

PEMILIHAN TEKNIK STERILISASI BENIH DAN MEDIA YANG TEPAT UNTUK MIKROPROPAGASI JATI MUNA (*Tectona grandis* L.)

*(Selection of the Optimum Seed and Media Sterilization Techniques for Muna Teak
(*Tectona grandis* L.) Micropropagation)*

*Ratna Uli Damayanti Sianturi, *Yulianti Bramasto, *Naning Yuniar, *M. Zanzibar dan/and Megawati

Balai Penelitian dan Pengembangan Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan
Jl. Pakuan Ciheuleut PO Box 105; Telp. (0251) 8327768, Bogor, Jawa Barat, Indonesia
e-mail: nauliratna@gmail.com

Naskah masuk: .4 Februari 2020; Naskah direvisi: 12 Mei 2020; Naskah diterima: 28 Juli 2020

ABSTRACT

*The existence of the muna teak (*Tectona grandis* L.), is currently threatened with extinction, so a muna teak replanting program is needed. Micropropagation techniques can be one solution for the supply of high quality seedlings. The purpose of this study was to obtain the optimum sterilization technique to get the sterilize explants of muna teak and to get the suitable media for in vitro multiplication. The study was conducted in a tissue culture laboratory of the Forest Tree Seed Technology Research and Development Centre in Bogor. This study consisted of two stages and the experimental design used was a completely randomized design. The first phase of the study was the treatment of sterilization techniques consisted of soaking explants in various concentration of clorox solution and the second stage of the study was the treatment of multiplication media. The results showed that the proper sterilization technique to obtain sterilize explants of muna teak seedlings was immersed in 20% chlorox solution for 10 minutes, then immersed in 15% of chlorox for 15 minutes. The best medium for the induction stage and multiplication of Muna teak buds which are modified media plus Benzyl Amino Purine (BAP) hormone as much as 0.1 mg.l⁻¹*

Keyword: *media, micropropagation, Muna teak, sterilization, tissue culture*

ABSTRAK

Keberadaan jati muna (*Tectona grandis* L), saat ini terancam kepunahan, sehingga diperlukan program penanaman kembali jati muna. Teknik mikropropagasi dapat menjadi salah satu solusi untuk penyediaan bibitnya. Tujuan dari penelitian ini adalah diperolehnya teknik sterilisasi yang tepat untuk mendapatkan eksplan jati muna setril dan mendapatkan media yang tepat untuk perbanyak tanaman jati muna secara in vitro. Penelitian dilakukan di laboratorium kultur jaringan Balai Penelitian dan Pengembangan Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan di Bogor. Penelitian ini terdiri dari dua tahap dan rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap. Penelitian tahap pertama adalah perlakuan teknik sterilisasi yaitu terdiri dari perendaman eksplan dalam berbagai konsentrasi klorox dan penelitian tahap kedua adalah perlakuan media tanam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa teknik sterilisasi yang tepat untuk mendapatkan eksplan benih jati muna steril adalah perendaman dalam larutan klorox 20% selama 10 menit, kemudian direndam dalam klorox 15% selama 15 menit. Media terbaik untuk tahap induksi dan multiplikasi tunas jati Muna yaitu media modifikasi ditambah hormon Benzyl Amino Purine (BAP) sebanyak 0,1 mg.l⁻¹.

Kata kunci : *jati muna, kultur jaringan, media, mikropropagasi, sterilisasi*

I. PENDAHULUAN

Jati (*Tectona grandis* L.) yang berada di Pulau Muna (Sulawesi Tenggara) berasal dari Pulau Jawa. Perbedaan tempat tumbuh mengakibatkan jati di Pulau Muna mengalami perubahan genetik, dan menjadi ras lahan

sendiri sehingga berbeda dengan jati di Pulau Jawa (Widyatmoko, Rimbawanto, & Chasani, 2013). Ada beberapa kelebihan dari jati muna di antaranya adalah pertumbuhan yang stabil pada umur 5 tahun di empat lokasi penanaman dibandingkan dengan jati dari Pulau Jawa, dan

dapat tumbuh pada lahan dengan kondisi masam (pH 4,8) (Adinugraha, Pudjiono, & Mahfudz, 2013; Prasetyawati, 2014). Permasalahan yang dihadapi saat ini, keberadaan jati muna sudah terancam punah akibat pengambilan kayu jati secara besar-besaran oleh masyarakat di Pulau Muna (Topo Jers, 2016).

