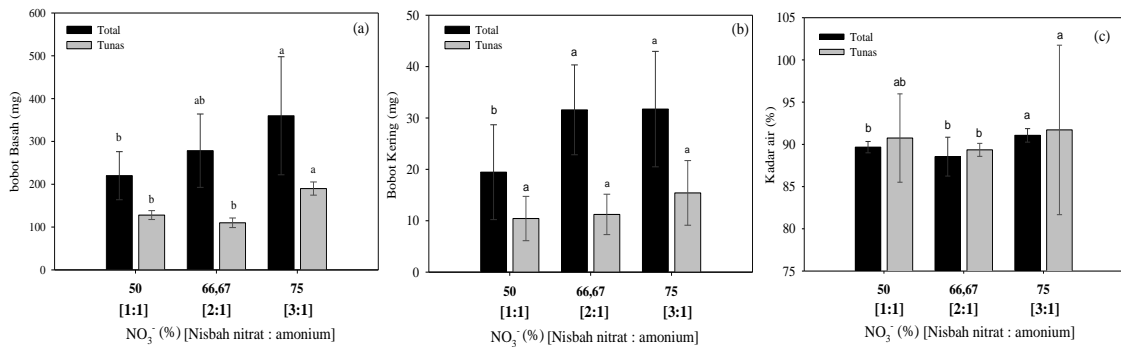
Tabel 5. Pertumbuhan tunas *in vitro* kelor pada perlakuan modifikasi medium MS (4 MST)

Medium	Jumlah Tunas	Tinggi tunas (cm)	Jumlah Daun	Jumlah Buku
60 MS 1:1	1.46 ± 0.776 a	4.17 ± 2.193 a	6.17 ± 3.843 a	7.48 ± 4.137 a
60 MS 2:1	1.63 ± 0.928 a	3.48 ± 1.293 b	5.49 ± 2.501 a	6.82 ± 2.074 a
60 MS 3:1	1.73 ± 0.828 a	3.41 ± 1.393 b	6.03 ± 2.883 a	7.17 ± 3.196 a

Keterangan: Nilai merupakan rata-rata ± SE; Huruf yang sama pada kolom dan perlakuan yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5%



Gambar 3. Pengaruh Nisbah NO₃⁻ : NH₄⁺ terhadap bobot basah (a), bobot kering (b) dan kadar air (c) tunas dan total biomasa *in vitro* kultur jaringan kelor.



Gambar 4. Pengaruh modifikasi N medium terhadap bobot basah (a), bobot kering (b) dan kadar air (c) tunas dan total biomasa *in vitro* kultur jaringan kelor.

Pertumbuhan tunas yang ditunjukkan dengan jumlah buku tunas dan biomassa (bobot basah dan bobot kering) dari tunas *in vitro* kelor yang lebih baik pada medium dengan nisbah nitrat/ amonium yang lebih tinggi (NO₃⁻:NH₄⁺ = 3:1) dibandingkan nisbah yang lebih rendah (2:1 atau 1:1) juga ditunjukkan pada kultur tunas apokat (Witjaksono *et al.*, 1999) dan biak suspensi embriogenik apokat (Witjaksono dan Litz, 1999). Keunggulan medium dengan nisbah nitrat/ amonium 3:1 mungkin berkaitan dengan pH medium selama pertumbuhan. Nisbah nitrat/ amonium memengaruhi pH medium setelah pertumbuhan sel embriogenik apokat, yaitu pH medium berubah mencapai 7 pada medium dengan sumber N hanya nitrat dan mencapai 4.2 pada medium dengan amonium sebagai satu-satunya sumber N, dan pada nisbah 3:1 pH medium tetap 5.6-5.7 seperti pH awal medium dibuat (Witjaksono dan Litz, 1999). Penyerapan nitrat yang lebih efektif akan lebih mendorong pertumbuhan tunas (Máximo *et al.*, 2015). Faktor lainnya yakni ion nitrat diketahui merupakan jenis pasokan N yang lebih sesuai dan dibutuhkan lebih

banyak untuk kebanyakan spesies tanaman, dan merupakan bentuk N yang mudah diserap oleh tanaman (Jamshidi *et al.*, 2016), sedangkan kadar ion amonium yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan panjang/ tinggi tunas akibat penurunan nitrat reduktase dan enzim sintesis glutamat dalam memproduksi asam amino (Shirdel *et al.*, 2011).

