

TEKNIK STERILISASI EKSPLAN DAN INDUKSI TUNAS DALAM MIKROPROPAGASI TEMBESU (*Fagraea fragrans* ROXB)

*Explant Sterilization and Shoot Induction Techniques in Micropropagation of Tembesu
(Fagraea fragrans Roxb.)*

Rhomi Ardiansyah¹, Supriyanto¹, Arum Sekar Wulandari¹, Benny Subandy², Yuli Fitriani²

¹Departemen Silviculture, Fakultas Kehutanan, IPB

²Pusat Perbenihan dan Persemaian Rumpin, Kementerian Kehutanan, Bogor

ABSTRACT

Tembesu (Fagraea fragrans Roxb) is important tree species for furniture due to its decorative structure, but its propagation facing to the problems on seed availability. Determining explant sterilization technique of tembesu (Fagraea fragrans Roxb.) in in vitro condition is needed to produce aseptic explants for shoot induction in micropropagation techniques. Shoot induction of explants depends on plant growth regulator and growth medium compositions. This study was aimed (1) to analyzing the effect of sodium hypochlorite 10% in sterilization process to obtain aseptic explants, (2) to find out plant growth regulator and growth medium composition on shoot induction of tembesu (F. fragrans Roxb.) in in vitro condition. This study was conducted at Tissue Culture Laboratory, Rumpin Seed Source and Nursery Center, The Ministry of Forestry, Bogor on February – June 2014. Explants were sterilized using sodium hypochlorite (NaOCl 5.25%) at 10% of concentrations in various durations (5, 10, 15, and 20 minutes). Shoot induction was done using MS medium, MS modified medium, and MS added with 15% coconut water that combined with 1.5 ppm of BAP. The result showed that explants soaked in sodium hypochlorite 10% within 20 minutes was recommended for explants sterilization technique of tembesu. Combination treatment between BAP 1.5 ppm and MS modified medium was the most favorable culture medium for shoot induction of tembesu.

Keyword: Benzylaminopurine, *Fagraea fragrans*, micropropagation, Murashige-Skoog modified, sodium hypochlorite

PENDAHULUAN

Eksplan yang digunakan pada teknik mikropropagasi harus bebas dari kontaminan, seperti fungi dan bakteri. Teknik sterilisasi permukaan banyak digunakan untuk menghilangkan kontaminan yang terdapat pada permukaan eksplan. Selama proses sterilisasi, eksplan harus tetap hidup dan hanya kontaminan yang dieliminasi (Oyebanji *et al.* 2009). Oleh karena itu, sterilisasi permukaan dilakukan dengan merendam eksplan dalam larutan disinfektan dengan konsentrasi tertentu selama periode tertentu.

Sterilan, atau disinfektan, yang biasa digunakan untuk sterilisasi permukaan eksplan adalah natrium hipoklorit (NaOCl) atau kalsium hipoklorit (Ca[OCl]₂) (Dodds dan Roberts 1985). Senyawa hipoklorit sangat efektif dalam mengurangi kontaminasi pada teknik mikropropagasi (Bhojwana dan Razdan 1996; Oyebanji *et al.* 2009). Penggunaan Ca(OCl)₂ atau NaOCl mempunyai kelebihan dan kekurangan dan memberikan hasil yang berbeda untuk setiap jenis eksplan yang digunakan. Sterilan Ca(OCl)₂ memiliki pH yang stabil namun dapat merusak jaringan pada bagian potongan eksplan sedangkan NaOCl memiliki pH yang tidak stabil, bersifat toksik, namun tidak merusak jaringan. Sterilan NaOCl digunakan sebagai sterilan dalam berbagai teknik sterilisasi eksplan dengan konsentrasi dan lama perendaman yang berbeda (Dumani *et al.*

2007; Khan *et al.* 2007; Peiris *et al.* 2012; Goswami dan Handique 2013; Olowe *et al.* 2014)

Eksplan yang digunakan pada penelitian ini adalah eksplan tembesu. Tembesu (*Fagraea fragrans* Roxb.), jenis lokal yang berpotensi di daerah Jambi, Sumatera Selatan, Lampung (Asmaliyah *et al.* 2012) dan Kalimantan Barat (Rosalia 2008). Tembesu merupakan jenis tanaman pionir yang dapat tumbuh di areal bekas terbakar dan padang rumput. Kayu tembesu dapat digunakan untuk kayu konstruksi bangunan, jembatan, tiang listrik, dan *furniture* serta bagian kulit batang dan daun dari jenis ini dapat digunakan sebagai obat-obatan (Putra *et al.* 2011).

