

REGENERASI IN VITRO *Eucalyptus pellita* F. Muell MENGGUNAKAN KULTUR MATA TUNAS

(*In Vitro* Regeneration of *Eucalyptus pellita* F. Muell by Mutiple-Node Culture)

Toni Herawan dan/and Budi Leksono

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan T. Pelajar km 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman 55582, Yogyakarta, Indonesia
Telp: +62-0270-896080, 895954; Fax. +62-0270-896080
e-mail: t_herawan64@yahoo.com

Naskah masuk: 30 April 2018; Naskah direvisi: 5 Juni 2018; Naskah diterima: 20 Juli 2018

ABSTRACT

Plantation of *Eucalyptus pellita* F. Muell in the Industrial Plantation Forest (HTI) program have applied a clonal forestry system to improve productivity of mean annual increament and homogenous plants on each rotation. However, the productivity has been low and not meet the need of raw materials for pulp industry. The objectives of the research is to develop of *E. pellita* in vitro by multiple node culture to increase shoots growth at each step in vitro propagation. Combination of in vitro and macro propagation in establishing hedge orchard (mini cutting) is the best technique and efficient to propagate and optimize of the growth of the species. The method to increase the successful of *E. pellita* in vitro at the induction step was using mutiple-node culture and application of rotary shaker. Four treatments were applied at multiplication, rooting and acclimatization steps to obtain the best combination of media for *E. pellita* in the optimum condition. The results showed that application of rotary shaker increased the shoots growth at the induction step and accelerated the shoots growth at the multiplication step. The procedure applied in this study was also resulting an optimal and efficient response of shoots and roots growth in each step (induction, multiplication, rooting) of *E. pellita* in vitro until acclimatization in the greenhouse.

Keywords : best clone, *Eucalyptus pellita*, in vitro, mutiple-node culture, rotary shaker

ABSTRAK

Pengembangan tanaman *Eucalyptus pellita* dalam program hutan tanaman industri (HTI) telah menggunakan pertanaman klon untuk menghasilkan riap volume tanaman yang tinggi dan homogen pada setiap rotasi. Namun demikian, produktivitasnya masih rendah dan belum dapat memenuhi kebutuhan bahan baku industri pulp. Tujuan penelitian adalah mengembangkan *in vitro E. pellita* menggunakan metode kultur mata tunas untuk meningkatkan pertumbuhan tunas pada setiap tahapan *in vitro*. Kombinasi teknik pembiakan *in vitro* dan makro untuk membangun kebun pangkas (*mini cutting*) merupakan teknik yang tepat dan efisien untuk *E. pellita* guna memberikan pertumbuhan yang maksimal. Untuk meningkatkan keberhasilan *in vitro E. pellita*, metode yang diterapkan adalah dengan menggunakan bagian mata tunas dan penerapan teknik *rotary shaker* pada tahap induksi. Empat perlakuan media diterapkan pada tahap perbanyakan tunas (multiplikasi), perakaran dan aklimatisasi, untuk mendapatkan kombinasi media terbaik dengan kondisi lingkungan yang optimal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aplikasi teknik *rotary shaker* dapat meningkatkan pertumbuhan tunas pada tahap induksi dan memacu pertumbuhan tunas pada tahap multiplikasi. Prosedur yang diterapkan dalam penelitian ini menghasilkan respon yang optimal dan efisien terhadap pertumbuhan tunas dan akar pada setiap tahapan (induksi, multiplikasi, perakaran) *in vitro E. pellita* hingga aklimatisasi di rumah kaca.

Kata kunci : *Eucalyptus pellita*, in vitro, klon unggul, kultur mata tunas, rotary shaker

I. PENDAHULUAN

Eucalyptus pellita F. Muell pada awal pengembangan HTI di Indonesia (1990-an), khususnya untuk bahan baku industri pulp dan kertas, merupakan jenis prioritas kedua setelah *Acacia mangium* Willd. Dalam perkembangannya *A. mangium* pada rotasi penanaman kedua dan ketiga mengalami serangan hama dan penyakit di beberapa wilayah HTI sehingga *E. pellita* beralih menjadi jenis utama karena lebih tahan terhadap serangan hama dan penyakit (Leksono, Kurinobu, & Ide, 2011). Untuk memenuhi kebutuhan benih unggul, program pemuliaan untuk jenis *E. pellita* sudah berkembang dan strategi pemuliaan untuk jenis tersebut pada generasi pertama dan kedua juga telah dipublikasikan untuk menghasilkan peningkatan genetik yang tinggi dengan penerapan metode seleksi berulang (Leksono, 2016; Leksono, Kurinobu, & Ide, 2008; Leksono *et al.*, 2011).

Pada program pemuliaan *E. pellita* tingkat lanjut diperlukan pengembangan klon unggul untuk menghasilkan peningkatan genetik yang lebih tinggi dan lebih homogen dengan menerapkan pembiakan vegetatif secara makro maupun secara mikro (*in vitro propagation*). Hal ini dikarenakan *E. pellita* mudah untuk dipropagasi, kemampuan trubusan dan perakaran tinggi serta tingkat keberhasilan aklimatisasi yang tinggi sebagaimana program

pemuliaan pada jenis-jenis *Eucalyptus* yang lain (Leksono *et al.*, 2011; Trueman, Hung, & Wendling, 2018). Namun karena jenis *E. pellita* bila menggunakan pangkasan dari vegetatif makro jaringan meristemnya cepat menua, sehingga teknik pembiakan *in vitro* lebih tepat untuk menyediakan materi indukan dalam membangun kebun pangkas guna menyediakan stek pucuk tanaman agar lebih efisien dan memberikan pertumbuhan yang maksimal (Chinnaraj & Malimuthu, 2011).