Upaya penanaman kembali telah dilakukan oleh masyarakat di Pulau Muna. Tingkat keberhasilan dari upaya tersebut belum optimal, karena penggunaan bibit yang kurang berkualitas. Diperlukan teknologi untuk mendapatkan bibit jati muna dengan kualitas baik dalam waktu yang cepat dan jumlah yang dihasilkan banyak. Perbanyak dengan teknik mikropropagasi adalah salah satu solusi yang bisa dilakukan. Mikropropagasi terdiri dari beberapa tahapan diantaranya, inisiasi, multiplikasi, elongasi dan aklimatisasi.

Tahap inisiasi merupakan faktor penentu untuk mendapatkan eksplan yang steril. Eksplan steril didapat melalui sterilisasi permukaan dengan cara menghilangkan kontaminan yang terdapat pada permukaan eksplan. Selama proses sterilisasi, eksplan harus tetap hidup dan hanya kontaminan yang dieliminasi (Oyebanji *et al.*, 2009).

Beberapa bahan sterilisasi permukaan yang biasa digunakan adalah *mercuric chloride* ($HgCl_2$), *natrium hipoklorit* ($NaOCl$),

kalsium hipoklorit ($CaOCl$), dan alkohol. Mercuric chloride atau merkuri biasanya digunakan untuk mendapatkan eksplan steril dari benih dan tunas jati (Kozgar & Shahzad, 2012; Antony *et al.*, 2015; Fauzan, Supriyanto, & Tajuddin, 2017; Mishra, Bhadrawale, & Yadav, 2018). Merkuri jika dibuang langsung ke tanah akan mencemari lingkungan, maka diperlukan bahan sterilan yang lebih ramah lingkungan. $NaOCl$ sudah banyak digunakan untuk keperluan sehari2 dalam rumah tangga, sehingga cukup aman bagi lingkungan. Sterilan $NaOCl$ digunakan sebagai sterilan dalam berbagai teknik sterilisasi eksplan dengan konsentrasi dan lama perendaman yang berbeda (Peiris, de Silva, Edussuriya, Attanayake, & Peiris, 2012; Goswami & Handique , 2013; Olowe *et al.*, 2014).

Tahap berikutnya adalah multiplikasi, tahap ini dimaksudkan untuk memperbanyak eksplan yang telah steril. Permasalahan pada tahap multiplikasi adalah komposisi media dan jenis hormon yang digunakan. Media kulturjaringan yang biasa digunakan adalah media Murashige dan Skoog (MS). Keistimewaan medium MS diantaranya memiliki kandungan nitrat, kalium dan ammoniumnya yang tinggi, dan jumlah hara anorganiknya yang layak untuk memenuhi kebutuhan banyak sel tanaman dalam kultur (Nursetiadi, 2008). Peranan hormon pada tahap multiplikasi dimaksudkan untuk

mengandakan eksplan yang ada, dari 1 eksplan menjadi 2 atau lebih. Sitokonin, contohnya BAP (*Benzyl Amino Purine*) dengan konsentrasi tertentu, memacu pembelahan sel dalam metabolisme tanaman untuk pembentukan tunas (Pratiwi, Siregar & Nuriadi, 2015; Ashraf, Bilal & Iqbal, 2014; Harahap, Siregar & Husni, 2015).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan teknik sterilisasi yang tepat menggunakan NaOCl dan mendapatkan media yang tepat untuk perbanyak tanaman jati muna secara in vitro.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan Penelitian