Sampai saat ini, perbanyakan vegetatif tembesu dilakukan dengan metode stek batang yang memiliki persentase keberhasilan sebesar 92% (Sofyan dan Muslimin 2007). Perbanyakan secara mikropropagasi masih terbatas, antara lain dilakukan Lee dan Rao (1986) menghasilkan tunas adventif tembesu melalui metode mikropropagasi, namun secara teknis tidak dijelaskan dengan lengkap.

Metode mikropropagasi dapat dideskripsikan sebagai multiplikasi tanaman secara *in vitro* dengan menggunakan media buatan aseptik yang mengandung larutan nutrisi, bahan organik, dan hormon (zat pengatur tumbuh (ZPT)). Metode mikropropagasi yang sering digunakan untuk produksi bibit secara komersial adalah teknik kultur tunas. Kultur tunas adalah perbanyakan

tanaman dengan cara merangsang (proliferasi) pertumbuhan tunas aksilar atau adventif yang sudah ada pada eksplan (Sulistiani dan Yani 2012). Pertumbuhan tunas, aksilar atau adventif, pada eksplan dipengaruhi oleh penggunaan ZPT (khususnya sitokinin) pada media tumbuh (George *et al.* 2008).

Sitokinin berfungsi untuk mendorong sintesis protein dan berpartisipasi dalam pengaturan siklus sel (Srivastava 2002; George *et al.* 2008). Sitokinin berperan dalam banyak proses fisiologi dan perkembangan tumbuhan, termasuk pematangan daun, mobilisasi nutrisi, dominansi apikal, pembentukan dan pengaktifan meristem pucuk apikal, perkembangan bunga, pemecahan dormansi pucuk, dan perkecambahan benih (Taiz dan Zeiger 2002). Pada kegiatan mikropropagasi, sitokinin sintetik banyak digunakan untuk mendorong pertumbuhan pucuk, baik itu lateral maupun adventif. Sitokinin sintetik yang paling banyak digunakan antara lain benziladenin (BA/BAP) dan kinetin (Srivastava 2002). Benziladenin (BA/BAP) dapat mendorong pertumbuhan pucuk aksilar namun menghambat pemanjangan pucuk (George *et al.* 2002).

Morfogenesis tanaman pada media mikropropagasi juga dipengaruhi oleh total nitrogen yang terdapat di dalam media (George *et al.* 2002). Media mikropropagasi yang biasa digunakan untuk mikropropagasi adalah media MS (Murashige dan Skoog 1962). Pada media ini, total nitrogen yang terdapat di dalam media adalah 60 μM dengan rasio $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ adalah 2:1. Rasio nitrat dan ammonium pada media kultur dapat mempengaruhi aktivitas ZPT (George *et al.* 2002). Penelitian ini bertujuan (1) untuk mendapatkan teknik sterilisasi yang tepat untuk menghasilkan eksplan tembesu steril dan (2) menganalisis pengaruh komposisi media tumbuh terhadap induksi tunas tembesu.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di *Tissue Culture Laboratory, Rumpin Seed Source and Nursery Center*, KOICA, Bogor. Waktu pelaksanaannya pada bulan Februari sampai dengan Juni 2014.

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan antara lain bagian tunas (apikal atau lateral) tembesu (*F. fragrans*) berukuran 2 sampai dengan 3 cm, fungisida (bahan aktif propineb 70%), bakterisida (bahan aktif streptomycin sulfate 6.41%), media Murashige-Skoog (MS) (Murashige and Skoog 1962), air kelapa (*coconut water* (CW)), akuades steril, deterjen, alkohol 70%, *tween* 20, natrium hipoklorit (NaOCl 5.25%), dan benzilaminopurin (BAP). Alat yang digunakan antara lain *laminar air flow cabinet* (LAF), botol kultur, cawan petri, dan gelas ukur.

Metode Penelitian

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan cara dicuci menggunakan deterjen (2g/L, 10 menit), direndam

dalam fungisida kontak (3 g/L, 2 jam), dan bakterisida (3 g/L, 1 jam) yang dilakukan di luar LAF. Perkejaan berikutnya dilakukan di dalam LAF, eksplan direndam dalam larutan NaOCl konsentrasi 10% (v/v) dan *tween* 20 (2 tetes). Lama perendaman bervariasi bergantung pada perlakuan. Setelah eksplan disterilasi kemudian ditanam pada media MS.

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap dengan satu faktor yaitu waktu perendaman NaOCl 10% (v/v) dengan 4 taraf perlakuan (5, 10, 15, dan 20 menit). Setiap perlakuan terdiri atas 3 ulangan, setiap ulangan terdiri atas 10 eksplan. Total eksplan yang digunakan adalah $4 \times 3 \times 10 = 120$ eksplan.