Metode yang selama ini dikembangkan pada teknik *in vitro* pada umumnya menggunakan tunas aksiler dari bagian pucuk (*shoot culture* atau *shoot-tip culture*) (Siril & Joseph, 2013). Metode lain yang dapat diterapkan untuk meningkatkan keberhasilan *in vitro E. pellita*, salah satunya adalah dengan menggunakan bagian mata tunas, baik dengan satu mata tunas (*single-node culture*) atau lebih dari satu mata tunas (*multiple-node culture*) (Mantovani, Grando, Xavier, & Otoni, 2013). Teknik tersebut didasarkan pada prinsip perangsangan terbentuknya tunas-tunas samping dengan cara mematahkan dominasi apikal dari meristem apikal (Mantovani *et al.*, 2013). Alasan penggunaan mata tunas dan teknik *rotary shaker* dalam penelitian ini karena bagian ini termasuk bagian yang juvenil dan bagian jaringan dimana sel-selnya masih aktif membelah sehingga diharapkan eksplan lebih mudah diinduksi (Maharana,

Mahato, Behera, Mishra, & Panigrahi, 2012). Tujuan penelitian ini adalah pengembangan *in vitro* *E. pellita* menggunakan metode kultur mata tunas untuk meningkatkan pertumbuhan tunas pada setiap tahapan *in vitro*. Dan untuk meningkatkan keberhasilan pertumbuhan tunas majemuk pada tahap multiplikasi, pada penelitian ini selain menggunakan teknis di atas juga diikuti dengan penerapan teknik *rotary shaker* (Malik, Warchoł, & Pawłowska, 2018) pada kondisi lingkungan dengan intensitas cahaya 170 lux, suhu 25° C dan kelembaban 60 persen–70 persen.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan dan Alat

Penelitian perbanyak klon *E. pellita* secara *in-vitro* menggunakan eksplan mata tunas, dilaksanakan di laboratorium kultur jaringan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPPBPTH) di Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta. Penelitian dilakukan selama sembilan bulan, dari bulan Maret hingga bulan Desember 2014. Bahan penelitian yang digunakan adalah mata tunas yang diambil dari trubusan hasil rendaman cabang *E. pellita* yang berasal dari satu pohon plus umur 7 tahun pada Kebun Benih Semai (KBS) generasi kedua (F-2) *E. pellita* di Wonogiri, Jawa Tengah.

1. Bahan tanaman

Bahan penelitian yang digunakan adalah mata tunas dari trubusan hasil rendaman cabang *E. pellita* yang berasal dari pohon plus umur 7 tahun pada Kebun Benih Semai (KBS) generasi kedua (F-2) *E. pellita* di Wonogiri, Jawa Tengah. Mata tunas diperoleh dari tunas-tunas yang tumbuh hasil rendaman cabang, dipilih tunas yang paling tua dan panjang maksimal, selanjutnya dipotong sampai pangkal cabang. Selama proses sterilisasi untuk mendapatkan mata tunas caranya tunas dipotong bagian pucuknya.

2. Media

a. *In vitro*

Tahap induksi menggunakan media terbaik yang banyak diaplikasikan pada teknik *in vitro* *E. pellita*, yaitu media dasar MS (Murashige & Skoog, 1962) + BAP 3 mg.L⁻¹ + NAA 0,01 mg.L⁻¹ + gula 30 g.L⁻¹ + agar 7 g.L⁻¹. Tahap multiplikasi menggunakan media dasar MS, BAP (*Benzyl Amino Purine*), NAA (*Naphtalene Acetic Acid*), gula dan kombinasi gibberelin dengan air kelapa muda yang akan menjadi perlakuan penelitian. Tahap perakaran menggunakan IBA (*Indole Butyric Acid*) dan NAA, gula, agar dan 4 macam media, yaitu: ½ MS, ½ GD (Gresshoff & Doy, 1972; ½ W (George, 2008), ½ WPM (*Woody Plant Medium*) sebagai perlakuan.

b. Aklimatisasi

Tahap aklimatisasi, media yang digunakan adalah *top soil* + pasir + *cocopeat* + kompos

dengan 4 macam perlakuan media dan diaklimatisasi dalam kontainer plastik.

3. Peralatan laboratorium

Peralatan yang digunakan di laboratorium adalah: *Laminar air flow*, *analitical balance*, *oven*, *magnetic stirrer*, pH meter, *autoclave*, *rotary shaker*, *microscope*, *pinset*, dan *scalpel*.

B. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan dengan urutan sebagai berikut:

1. Tahap sterilisasi materi kultur

Sterilisasi di luar laminar: eksplan direndam larutan fungisida *mankozeb* dan dibilas dengan air bersih, kemudian direndam larutan deterjen dan dibilas menggunakan aquades, masing-masing selama 15 menit. Sterilisasi di dalam laminar: direndam larutan alkohol 70 persen selama 1 menit, dibilas menggunakan aquades steril 3 kali. Eksplan direndam larutan pemutih yang mengandung 1 persen NaClO (*sodium hypochlorite*) selama 2 menit. Tahap terakhir, eksplan dibilas menggunakan aquades steril 3 – 5 kali.