Konsentrasi ion NH₄⁺ yang tinggi terutama pada medium NO₃⁻:NH₄⁺ = 1:3 pada percobaan ini menunjukkan pertumbuhan dan biomassa tanaman yang lebih rendah. Hal ini mungkin karena efek penghambatan yang signifikan dari NH₄⁺ pada serapan ion lain seperti Ca, Mg, K dan P (Kubota *et al.*, 2000), menyebabkan gangguan fisiologis dan morfologis (Jamshidi *et al.*, 2016), dan dapat memengaruhi akumulasi biomassa dan metabolit sekunder pada kultur akar *Hypericum perforatum* L (Cui *et al.*, 2010). Keseimbangan ion NO₃⁻ dan NH₄⁺ dalam medium diperlukan untuk penyerapan ion NO₃⁻ yang lebih baik dan menghambat toksisitas NH₃ di dalam jaringan (Shirdel *et al.*, 2011). Kadar NH₄⁺ yang tinggi pada medium

pertumbuhan dicatat sebagai penyebab hiperhidrisitas dalam berbagai penelitian (Wada *et al.*, 2015). Pada penelitian ini NO_3^- : NH_4^+ dengan nisbah 3:1 menunjukkan nisbah yang optimal untuk pertumbuhan, proliferasi dan biomassa tunas aksilar dari tanaman kelor.

KESIMPULAN

Aplikasi ZPT BA dengan konsentrasi 0.25 mg L⁻¹ merupakan perlakuan terbaik dalam proliferasi tunas kelor *in vitro*. Modifikasi medium MS dengan total konsentrasi N 40-60 mM dengan nisbah NO_3^- : NH_4^+ 3:1 menunjukkan hasil pertumbuhan dan biomassa tunas *in vitro* kelor yang lebih baik dibandingkan medium MS standar dan dapat digunakan untuk perbanyakan bibit kelor *in vitro* dari pohon induk terpilih secara *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari kegiatan INSINAS dari Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi tahun anggaran 2018 dengan tema 'Pengembangan Tanaman Kelor sebagai Nutrisi Tambahan untuk Pangan Fungsional'. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Hasrat Enggal Prayogi, SP atas bantuan teknisnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Afolabi, J.O., D.B. Olomola, O.A. Osunlaja, E.O. Oloyede, I.O. Bolanle-Ojo. 2018. Effect of different media on seed germination and *in vitro* propagation of *Moringa oleifera* L. J. For. Res. Management. 15(1): 13-21.
- Aminah, S., T. Ramdhan, M. Yanis. 2015. Kandungan Nutrisi dan Sifat Fungsional Tanaman Kelor (*Moringa oleifera*). Buletin Pertanian Perkotaan Nomor 5 Volume 2. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jakarta.
- Baldisserotto, A., P. Buso, M. Radice, V. Dissette, I. Lampronti, R. Gambari, S. Manfredini, S. Vertuani. 2018. *Moringa oleifera* leaf extracts as multifunctional ingredients for "natural and organic" sunscreens and photoprotective preparations. Molecules. 23(3). <https://doi.org/10.3390/molecules23030664>.
- Cui, X.H., H.N., Murthy, C.H. Wu, K.Y. Paek. 2010. Adventitious root suspension cultures of *Hypericum perforatum*: Effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 46(5): 437-444. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9310-y>.
- Dalton, S.J. 2020. A reformulation of Murashige and Skoog medium (WPBS medium) improves embryogenesis, morphogenesis and transformation efficiency in temperate and tropical grasses and cereals. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 141:257-273. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01784-8>.
- Gao, H., X. Xia, L. An, X. Xin, Y. Liang. 2017. Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO₃ and its associated mechanism during *in vitro* culture. Plant Sci. 254: 1-11.
- George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture Part 1 In Practice. 2nd edition. Exegetic Limited, England. 574p.
- Gonda, S., A. Kiss-Szikszai, Z. Szucs, C. Máthé, G. Vasas. 2014. Effects of N source concentration and NH_4^+ / NO_3^- ratio on phenylethanoid glycoside pattern in tissue cultures of *Plantago lanceolata* L.: A metabolomics driven full-factorial experiment with LC-ESI-MS3. Phytochemistry. 106 (3): 44-54.