Pengamatan dilakukan selama 4 minggu. Peubah yang diukur yaitu:

- Persentase hidup eksplan aseptik: jumlah eksplan yang dapat hidup dan aseptik, dengan kriteria memiliki pertumbuhan pucuk dan/atau akar dibandingkan dengan jumlah seluruh eksplan.
- Persentase kontaminasi: jumlah eksplan yang mengalami kontaminasi bakteri dan/atau fungi dibandingkan dengan seluruh jumlah eksplan.
- Persentase pencokelatan (*browning*): jumlah eksplan yang mengalami pencokelatan dibandingkan dengan jumlah seluruh eksplan.

Eksplan yang telah aseptik kemudian dipindahkan ke media induksi tunas. Media yang digunakan untuk induksi tunas yaitu MS, MS modifikasi ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, 3:1, total N 80 μM), dan MS dengan tambahan air kelapa (CW) 150 mL/L. Rancangan percobaan untuk tahap induksi tunas yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap dengan satu faktor yaitu komposisi media tumbuh (MS0, MS modifikasi, MS+CW 15%, MS+BAP 1.5 ppm, MS modifikasi+BAP 1.5 ppm, dan MS+CW 15%+BAP 1.5 ppm). Setiap perlakuan terdiri atas 3 ulangan dan setiap ulangan terdiri atas 5 eksplan, sehingga total eksplan pengamatan berjumlah $6 \times 3 \times 5 = 90$ eksplan.

Pengamatan dilakukan selama 4 minggu. Peubah yang diukur yaitu:

- Panjang tunas: panjang tunas baru yang tumbuh.
- Jumlah daun: selisih jumlah daun akhir pengamatan dan awal pengamatan.
- Warna daun: hasil pengukuran warna daun menggunakan bagan warna daun (BWD).
- Jumlah tunas: selisih jumlah tunas akhir pengamatan dan awal pengamatan.
- Perilaku organogenesis: deskripsi perilaku organogenesis yang terjadi selama waktu pengamatan

Analisis Data

Data yang diambil kemudian dianalisis menggunakan *software Microsoft Excel, SAS Version 9.1*, dan *Minitab Version 16*. Untuk menentukan perbedaan antar perlakuan dilakukan uji jarak berganda Duncan (Mattjik dan Sumertajaya 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sterilisasi eksplan

Kontaminasi merupakan masalah paling umum yang ditemui pada teknik mikropropagasi. Umumnya ada empat sumber kontaminan yaitu: (1) pada tanaman baik internal maupun eksternal, (2) media kultur yang tidak disterilisasi dengan baik, (3) kondisi lingkungan, dan (4) cara kerja yang salah (Onwubiko *et al.* 2013). Kontaminan yang berasal dari berbagai sumber, seperti fungi dan bakteri, dapat mengurangi produktivitas dan tingkat keberhasilan kultur (Colgecen *et al.* 2011).

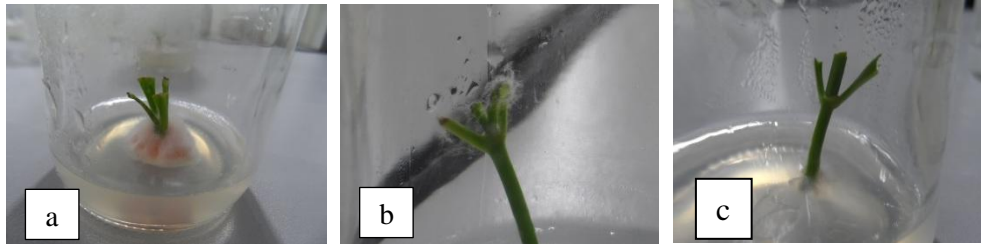
Kondisi eksplan yang aseptik merupakan syarat untuk dapat meningkatkan keberhasilan eksplan tumbuh dan aseptik sehingga dapat dilanjutkan ke tahapan berikutnya pada teknik mikropropagasi. Tahapan ini disebut dengan tahap inisiasi.

Pada proses penelitian ini, sebelum melaksanakan tahap inisiasi, sumber eksplan dikarantina selama 4 minggu di bedeng persemaian. Selama dalam karantina dilakukan penyemprotan sumber eksplan menggunakan fungisida (3 gr/L, 1 minggu sekali), bakterisida (3 gr/L, 1 minggu sekali), dan pestisida/insektisida (10 mL/L, 2 minggu sekali). Penyemprotan ini bertujuan untuk menghindarkan sumber eksplan dari hama dan penyakit. Kegiatan ini juga bertujuan untuk meminimalkan

terjadinya kontaminasi fungi dan bakteri pada kegiatan sterilisasi.