2. Tahap kultur *in vitro*

a. Tahap induksi, eksplan dipotong dengan proses *blotting* dan ditanam dalam botol berisi media MS padat + BAP 3 mg.L⁻¹ + NAA 0,01 mg.L⁻¹ + gula pasir 30 g.L⁻¹ + agar 7 g.L⁻¹. Inkubasi di ruang kultur pada suhu 24°C–26°C, kelembapan 60 persen –70 persen dengan penyinaran lampu TL 40 watt secara terus-menerus dengan

intensitas cahaya 1.000 lux – 2.000 lux (16 jam kondisi terang dan 8 jam kondisi gelap). Propagul yang tumbuh dipindahkan ke media cair + BAP 3 mg.L⁻¹ + NAA 0,01 mg.L⁻¹ + gula pasir 30 g.L⁻¹ wadah tabung reaksi dan diputar menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 12 rpm selama 2 minggu. Tahap multiplikasi, media sama seperti pada tahap induksi, propagul hasil sub-kultur pada tahap induksi diinkubasi pada kondisi gelap (0 lux) dan terang, dengan suhu dan kelembapan yang sama selama 2 minggu. Propagul selanjutnya dipindah pada kondisi terang sebagaimana pada tahap induksi.

- b. Tahap perakaran dilakukan pada kondisi lingkungan yang sama dengan tahap sebelumnya. Pengamatan dilakukan setelah diinkubasi selama 1 bulan.
- c. Tahap aklimatisasi dilakukan di rumah kaca, plantlet yang sudah ditanam diinkubasi dalam kontainer plastik. Pengamatan dilakukan pada umur 1 bulan.

C. Rancangan Percobaan

Tahap multiplikasi pada *Eucalyptus pellita* (Sha Y., J. Wu, L. Ouyang, Z. Huang, F. Zeng, & Z. Li, 2013) menggunakan media MS dengan penambahan BAP 0,8 mg.L⁻¹ dan NAA 0,1 mg.L⁻¹, berdasarkan acuan tersebut di atas dilakukan modifikasi terhadap komposisi media di bawah ini. Penelitian pada tahap multiplikasi menggunakan 4 perlakuan

sebagai berikut: EP3.1 = MS+BAP 3 mg.L⁻¹ + NAA 0,01 mg.L⁻¹ + GA₄ 0,1 mg.L⁻¹ + Air kelapa 150 ml ; EP3.2 = MS+BAP 3 mg.L⁻¹ + NAA 0,01 mg.L⁻¹ + GA₄ 0 mg.L⁻¹ + Air kelapa 150 ml; EP3.3 = MS+BAP 3 mg.L⁻¹ + NAA 0,01 mg.L⁻¹ + GA₄ 0,1 mg.L⁻¹; EP3.4 = MS+BAP 3 mg.L⁻¹ + NAA 0,01 mg.L⁻¹ + GA₄ 0 mg.L⁻¹. Masing-masing media multiplikasi terdiri dari 5 ulangan sebagai unit penelitian.

Tahap perakaran pada *Eucalyptus pellita* (Sha *et al.*, 2013) menggunakan media ½MS dengan penambahan IBA 0,5 mg.L⁻¹ dan NAA 0,5 mg.L⁻¹, berdasarkan acuan tersebut di atas dilakukan modifikasi terhadap komposisi media di bawah ini. Penelitian pada tahap perakaran menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 1 faktor yaitu media perakaran dengan 4 perlakuan. Pada masing-masing media ditambahkan 1 mg.L⁻¹ IBA + 0,01 mg.L⁻¹ NAA + 20 g.L⁻¹ gula pasir dan 7 g.L⁻¹ Agar, sehingga kombinasi perlakuan yang diterapkan adalah sebagai berikut: M1 = ½ MS + 1 mg.L⁻¹ IBA + 0,01 mg.L⁻¹ NAA + 20 g.L⁻¹ sukrosa dan 7 g.L⁻¹ agar; M2 = ½ GD + 1 mg.L⁻¹ IBA + 0,01 mg.L⁻¹ NAA + 20 g.L⁻¹ sukrosa dan 7 g.L⁻¹ agar; M3 = ½ White + 1 mg.L⁻¹ IBA + 0,01 mg.L⁻¹ NAA + 20 g.L⁻¹ sukrosa dan 7 g.L⁻¹ agar; M4 = ½ WPM + 1 mg.L⁻¹ IBA + 0,01 mg.L⁻¹ NAA + 20 g.L⁻¹ sukrosa dan 7 g.L⁻¹ agar. Masing-masing perlakuan yang diterapkan terdiri dari 15 ulangan.

Kegiatan pada tahap aklimatisasi dilaksanakan di rumah kaca. Pada penelitian sebelumnya, digunakan kombinasi media aklimatisasi dengan perbandingan volume *top soil*, pupuk organik= 2:2:1 (Herawan, Na'iem, Indrioko, & Indrianto, 2015). Berdasarkan data tersebut di atas dilakukan modifikasi terhadap media aklimatisasi pada *E. pellita*. Penelitian pada tahap aklimatisasi menggunakan 4 perlakuan sebagai berikut: Media 1 = *top soil* + pasir + *cocopeat* + kompos (1:1:1:1); Media 2 = *top soil* + pasir + *cocopeat* + kompos (1:1:1:2); Media 3 = *top soil* + pasir + *cocopeat* + kompos (1:1:1:3); Media 4 = *top soil* + pasir + *cocopeat* (kontrol) (1:1:1). Masing-masing media terdiri dari 15 ulangan.