- Gupta S., S. Kachhwaha, S.L. Kothari, R. Jain. 2020. Synergistic effect of cytokinins and auxins enables mass clonal multiplication of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.): a wonder. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 56: 458-469. <http://doi.org/10.1007/s11627-020-10065-0>.
- Hassanein, A.M., J.M. Salem, F.A. Faheed, A. El-nagish. 2018. Effect of anti-ethylene compounds on isoenzyme patterns and genome stability during long term culture of *Moringa oleifera*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 132(1): 201–212.
- Hassanein, A., J. Salem, F. Faheed, A. El-Nagish. 2019. Some important aspects in *Moringa oleifera* Lam. micropropagation. *Acta Agric. Slov.* 113(1): 13–27. <https://doi.org/10.14720/aas.2019.113.1.02>.
- Jamshidi, S., A. Yadollahi, H. Ahmadi, M.M. Arab, M. Eftekhari. 2016. Predicting in vitro culture medium macronutrients composition for pear rootstocks using regression analysis and neural network models. *Front. Plant Sci.* 7: 1–12.
- Jun-jie, Z., Y. Yue-sheng, L. Meng-fei, L. Shu-qi, T. Yi, C. Han-bin, C. Xiao-yang. 2017. An efficient micropropagation protocol for direct organogenesis from leaf explants of an economically valuable plant, drumstick (*Moringa oleifera* Lam.). *Industrial Crops and Products.* 103: 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.028>.
- Kubota S., K. Yoneda, Y. Suzuki. 2000. Effects of ammonium to nitrate ratio in culture medium on growth and nutrient absorption of *Phalaenopsis* seedling in vitro. *Env. Contr. Biol.* 38(4): 281-284.
- Khor, K. Z., V. Lim, E. J. Moses, N. A. Samad. 2018. The in vitro and in vivo anticancer properties of *Moringa oleifera*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* <https://doi.org/10.1155/2018/1071243>.
- Marfori, E.C. 2010. Clonal micropropagation of *Moringa oleifera* L. *Philippine Agric. Scientist.* 93(4): 454–457.
- Máximo, W. P. F., P.A.A. Santos, E.G. Mendonça, B.R. Santos, L.V. Paiva. 2015. Nitrate (NO₃⁻) and ammonium (NH₄⁺) ratios for propagation of Eucalyptus hybrid in two different in vitro cultivation systems. *Austr. J. Crop Sci.* 9(12): 1242–1248.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15 (3): 473–497.
- Poerba, Y.S., T. Handayani, Witjaksono. 2017. Karakterisasi pisang rejang tetraploid hasil induksi dengan oryzalin. *Berita Biologi.* 16 (1): 85 – 93.
- Ravi, R.S.D., E.A. Siril, B.R. Nair. 2019. The effect of silver nitrate on micropropagation of *Moringa oleifera* Lam. an important vegetable crop of tropics with substantial nutritional value. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 25(5): 1311–1322. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00689-x>.
- Ridwan, Witjaksono. 2020. Induction of autotetraploid *Moringa* plant (*Moringa oleifera*) using oryzalin. *Biodiversitas.* 21(9): 4086-4093.

- Romeida, A., S.H. Sutjahjo, A. Purwito, D. Sukma, Rustikawati. 2015. Optimasi pertumbuhan dan multiplikasi lini klon PLBs Anggrek *Spathoglottis plicata* Blume melalui modifikasi komposisi medium MS dan sitokinin. J. Hort. Indonesia. 4(1): 1-8. <https://doi.org/10.29244/jhi.4.1.1-8>.
- Shirdel, M., A. Motallebi-Azar, S. Masiha, N. Mortazavi, M. Matloobi, Y. Sharafi. 2011. Effects of inorganic nitrogen source and NH_4^+ : NO_3^- ratio on proliferation of dog rose (*Rosa canina*). J. Medicin. Plant Res. 5(18): 4605–4609.
- Stephenson, K.K., J.W. Fahey. 2004. Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* spp. germplasm. Economic Botany 58(Supplement): S116–S124.
- Steinitz, B., Y. Tabib, V. Gaba, T. Gefen, Y. Vaknin. 2009. Vegetative micro-cloning to sustain biodiversity of threatened *Moringa* species. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 45: 65–71. DOI 10.1007/s11627-008-9162-x.
- Wada, S., R.P. Niedz, B.M. Reed. 2015. Determining nitrate and ammonium requirements for optimal in vitro response of diverse pear species. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 51(1): 19–27.
- Wasonowati, C., E. Sulistyaningsih, D. Indradewa, D. Kurniasih. 2018. Pertumbuhan bibit kelor (*Moringa Oleifera* Lamk) dari biji dan stek dengan interval pemberian air yang Berbeda. Prosiding Seminar Nasional Dalam Rangka Dies Natalis UNS Ke 42 Tahun 2018 “Peran Keanekaragaman Hayati untuk Mendukung Indonesia sebagai Lumbung Pangan Dunia”. 2(1): 175-181.
- Witjaksono, B.A. Schaffer, A.M. Colls, R.E. Litz, P.A. Moon. 1999. Avocado shoot culture, plantlet development and net CO₂ assimilation in an ambient and CO₂ enhanced environment. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 35:238-244.
- Witjaksono, R.E. Litz. 1999. Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 58: 141–148.
- Witjaksono, A. Leksonowati. 2012. Iradiasi sinar γ pada biak tunas kentang hitam (*Solanostemon rotundifolius*) efektif untuk menghasilkan mutan. J. Biol. Indonesia. 8(1): 167-179.