Sterilisasi menggunakan NaOCl 10% (v/v) dengan waktu 5, 10, 15, dan 20 menunjukkan bahwa lama waktu perendaman mempengaruhi persentase hidup eksplan dan kontaminasi. Eksplan yang disterilisasi dengan waktu 5-10 menit memiliki nilai 100% terkontaminasi, baik fungi maupun bakteri (Tabel 1). Hal ini dikarenakan perendaman dengan NaOCl 10% (v/v) selama 5-10 menit masih belum dapat menghilangkan keberadaan agen kontaminan yang terdapat pada permukaan eksplan. Penambahan waktu perendaman menjadi 15-20 menit menghasilkan terjadinya peningkatan jumlah eksplan tembus aseptik dengan persentase. Tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan perendaman NaOCl 10% (v/v) selama 20 menit merupakan metode sterilisasi paling baik dengan nilai persentase eksplan aseptik 33.33%.

Kontaminasi terjadi mulai dari hari ke-3 setelah penanaman. Kontaminan yang pertama kali muncul adalah kontaminasi fungi. Hifa fungi terdapat pada seluruh bagian eksplan. Hifa ini kemudian menutupi seluruh bagian eksplan pada hari ke-4 dan ke-5 setelah penanaman (Gambar 1). Kontaminasi fungi juga muncul pada hari ke-7 setelah penanam. Hanya sedikit eksplan yang tetap tumbuh dan aseptik sampai akhir pengamatan.



Gambar 1 Eksplan hasil sterilisasi; (a) eksplan terkontaminasi, (b) awal munculnya kontaminasi pada bagian atas eksplan, (c) eksplan aseptik.

Keseimbangan antara konsentrasi bahan sterilan dan lama perendaman harus ditentukan secara empiris karena adanya sifat fitotoksik dari sterilan (Bhojwana dan Razdan 1996; Oyebanji *et al.* 2009; Badoni&Chauhan 2010). Perendaman dengan sterilan NaOCl 1% selama 8 menit menghasilkan persentase hidup eksplan aseptik pada mikropropagasi kentang (*Solanum tuberosum*) kultivar 'Kufri Himalini' (Badoni dan Chauhan 2010). Pada mikropropagasi *Prunus mariana*, perendaman dengan NaOCl 10% selama 20 menit menghasilkan persentase hidup eksplan terbaik

(Amiri *et al.* 2013). Sterilisasi permukaan pada benih *cowpea*, padi, dan sorgum menggunakan NaOCl 3.5% yang direndam selama 30 menit sangat efektif dalam menghasilkan benih aseptik (Oyebanji 2009). Namun, pada mikropropagasi ubi manis, penggunaan sterilan NaOCl tidak efektif dalam penghambatan mikroba dan hanya menghasilkan eksplan aseptik yang sangat sedikit (Onwubiko *et al.* 2013).

Percobaan konsentrasi NaOCl tergantung pada kondisi eksplan yang disterilisasi. Pada eksplan yang sekulen harus menggunakan konsentrasi yang lebih

Tabel 1 Pengaruh lama perendaman NaOCl 10% terhadap persentase eksplan hidup, kontaminasi, dan pencokelatan pada eksplan tembus

Waktu perendaman	Persentase eksplan hidup (%)*	Persentase kontaminasi (%)*	Persentase Pencokelatan (%)
5 menit	0 ^b	100 ^a	0
10 menit	0 ^b	100 ^a	0
15 menit	26.67 ± 11.55 ^a	73.33 ± 11.55 ^b	0
20 menit	33.33 ± 23.09 ^a	66.67 ± 23.09 ^b	0

Data sudah ditranformasi menggunakan metode arcsin; Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan p -value < α ; * : Berpengaruh nyata pada taraf (α) 0.05 (p -value < α); ns : Tidak berpengaruh nyata pada taraf (α) 0.05 (p -value > α).

rendah, begitu juga sebaliknya. Pada keseluruhan eksplan terdapat bakteri yang tumbuh pada bagian bawah eksplan yang berdekatan langsung dengan media. Namun keberadaan bakteri tersebut tidak mematikan eksplan. Pada beberapa eksplan, kemunculan bakteri ini diikuti dengan munculnya fungi yang tumbuh pada bagian bawah eksplan. Bentuk kontaminasi seperti ini hanya terjadi pada sebagian kecil eksplan merupakan kontaminasi endogen.

Sterilisasi menggunakan NaOCl 10% (v/v) tidak dapat menghilangkan 100% kontaminasi, baik fungi maupun bakteri. Hal ini bukan berarti bahwa tembesu tidak dapat diperbanyak dengan teknik mikropropagasi. Eksplan aseptik yang berasal dari sterilisasi harus segera dipindahkan ke media multiplikasi supaya dapat menghasilkan banyak tunas baru yang kemudian akan menjadi planlet.