D. Analisis Data

Pengamatan pada tahap multiplikasi dan perakaran dilakukan dengan mengukur jumlah dan panjang tunas akar. Data pengamatan pada tahap multiplikasi dianalisis menggunakan Selang Kepercayaan/*Confidence Interval* (CI) (McDonald, 2014) yaitu dengan menghitung rerata pertumbuhan dan standar deviasi dari rata-rata unit penelitian, dengan rumus:

$$CI = \bar{X} \pm t (S\bar{x}) \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan:

CI = Selang kepercayaan

\bar{X} = nilai rata-rata

t = jumlah sampel

$S\bar{x}$ = standar eror

Pada tahap perakaran dan aklimatisasi, data diolah menggunakan analisis varian. untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan

yang diuji. Apabila terdapat perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji beda nyata Duncan (*Duncan Multiple Range Test*) menggunakan model linier:

$$Y_{ij} = \mu + M_i + \epsilon_{ij} \dots \dots \dots (2)$$

Keterangan:

- Y_{ij} = variabel yang diukur
- μ = rata-rata umum
- M_i = pengaruh perlakuan media ke-i
- ϵ_{ij} = random error pada media ke-i dan ulangan ke-j

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Tahap induksi

Penelitian ini menggunakan satu pohon induk, hal ini disebabkan data *sprouting ability*

yang diperoleh hanya dari satu pohon tersebut. Eksplan berupa mata tunas diperoleh dari perendaman cabang *E. pellita* selama 4 minggu yang menghasilkan tunas juvenil sebagai jaringan yang sel-selnya masih aktif membelah sehingga lebih mudah diinduksi. Pengamatan pada tahap awal induksi *E. pellita* dengan penerapan teknik *rotary shaker*, menunjukkan tingkat keberhasilan mencapai 60 persen sehingga dapat digunakan sebagai sumber eksplan. untuk tahap multiplikasi (Gambar 1).



(a)



(b)

Gambar (Figure) 1. Induksi dengan media MS + 3 mg.L⁻¹ BAP + 0,01 mg.L⁻¹ NAA (a) induksi menggunakan media MS padat (b) induksi menggunakan media MS cair (*Shoot induction on MS medium + 3 mg.L⁻¹ BAP + 0,01 mg.L⁻¹ NAA (a) induction by MS Solid medium (b) induction by MS liquid medium*)

2. Multiplikasi

Hasil pengamatan pada tahap multiplikasi (Tabel 1) menunjukkan bahwa prosedur *in vitro* yang diterapkan pada tahap ini (kombinasi terang dan gelap pada kondisi lingkungan ruang kultur), memberikan hasil yang tinggi. Jumlah tunas tertinggi

(67,51±10,76) ditunjukkan oleh media EP3.4 (MS+BAP 3 mg.L⁻¹ + NAA 0,01 mg.L⁻¹) pada kisaran intensitas cahaya 1.000 lux—2.000 lux. Sekuensial pada tahap multiplikasi *E. pellita* menggunakan media MS dapat dilihat Gambar 2.

Tabel (Table) 1. Respon media pada tahap multiplikasi terhadap pembentukan tunas *E. pellita* setelah diinkubasi selama 1 bulan (*Response of medium on multiplication step to produce E. pellita shoots after 1 month incubation*)

| Kondisi ruang invitro (<i>Invitro space conditions</i>) | Perlakuan (<i>Treatment</i>) | Jumlah tunas (<i>Number of shoots</i>) | Panjang tunas (<i>Shoot length</i>) (cm) |
|---|--|---|--|
| Terang (<i>light</i>) (2.000 lux—3.000 lux; 22 °C —26°C; Kelembapan (<i>humidity</i>) ± 70 persen | EP3.1 | | |
| | MS+BAP 3 mg.L ⁻¹ +NAA 0,01 mg.L ⁻¹ + GA ₄ 0,1 mg.L ⁻¹ +Air kelapa 150 ml | 20±10,38 | 4±1,49 |
| | EP3.2 | | |
| | MS+BAP 3 mg.L ⁻¹ +NAA 0,01 mg.L ⁻¹ + GA ₄ 0 mg.L ⁻¹ +Air kelapa 150 ml | 0±0 | 0±0 |
| Gelap (<i>dark</i>) (0 lux; 22 °C —26°C; Kelembapan (<i>humidity</i>) ± 70 persen | EP3.3 | | |
| | MS+BAP 3 mg.L ⁻¹ +NAA 0,01 mg.L ⁻¹ + GA ₄ 0,1 mg.L ⁻¹ | 30±10,51 | 3,5±0,61 |
| | EP3.4 | | |
| | MS+BAP 3 mg.L ⁻¹ +NAA 0,01 mg.L ⁻¹ + GA ₄ 0 mg.L ⁻¹ | 67,51±10,76 | 3,13±1,02 |



Gambar (Figure) 2. Sekuensial pada tahap multiplikasi *E. pellita* menggunakan media MS (a) diinkubasi di ruang gelap (0 lux); (b) & (c) = diinkubasi pada rak tanpa lampu (170 lux); (d) diinkubasi pada rak dengan penyinaran penuh (1.000 lux—2.000 lux) (*Sequence on multiplication step of E. pellita using MS medium (a) Incubation in the plastic cabinet (0 lux); (b) & (c) incubation on shelf without lamp (170 lux); (d) incubation on shelf with lamp (1.000 lux – 2.000 lux)*)

3. Perakaran

Tujuan perakaran adalah pembentukan akar dan pembentukan plantlet mandiri dan pucuk tanaman yang cukup kuat, sehingga dapat bertahan hidup sampai saat dipindahkan dari lingkungan kultur ke lingkungan di rumah

kaca (Khalafalla, Daffalla, Abdellatef, Agabna, & El-Shemy, 2011). Hasil analisis varian pengaruh media *in vitro* terhadap pembentukan jumlah dan panjang akar disajikan pada Tabel 2.