Induksi tunas

Perlakuan media dengan penambahan ZPT BAP 1.5 ppm menghasilkan jumlah tunas yang berbeda nyata (Tabel 2). Semua perlakuan berpengaruh nyata terhadap penambahan ZPT BAP 1.5 ppm.

Penggunaan ZPT BAP pada induksi tunas tembesu sangat berpengaruh terhadap jumlah tunas yang dihasilkan. Induksi tunas pada eksplan terjadi pada minggu kedua setelah tanam. Hal ini terlihat dari munculnya tunas-tunas berukuran kecil pada bagian ketiak daun dan, pada beberapa, terdapat tunas yang tumbuh pada daun (Gambar 2). Pada periode ini ada eksplan yang terlihat mulai membengkak dan membetuk kalus berwarna hijau muda.

Pada media MS modifikasi, konsentrasi ion nitrat ditingkatkan menjadi 60 mM dan ion amonium tetap 20 mM. Ion amonium tidak dinaikkan karena memiliki sifat toksik. Amonium dapat menyebabkan klorosis pada daun, pertumbuhan kerdil yang kemudian terjadi nekrosis (pencokelatan) dan akhirnya mati (Marschner 2012). Pertumbuhan dan morfogenesis pada kultur jaringan dipengaruhi oleh ketersediaan nitrogen di media tumbuh (George *et al.* 2008).

Secara umum, pembentukan tunas pada eksplan tembesu dipengaruhi oleh penambahan ZPT BAP pada setiap perlakuan, baik MS, MS modifikasi, dan MS dengan tambahan air kelapa. Perlakuan dengan tambahan ZPT BAP memiliki jumlah tunas yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan tanpa ZPT. Untuk parameter panjang tunas terlihat bahwa perlakuan

tanpa ZPT memiliki nilai tertinggi dari pada perlakuan dengan tambahan ZPT. Hal ini disebabkan BAP dapat mendorong pertumbuhan pucuk aksilar namun menghambat pemanjangan pucuk (George *et al.* 2002).

Untuk parameter jumlah daun, terlihat bahwa perlakuan MSmod+BAP memiliki nilai tertinggi kemudian diikuti oleh perlakuan MS0. Hal ini menunjukkan jumlah daun berhubungan dengan jumlah tunas dan panjang tunas. Banyaknya tunas yang muncul akan berpengaruh terhadap jumlah daun yang muncul, dan begitu pula dengan panjang tunas. Namun analogi ini tidak sepenuhnya terjadi pada semua eksplan. Ada beberapa eksplan yang memiliki panjang tunas yang tinggi namun jumlah daun yang sedikit, seperti pada perlakuan MSmod. Hal ini dapat terjadi karena pada perlakuan ini, pertumbuhan eksplan mengarah pada pemanjangan internode dan tidak memunculkan tunas baru, atau pemanjangan tunas apikal. Subkultur tunas pada media tanpa ZPT berdampak positif pada pemanjangan tunas dan menghambat pembentukan kalus (Ali 2009).

Penggunaan ZPT BAP untuk induksi tunas sudah digunakan pada mikropropagasi beberapa jenis tanaman hutan. Pada mikropropagasi *Azadirachta indica* A. Juss, penambahan BAP 1 μ M (0.2 mg/L) dan GA₃ 0.5 μ M, menghasilkan pertumbuhan tunas kerdil dan tidak memanjang (Chaturvedi *et al.* 2004). Pada mikropropagasi *Exavacum effine*, BAP 5 μ M menghasilkan eksplan bertunas sebesar 15 dari 18 sample (Kapchina-Toteva VM *et al.* 2005). Penggunaan BAP sudah sering diaplikasikan pada mikropropagasi tanaman (Piatczak dan Wysokinska 2003; Holobic dan Blinda 2005; Janatranam dan Sumathi 2010; Pant *et al.* 2010; Baluprakash *et al.* 2011; Behera dan Raina 2012; Tao *et al.* 2012; Nalini dan Velayutham 2013).

Penggunaan air kelapa dalam kegiatan mikropropagasi sudah banyak dilakukan pada beberapa penelitian. Penggunaan air kelapa digunakan sebagai pengganti ZPT sintetis yang dijual di pasaran. Hal ini karena air kelapa merupakan endosperma cair yang banyak mengandung ZPT yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tanaman seperti auksin, sitokinin, dan giberelin, dengan konsentrasi kandungan yang berbeda untuk tiap tingkatan kemasakan buah kelapa. Air kelapa juga mengandung gula (sumber karbohidrat) dan gula alkohol yang dapat memperbaiki pertumbuhan secara *in vitro* (Wattimena 1991).

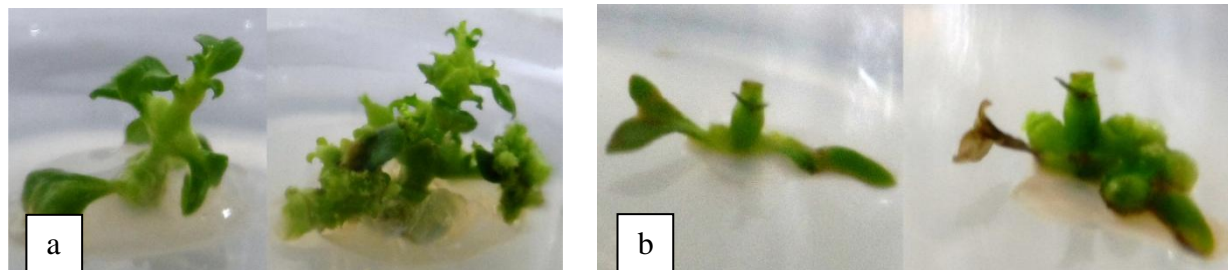
Tabel 2 Pengaruh komposisi media tumbuh jumlah tunas, panjang tunas, jumlah daun dan warna daun pada mikropropagasi tembesu.

Perlakuan	Jumlah tunas**	Panjang tunas*	Jumlah daun*	Warna daun**
MS0	1.333 ± 0.882 ^b	4.4167 ± 0.984 ^a	4.333 ± 1.453 ^{ab}	1.0833 ± 0.1443 ^a
MSmod	0.389 ± 0.096 ^b	3.0533 ± 0.632 ^{ab}	1.944 ± 0.585 ^{bc}	0.7778 ± 0.1925 ^a
MS+CW	0 ^b	0 ^c	0 ^c	0 ^c
MS+BAP	8.667 ± 4.333 ^a	1.9033 ± 0.532 ^{bc}	2.889 ± 2.694 ^{bc}	0.7778 ± 0.1925 ^a
MSmod+BAP	11.861 ± 3.350 ^a	2.3067 ± 0.833 ^{ab}	6.778 ± 2.546 ^a	0.6667 ± 0.3333 ^{ab}
MS+CW+BAP	2.667 ± 2.517 ^b	2.778 ± 2.546 ^{ab}	2.889 ± 2.524 ^{bc}	0.3333 ± 0.3333 ^{bc}

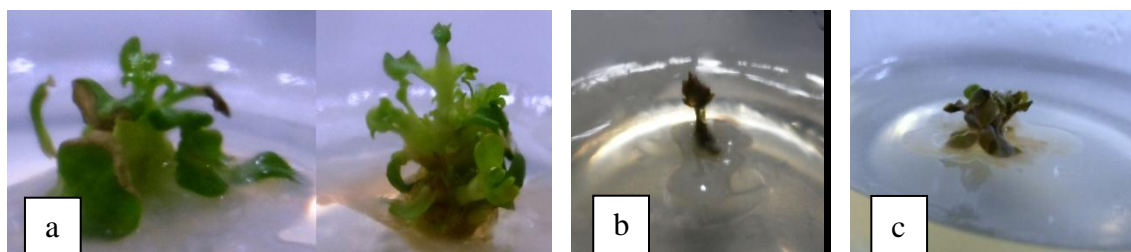
Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan p -value < α (0.05); * : Berpengaruh nyata pada taraf (α) 0.05 (p -value < α); ** : Berpengaruh sangat nyata pada taraf (α) 0.01 (p -value < α).

Penggunaan air kelapa dan BAP dapat menggantikan penggunaan zeatin pada media kultur Olive (*Olea europae* L.). Multiplikasi tunas tertinggi terdapat pada media kultur dengan tambahan zeatin 9.12 μ M dan BAP 8.87 μ M yang ditambahkan dengan 50 mg/L (Piexe *et al.* 2007). Air kelapa saja tidak cukup

untuk menghasilkan proliferasi tunas yang memuaskan, namun dalam beberapa kasus juga dapat meningkatkan jumlah tunas per eksplan. Kombinasi air kelapa dengan ZPT dapat meningkatkan dua kali lipat hasil multiplikasi daripada media dengan air kelapa saja (Piexe *et al.* 2007; Sandoval *et al.* 2014).



Gambar 2 Pertumbuhan tunas yang terdapat pada daun pada awal dan akhir pengamatan; a. perlakuan MSmod+BAP, b. Perlakuan MS+BAP.



Gambar 3 Pertumbuhan eksplan pada perlakuan MS+CW15%; a. pertumbuhan tunas pada perlakuan dengan tambahan ZPT, b. dan c. pencokelatan pada perlakuan tanpa ZPT.