Tabel (Table) 2. Analisis varian pengaruh media *in vitro* terhadap pembentukan jumlah dan panjang akar *E. pellita* setelah diinduksi selama 1 bulan (*Analysis of variance of in vitro medium effect to produce the number and length roots of E. pellita after 1 month induction*)

| Sumber variasi (<i>Source of variation</i>) | db | Jumlah akar (<i>Number of roots</i>) | | | Panjang akar (<i>Length of roots</i>) | | | | |
|--|----|--|---|--------------------------------|---|--|---|--------------------------------|-------------------------------|
| | | Jumlah kuadrat (<i>Sum of square</i>) | Kuadrat tengah (<i>Mean squares</i>) | F-hitung (<i>F-value</i>) | F-tabel | Jumlah kuadrat (<i>Sum of square</i>) | Kuadrat tengah (<i>Mean squares</i>) | F-hitung (<i>F-value</i>) | F-tabel (<i>F-table</i>) |
| Media (<i>Medium</i>) | 3 | 38,652 | 12,884 | 201,09** | 2,76 | 0,768 | 0,256 | 1,91 ^{ns} | 2,76 |
| Galat (<i>Error</i>) | 56 | 3,588 | 0,064 | | | 7,512 | 0,134 | | |
| Total (<i>Total</i>) | 59 | 35,064 | | | | 8,281 | | | |

Keterangan (*Remark*): ** = sangat berbeda nyata pada taraf uji 5 % (*significant difference at the 5 % level*); ns = tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (*ns = not significant at the 5% level*)

Tabel (Table) 3. Rata-rata respon media *in vitro* pada tahap multiplikasi terhadap perakaran *E. pellita* setelah diinkubasi selama 1 bulan (Mean of *in vitro* medium response on multiplication step to *E. pellita* rooting after 1 month incubation)

| Perlakuan media (Medium treatment) | Rerata respon (Response average) | | | Keterangan (Remark) |
|--|---|----------------------------------|-----------------------------------|--|
| | Persen berakar (Rooted percentage) (%) | Jumlah akar (Number of roots) | Panjang akar (Root lenght)(cm) | |
| ½ MS+1 mg.L ⁻¹ IBA + 0,01 mg.L ⁻¹ NAA+20 g.L ⁻¹ gula pasir dan 7 g.L ⁻¹ agar | 40 | 2,8 ^b | 1,91 | Kalus=53% Mati=7% |
| ½ GD + 1 mg.L ⁻¹ IBA + 0,01 mg.L ⁻¹ NAA+20 g.L ⁻¹ gula pasir dan 7 g.L ⁻¹ agar | 33 | 3 ^b | 1,90 | Kalus=40% Mati=17% |
| ½ White+1 mg.L ⁻¹ IBA+0,01 mg.L ⁻¹ NAA+20 g.L ⁻¹ gula pasir dan 7 g.L ⁻¹ agar | 6,7 | 1 ^c | 1 | Kalus=27% Tidak respon= 66,3% |
| ½ WPM+1 mg.L ⁻¹ IBA+0,01 mg.L ⁻¹ NAA+20 g.L ⁻¹ gula pasir dan 7 g.L ⁻¹ agar | 40 | 6 ^a | 1,75 | Kalus=13% Tidak respon= 40 % Mati=7% |

Hasil analisis varian (Tabel 2) menunjukkan bahwa pengaruh media terhadap pembentukan jumlah akar *E. pellita* setelah diinduksi menunjukkan perbedaan yang nyata diantara media yang digunakan, sedangkan sedangkan panjang akar tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata. Untuk mengetahui respon pertumbuhan pada fase perakaran serta mengetahui media terbaik bagi fase perakaran pada saat kultur *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 3. Persen berakar pucuk *E. pellita* pada tahap *in vitro* yang tertinggi pada media (½ MS + 1 mg.L⁻¹ IBA + 0,01 mg.L⁻¹ NAA + 20 g.L⁻¹ gula pasir + 7 g.L⁻¹ agar) dan media (½ WPM + 1 mg.L⁻¹ IBA + 0,01 mg.L⁻¹ NAA + 20 g.L⁻¹ gula pasir + 7 g.L⁻¹ agar) sebesar 40 persen, sedangkan persen berakar yang terendah pada media (½ White + 1 mg.L⁻¹ IBA+0,01 mg.L⁻¹ NAA + 20 g.L⁻¹ gula pasir + 7 g.L⁻¹ agar). Jumlah akar yang terbanyak dihasilkan pada media (½ WPM + 1 mg.L⁻¹ IBA+0,01 mg.L⁻¹ NAA + 20 g.L⁻¹ gula pasir + 7 g.L⁻¹ agar) dan berbeda nyata dengan media lainnya yang diujicobakan. Adapun *in vitro* *E.*

pellita pada tahap perakaran dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar (Figure) 3. *In vitro* *E. pellita* pada tahap perakaran (Rooting step of *E. pellita* *in vitro* culture)

4. Aklimatisasi

Hasil analisis varian pertumbuhan tinggi bibit, jumlah dan panjang akar pada tingkat aklimatisasi *E. pellita* di rumah kaca selama 1 bulan menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata diantara perlakuan media yang diterapkan pada ketiga respon yang diukur (Tabel 4). Rata-rata respon media bibit pada tahap aklimatisasi terhadap persen hidup, tinggi bibit serta jumlah dan panjang akar disajikan pada Tabel 5. Rata-rata persen hidup bibit pada empat perlakuan media yang digunakan pada tahap aklimatisasi (Tabel 5)

berkisar antara 60 persen – 90 persen. Hal ini mengindikasikan bahwa *E. pellita* termasuk spesies yang mudah dalam proses aklimatisasi

di persemaian. Teknik dan hasil aklimatisasi *E. pellita* dapat dilihat pada Gambar 4.