Pada perlakuan media dengan tambahan air kelapa terjadi kematian eksplan yang disebabkan oleh bakteri. Pada eksplan tembesu, untuk semua perlakuan, terdapat bakteri yang tumbuh pada media. Bakteri ini tidak menyebabkan kematian pada seluruh eksplan, kalau pun terjadi kematian eksplan, kematian hanya terjadi dengan persentase yang kecil. Perbedaan terjadi pada media yang ditambahkan dengan air kelapa 15%. Pertumbuhan bakteri pada perlakuan ini dapat membuat eksplan mati (Gambar 3b dan 3c). Eksplan awalnya resisten dengan adanya bakteri ini, namun pada akhirnya eksplan mengalami pencokelatan dan kemudian mati. Jumlah kematian eksplan sangat banyak terjadi pada perlakuan media dengan tambahan air kelapa. Kematian yang terjadi pada perlakuan ini mencapai 100%, terutama pada perlakuan tanpa tambahan ZPT.

Perlu adanya perlakuan tambahan pada media dengan tambahan air kelapa. Dari hasil multiplikasi tunas pada media dengan tambahan air kelapa menunjukkan pertumbuhan tunas yang memuaskan (Gambar 3a), namun terjadi banyak kematian eksplan yang disebabkan oleh adanya bakteri yang tumbuh secara cepat pada media. Perlu adanya modifikasi perlakuan pada media supaya pertumbuhan eksplan dapat tetap baik dan keberadaan bakteri tidak sampai mematikan eksplan. Potensi air kelapa sangat baik pada penelitian ini sehingga sangat diperlukan kombinasi yang tepat dalam mengkomposisikan media ini.

SIMPULAN DAN SARAN

Sterilisasi eksplan untuk mendapatkan eksplan aseptik dibutuhkan kegiatan karantina semai sebelum disterilisasi untuk mendapatkan eksplan yang sehat. Eksplan tembesu aseptik dapat dihasilkan dengan perendaman NaOCl 10% (v/v) selama 20 menit dengan persentase keberhasilan 33.33%.

Media MS modifikasi dengan tambahan BAP 1.5 ppm mampu menginduksi tunas adventif dan aksiler untuk menghasilkan jumlah tunas tertinggi dari pada perlakuan lainnya.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didukung oleh *Rumpin Seed Source and Nursery Center, Ministry of Forestry, Bogor*.

DAFTAR PUSTAKA

- Amiri S, Ashtari S, Abdullah HB, Nazari SA, Khodadadi E, Khodadadi E, Sabzi M. Control contamination during micropropagation process of rootstock Mariana (*Prunus mariana*). *Annals of Biological Research* 4(3):149-151.
- Ali YH. 2009. Tissue culture in Sudan forest *in vitro* germination and micro-propagation of *Acacia tortilis* subsp. *Spirocarpa*, a multipurpose forest tree. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 7(1):3-10.