Tabel (Table) 4. Analisis varian pertumbuhan tinggi bibit, jumlah dan panjang akar pada aklimatisasi *E.pellita* di rumah kaca selama 1 bulan (*Analysis of variance of shoots-height growth, number and length roots on acclimatization step of E.pellita after 1 month in greenhouse*)

| Sumber variasi (Source of variation) | db | Pertumbuhan tinggi bibit (Height of seedling growth) | | | Jumlah akar (Number of roots) | | | Panjang akar (Root length) | | |
|--------------------------------------|----|--|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------|
| | | Jumlah kuadrat (Sum of square) | Kuadrat tengah (Middle square) | F Hit (F-value) | Jumlah kuadrat (Sum of square) | Kuadrat tengah (Middle square) | F hit (F-value) | Jumlah kuadrat (Sum square) | Kuadrat tengah (Middle square) | F Hit (F-value) |
| Media (Medium) | 3 | 0,8447 | 0,2816 | 0,48 ^{ns} | 12,131 | 4,043 | 1,39 ^{ns} | 0,466 | 0,155 | 0,174 ^{ns} |
| Galat (Error) | 58 | 33,9290 | 0,5850 | | 168,718 | 2,908 | | 51,668 | 0,890 | |
| Total (Total) | 61 | 34,7737 | | | 180,850 | | | 52,135 | | |

Keterangan (Remark) : ns = tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (ns = not significant at the 5% level)

Tabel (Table) 5. Rata-rata respon media *in vitro* pada tahap aklimatisasi terhadap persen hidup dan pertumbuhan tinggi bibit, jumlah dan panjang akar bibit setelah 1 bulan di rumah kaca (*Mean of in vitro medium response on acclimatization step to the seedling percentage and height growth, number and length roots after 1 month in greenhouse*)

| Media | Persen hidup (Growth percentage) (%) | Rata-rata (Average) | | |
|---------|--------------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------------|
| | | Pertumbuhan tinggi bibit (Height growth of seedling)(cm) | Jumlah akar (Number of roots) | Panjang akar (Length of roots) (cm) |
| Media-1 | 85 | 1,282 a | 3,9 a | 2,8a |
| Media-2 | 75 | 1,156 a | 3,4 a | 3,5 a |
| Media-3 | 90 | 1,025 a | 3,6 a | 3,5a |
| Media-4 | 60 | 0,987 a | 2,6 a | 1,9 a |

Keterangan (Remarks): Media-1 = top soil + pasir + cocopeat + kompos (1:1:1:1); Media-2 = top soil + pasir + cocopeat + kompos (1:1:1:2); Media-3 = top soil + pasir + cocopeat + kompos (1:1:1:3); Media-4 = top soil + pasir + cocopeat (kontrol) (1:1:1) (Medium-1 = top soil + sand + cocopeat + compost = (1:1:1:1); Medium-2 = top soil + sand + cocopeat + compost = (1:1:1:2); Medium-3 = top soil + sand + cocopeat + compost = (1:1:1:3); Medium-4 = top soil + sand + cocopeat = (1:1:1))



Gambar (Figure) 4. Hasil aklimatisasi *E. pellita* selama 1 bulan di rumah kaca (a) Penanaman pada media yang sudah disiapkan (b) Plantlet disungkup kontainer dan aklimatisasi di rumah kaca (c) Pengukuran perkembangan tinggi tunas (d) Plantlet yang jadi dan siap dipindah ke polybag di persemaian (*Acclimatization result of E. pellita after 1 month in green house* (a) planting to the media; (b) Plantlet was covered by plastic bag and acclimatization in greenhouse, (c) measurement of shoots growth,(d) plantlet ready to transfer in polybag and maintained in nursery)

B. Pembahasan

Penerapan teknik rendaman cabang dalam menyediakan eksplan pada penelitian ini lebih baik bila dibandingkan dengan pengambilan secara langsung dari pohon induk, karena dapat diperoleh tunas juvenil dari pohon dewasa dan lebih terjaga dari kontaminan sehingga kualitas eksplan yang dihasilkan selain identik, produktivitas pertumbuhannya juga lebih tinggi (Meier, Saunders, & Michler, 2012; Morisset J., F. Mothe, B. Chopard, D. Francois, F. Fontaine, & F. Colin, 2012). Pada tahap induksi, kombinasi media MS+BAP 3 mg.L⁻¹ + NAA 0,01 mg.L⁻¹+gula pasir 30 g.L⁻¹ + agar 7 g.L⁻¹ memberikan respon yang tinggi mampu meningkatkan keberhasilan dan mengoptimalkan pertumbuhan tunas pada tahap multiplikasi, hal ini disebabkan karena eksplan yang masih muda dan juvenil mengandung ZPT endogen pada bagian tunasnya sehingga dengan pemberian ZPT eksogen pada konsentrasi yang rendah sudah mampu tumbuh dan berkembang (González R., M. Delgado, Y. Gonzales, A. Gonzales, M. Geriga, P.D.S. Caligari, & K. Quiroz, 2011).