- Anshari GZ. 2006. *Dampak Pengelolaan Kolaboratif Menyelamatkan Taman Nasional Danau Sentarum*. Bogor (ID): CIFOR.
- Asmaliyah, Imanullah A, Dawiati W. 2012. Identifikasi dan potensi kerusakan rayap pada tanaman tembesu (*Fagaea fragrans*) di kebun percobaan Way Hanakau, Lampung Utara. *Jurnal Penelitian Hutan Tanaman* 9(4):187-194.
- Badoni A, Chauhan JS. 2010. In vitro sterilization protocol for micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. "Kufri Himalini". *Acedemia Arena* 2(4): 24-28.
- Baluprakash T, Arumugasamy K, Paulsamy S, Udhayasankar MR, Danya U. 2011. In vitro regeneration of *Exacum wightianum* Arn. (Gentianaceae)- an endemic medical plant from the Nilgiris, Weatern Ghats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01(10):167-171.
- Behera MC, Raina R. 2012. *Gentiana kurro* Royle – a critically endangered bitter herb. *Int J Arom Plants* 2 (1):22-29.
- Bhojwani SS, Razdan MK. 1996. *Plant Tissue Culture Theory and Practice, a Revised Edition*. Amsterdam (NED): Elsevier.
- Chaturvedi R, Razdan MK, Bhojwana SS. 2004. In vitro clonal propagation of an adult tree of neem (*Azhadirachta indica* A. Juss.) by forced axillary branching. *Plant Science* 166:501-506.
- Colgecen H, Koca U, Toker G. 2011. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turk J Biol.* 35:513-520.
- Dodds JH, Robert LW. 1985. *Experiment in Plant Tissue Culture*. 2nd editon. New York (US): Cambridge University Press.
- Dumani A, Yoldas O, Isci AS, Kuksal F, Kayar B, Polam E. 2007. Disinfection of artificially contaminated Redilon cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite at different time exposures. *J Tripleo*. 103(3):82-85.
- Goerge EF, Hall MA, de Klerk GJ. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd edition. Dordrecht (NED): Springer.
- Goswami NK, Handique PJ. In vitro sterilization protocol for micropropagation of Musa (AAA group) 'Amritsagar' Musa (AAB group) 'Malbhog' and Musa (AAB group) 'Chenichampa' Banana. *Indian Journal of Applied Research* 3(6):51-54.
- Holobic I, Blinda R. 2006. In vitro culture introduction for *ex situ* conservation of some rare plant species. *Rom J Biol - Plant Biol.* 51:13-23.
- Janatranam B, Sumathi E. 2010. In vitro plant Regeneration from Shoot tip Explants of *Exacum travancoricum* Beedi. *Plant Tissue Cult & Biotech.* 29(2):113-118
- Kapchina-Toteva VM, Lakimova ET, Chavdarov IP. 2005. Effect of cytokinins on *in vitro* cultured *Exacum affine* Balf. Di dalam: Guev B, Niklova M, Donev A, editor. *Balkan Scientific Conferene of Biology*; 2005 May 19-21, Plovdiv, Bulgaria. Plovdiv (BG): University of Plovdiv. hlm 714-722.
- Khan SA, Rashid H, Chaudhary MF, Chaudhary Z. 2007. Optimization of explant sterilization condition in sugarcane cultivars. *Pakistan J Agric Res.* 20(3-4):119-123.
- Lee SK, Rao AN. 1986. In vitro regeneration of planlet in *Fagaea fragrans* Roxb – a tropical tree. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 7:43-51.
- Marschner Petra. 2012. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3rd edition. London (UK): Elsevier Science.
- Martawijaya A, Kartasujana I, Mandang YI, Prawira SA, Kadir K. 1992. *Atlas Kayu Indoneisa Jilid II*. Bogor (ID): Balitbang Kehutanan.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nalini P, Velayutham P. 2013. In vitro mass propagation of *Enistemma littor* Blume from shoot tip explants. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 3(5):72-79.
- Olowe O, Adesoye A, Ojoba O, Amusa O, Liamngee S. 2014. Effect of sterilization and phytohormones on shoot tip culture of *Telfairia occidentalis*. *Journal of Natural Science Research* 4(2):53-58.
- Onwubiko NC, Nkogho CS, Anyanwu CP, Onyeishi GC. 2013. Effect of different concentration of sterilant and exposure time on sweet potato (*Ipomea batatas* Lam) esplants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2(8):14-20.
- Oyebanji OB, Nweke O, Odebunmi O, Galadima NB, Idris MS, Nnodi UN, Afolabi AS, Oghadu GH. Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rica, and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology* 8(20):5395-5399.
- Pant M, Bisht P, Gusain MP. 2010. In vitro propagation through axillary bud culture of *Swertia chirata* Buch.-Ham ex Wall: an endangered medicinal herb. *IJIB* 10(1):48-53.
- Peiris SE, de Silva EDUD, Edussuriya M, Attanayake AMURK, Peiris BCN. 2012. CSUP thechnique: a low cost sterilization method using natrium hipoklorit to replace the use of expensive equipment in micropropagation. *J Natn Sci Foundation Sri Lanka* 40(1):49-54.
- Piatczak E, Wysokinska H. 2003. In vitro regeneration of *Centaurium erythraea* Rafn from shoot tips and othe seddling explant. *Acta Societa Botanicorum Poloniae* 72(4):283-288.

- Putra CAS, Manuri S, Heriyanto, Sibagariang C. 2011. *Pohon-Pohon Hutan Alam Rawa Gambut Merang*. Palembang (ID): MRPP-GIZ.
- Rosalia N. 2008. Penyebaran dan karakteristik tempat tumbuh pohon tembesu [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Sofyan A, Muslimin I. 2007. Pengaruh asal bahan dan media stek terhadap pertumbuhan stek batang Tembesu (*Fagraea fragrans* Roxb). *Ekspose Hasil-hasil Penelitian*, 2007 Sept 20, Padang, Indonesia. Bogor (ID): Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan dan Konservasi Alam. hlm 201-206.
- Srivastava LM. 2002. *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. California (US): Elsevier Science.
- Sulistiani E, Yani SA. 2012. *Produksi Bibit Tanaman dengan Menggunakan Teknik Kultur Jaringan*. Bogor (ID): Seameo-Biotrop.
- Taiz L, Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*. Edisi ke-3. Sunderland (ENG): Sinauer Associates, Inc.
- Tao H, Jing X, Lina Y, Haitao W. 2012. An efficient method for plant regeneration from calli of *Swertia musotii*, an endangered medicinal herb. *American Journal of Plant Sciences* 3:904-908.
- Wattimena GA. 1998. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor (ID): IPB Press.