Keberhasilan ini juga didukung dengan melakukan subkultur dan penerapan teknik *rotary shaker* pada tahap induksi (Malik *et al.*, 2018). Media MS banyak digunakan dalam kultur jaringan, karena kandungan nitrat, kalium, dan amoniumnya tinggi, mengandung jumlah hara an-organik yang cukup untuk

memenuhi kebutuhan berbagai jenis sel tumbuhan dalam kultur (Murashige & Skoog, 1962; Herawan *et al.*, 2015). Penambahan sitokinin, diantaranya BAP dalam media kultur jaringan, untuk merangsang pecah dan tumbuhnya mata tunas samping serta mencegah dominasi tunas apikal yang dapat mengakibatkan terbentuknya tunas samping sedangkan golongan auksin yang digunakan pada tahap induksi ini adalah NAA, yang mampu merangsang pembelahan dan pembesaran sel yang terdapat pada pucuk tumbuhan dan menyebabkan tumbuhnya tunas-tunas baru (Putra & Shofi, 2015).

Perbedaan respon tertinggi terhadap jumlah tunas dan panjang tunas ini karena kemampuan tumbuhan beregenerasi dari jaringan yang berbeda tidak hanya bergantung pada umur fisiologi, tetapi juga karakter dan kualitas selnya serta faktor lingkungan seperti suhu, waktu penanaman, cahaya, ZPT, atau jenis media yang akan berpengaruh terhadap pertumbuhan eksplan (Máximo, Santos, Martins, Mendonça, & Paiva, 2018). Penambahan ZPT BAP lebih berperan dalam proses perbanyak tunas dibandingkan dengan mempercepat pembentukan tunas dan untuk mendapatkan jumlah tunas ganda diperlukan beberapa kali sub-kultur (Vasu, Sharma, Pal, & Hasan, 2014).

Penelitian perakaran dilakukan pada kondisi lingkungan yang ideal untuk

menumbuhkan tunas adalah pada kisaran suhu yang umum yaitu 24°C–26°C dengan kelembaban udara ruang tumbuh dijaga agar tetap 70 persen (Herawan *et al.*, 2015). Beberapa hasil penelitian terkait melaporkan bahwa media yang digunakan dalam menginduksi pembentukan akar menggunakan larutan garam-garam makro (seperti: WPM) dengan konsentrasi rendah ($\frac{1}{2}$ WPM), lebih baik dari larutan dengan konsentrasi tinggi (Shekhawat, Kannan, Manokari, & Ravindran, 2015).

Plantlet hasil in vitro harus segera dipindah ke dalam media tanah (aklimatisasi) agar dapat segera menyesuaikan dengan kondisi di luar kultur (Chandra, Bandopadhyay, Kumar, & Chandra, 2010; Herawan *et al.*, 2015), agar sistem pertunasan dan perakaran pada kondisi yang terkontrol dapat segera dicapai. Hasil penelitian menunjukkan penggunaan berbagai media bibit tidak berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan tinggi bibit, jumlah akar dan panjang akar bibit (Tabel 5). Namun pertumbuhan bibit yang ditumbuhkan pada media 4 (campuran tanah, pasir dan cocopeat) menunjukkan pertumbuhan yang paling rendah. Hal ini kemungkinan karena tidak ada penambahan kompos, sehingga kandungan hara pada media kurang tersedia. Pertumbuhan bibit secara umum dipengaruhi oleh struktur tanah atau media serta kandungan hara media, sehingga penambahan *cocopeat* serta kompos

pada campuran media pada tahap aklimatisasi diharapkan dapat mendukung pertumbuhan plantlet hasil in vitro.

Selain itu struktur tanah yang baik menjadi salah satu faktor yang menentukan pertumbuhan akar plantlet, maka tanah dalam *polybag* diutamakan mengandung humus. Pada umumnya bibit memerlukan tanah subur dengan struktur yang baik untuk pertumbuhan dan perkembangan akar yang masih muda (Chandra *et al.*, 2010). Kualitas bibit (ukuran, formasi perakaran), perubahan kondisi lingkungan, kelembapan, dan pengabutan merupakan faktor yang sangat penting dalam ketahanan hidup plantlet pada kondisi di rumah kaca (Chandra *et al.*, 2010).

IV. KESIMPULAN

Teknik rendaman cabang terbukti menghasilkan sumber eksplan yang juvenil dan dapat menekan kontaminasi yang terjadi saat induksi. Penerapan kombinasi kondisi gelap dan terang saat inkubasi dengan suhu 22°C–26°C dan kelembaban 60 persen–70 persen memacu multiplikasi *E.pellita* dengan kombinasi media: MS+3 mg.L⁻¹BAP +0,01 mg.L⁻¹ NAA +30 g.L⁻¹ gula pasir dan 7g.L⁻¹. Kombinasi media *in vitro* pada tahap perakaran dan media aklimatisasi yang paling efisien dan optimal untuk diterapkan adalah, untuk media perakaran: $\frac{1}{2}$ WPM+1 mg.L⁻¹ IBA+0,01 mg.L⁻¹ NAA+20 g.L⁻¹ gula pasir dan 7g.L⁻¹ agar, sedangkan untuk media

aklimatisasi perbandingan volume *top soil*:
pasir: *cocopeat*: kompos sebesar 1:1:1:3.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ibu Asri Insiana Putri selaku Penanggung Jawab laboratorium kultur jaringan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPPBPTH) Yogyakarta atas dukungan yang diberikan, dan kepada saudara Rudi Hartono yang telah membantu dalam penelitian di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., & Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: From laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32(2).
<https://doi.org/10.1007/s10529-010-0290-0>
- Chinnaraj, S., & Malimuthu, C. (2011). Development of micro-propagation and mini cutting protocol for fast growing *Melia*, *Dalbergia* and *Eucalyptus* clones for pulpwood and bio-energy plantations. *BMC Proceedings*, 5(Suppl. 7), 5–7.
<https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S7-P131>
- George E.F. (2008). The Components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In *Plant Propagation by Tissue Culture* (Vol. 1, pp. 115–174).
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- George EF. (2014). Plant propagation by tissue culture. Part-1.
<https://doi.org/1080/13102818.1995.10818839>
- González, R. ., Delgado, M., González, Y., González, A., Garriga, M., Caligari, P. D. S., ... Quiroz, K. (2011). In vitro propagation of cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(3), 376–382.
<https://doi.org/10.4067/S0718-58392011000300005>
- Gresshoff, P. M., & Doy, C. H. (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon-esculentum* (tomato). *Planta*, 107(2), 161.
- Herawan, T., Na'iem, M., Indrioko, S., & Indrianto, A. (2015). Kultur jaringan cendana (*Santalum album* L.) menggunakan eksplan mata tunas. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 9, 177–188.
- Khalafalla, M. M., Daffalla, H. M., Abdellatef, E., Agabna, E., & El-Shemy, H. A. (2011). Establishment of an in vitro micropropagation protocol for *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. ex Poir. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 12(4), 303–312.
<https://doi.org/10.1631/jzus.B1000205>
- Leksono, B. (2016). Seleksi berulang pada Spesies tanaman hutan tropis untuk kemandirian benih unggul. *Orasi pengukuhan profesor riset bidang pemuliaan tanaman hutan*. Bogor: Badan Litbang dan Inovasi KLHK
- Leksono, B., Kurinobu, S., & Ide, Y. (2008). Realized genetic gains observed in second generation seedling seed orchards of *Eucalyptus pellita* in Indonesia. *Journal of Forest Research*, 13(2), 110–116.
<https://doi.org/10.1007/s10310-008-0061-0>
- Leksono, B., Kurinobu, S., & Ide, Y. (2011). A breeding strategy for the tropical *Eucalyptus*: Findings and lessons acquired from the multi-generation tree breeding of *Eucalyptus pellita* in Indonesia.
- Maharana, S., Mahato, V., Behera, M., Mishra, R., & Panigrahi, J. (2012). In vitro regeneration from node and leaf explants of *Jatropha curcas* L. and evaluation of genetic fidelity through RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 11(July), 280–287. Retrieved from <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/14567>
- Malik, M., Warchoń, M., & Pawłowska, B. (2018). Liquid culture systems affect morphological and biochemical parameters during *Rosa canina* plantlets in vitro production, 46 (May

- 2017), 58–64. <https://doi.org/10.15835/nbha46110880>
- Mantovani, N. ., Grando, M. ., Xavier, A., & Otoni, W. . (2013). In vitro shoot induction and multiplication from nodal segmen of adult *Ginkgo biloba* plants. *Horticultura Brasileira*, 31(2), 1–47. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2004.00461.x>
- Máximo, W. P. ., Santos, P. A. A., Martins, G. S., Mendonça, E. G., & Paiva, L. V. (2018). In vitro multiplication of *Eucalyptus hybrid* via temporary immersion bioreactor: culture media and cytokinin effects, 131–138.
- McDonald, J. H. (2014). *Handbook of Biological Statistics*. Sparky House Publishing. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Meier, A. R., Saunders, M. R., & Michler, C. H. (2012). Epicormic buds in trees: A review of bud establishment, development and dormancy release. *Tree Physiology*, 32(5), 565–584. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps040>
- Morisset, J. ., Mothe, F., Chopard, B., Francois, D., Fontaine, F., & Colin, F. (2012). Does past emergence of epicormic shoots control current composition of epicormic tipes ?
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). *03_Murashige and Skoog1962.pdf*. Wisconsin.
- Putra, R. R., & Shofi, M. (2015). Pengaruh hormon naphthalen acetic acid terhadap inisiasi akar tanaman kangkung air (*Ipomoea aquatica* Forssk .) Influence of naphthalen acetic acid for root initiation of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk .). *Wiyata*, (December), 108–113.
- Sha, Y. ., Wu, J. ., Ouyang, L. ., Huang, Z. ., Zeng, F. ., & Li, Z. . (2013). Tissue culture and regeneration of *Eucalyptus pellita*., 1511–1516.
- Shekhawat, M. S., Kannan, N., Manokari, M., & Ravindran, C. P. (2015). In vitro regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.08.002>
- Siril, E. A., & Joseph, N. (2013). Micropropagation of annatto (*Bixa orellana* L.) from mature tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants with RAPD markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(1), 147–155. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0150-6>
- Trueman, S. J., Hung, C. D., & Wendling, I. (2018). Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. *Forests*, 9(2), 1–42. <https://doi.org/10.3390/f9020084>
- Vasu, D., Sharma, A., Pal, S., & Hasan, Z. (2014). Micropropagation of karanj (*Pongamia pinnata* pierre) through shoot apex Segments- a medicinal and biofuel plant. *Biological Forum*, 6(1), 144–147.