Penelitian dilakukan selama tujuh bulan, yaitu Mei sampai dengan Desember 2018. Lokasi pengunduhan buah jati muna adalah di Lambiku, Kabupaten Muna, Sulawesi Tenggara. Pengujian mikropropagasi dilaksanakan di Laboratorium Kultur jaringan, Balai Penelitian dan Pengembangan Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan, Bogor.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih jati muna yg diunduh pada tahun 2018, fungisida (bahan aktif propineb 70%), bakterisida (bahan aktif *streptomycin sulphate* 6,41%), media Murashige-Skoog (MS), akuades steril, deterjen, alkohol 70%, tween 20, klorox (*natrium hipoklorit/NaOCl* 5,25%) dan *Benzil Amino Purin* (BAP).

B. Prosedur Kerja

Penelitian ini terdiri atas dua tahap kegiatan pada teknik kultur jaringan. Tahapan tersebut adalah tahap persiapan (sterilisasi) dan tahap induksi selanjutnya tahap multiplikasi tunas. Berikut adalah prosedur kerja dari masing-masing tahapan

1. Tahap persiapan (teknik sterilisasi)

Sterilisasi eksplan yang berasal dari benih dilakukan dengan cara dicuci menggunakan deterjen (2 g per liter selama 1 jam) ditambah 2 tetes tween, dicuci di bawah air mengalir. Selanjutnya eksplan direndam dalam fungisida kontak (3 g per 100 ml, selama 1 jam) dan bakterisida (3 g per 100 ml, selama 1 jam) yang digunakan di luar *laminar air flow* (LAF). Pekerjaan selanjutnya dilakukan dalam LAF, eksplan direndam dalam larutan klorox dengan berbagai perendaman ditambah tween 20 (2 tetes) proses perendaman bervariasi tergantung perlakuan. Berikut ini adalah proses perendaman eksplan dalam larutan klorox:

- A1 = Eksplan direndam dalam larutan klorox 10% selama 90 menit
- A2 = Eksplan direndam dalam larutan klorok 15% selama 60 menit
- A3 = Eksplan direndam dalam larutan klorox 20% selama 30 menit
- A4 = Eksplan direndam dalam larutan klorox 20% selama 10 menit, direndam dalam klorox 15% selama 15 menit

A5 = Eksplan direndam dalam larutan klorox 20% selama 20 menit, direndam dalam klorox 15% selama 15 menit

A6 = Eksplan direndam dalam larutan klorox 15% selama 25 menit, direndam dalam klorox 15% selama 30 menit

Perlakuan A1 sampai A3 eksplan direndam menggunakan satu kali perendaman, sedangkan perlakuan A4 sampai A6 merupakan dua kali perendaman dengan waktu perendaman yang berbeda. Setelah perendaman, eksplan dibilas menggunakan air steril sampai bersih. Benih yang telah disterilisasi, selanjutnya diinduksi tunasnya pada media *in vitro*.

Rancangan percobaan yang digunakan penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan teknik sterilisasi. Setiap perlakuan terdiri dari 5 ulangan dan masing-masing ulangan terdiri dari 10 eksplan. Jumlah unit percobaan adalah $6 \times 5 \times 10 = 300$ unit percobaan. Pengamatan dilakukan pada minggu ke empat, parameter yang diukur, yaitu.

- Persentase hidup eksplan: 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.
- Presentase eksplan kering: jumlah benih yang kering pada akhir pengamatan dibandingkan dengan jumlah seluruh benih.

2. Tahap induksi dan multiplikasi tunas (perlakuan media pertumbuhan)

Induksi tunas dilakukan untuk memunculkan kembali tunas baru dari eksplan aseptik yang ditanam. Pada penelitian ini multiplikasi dilakukan bersamaan dengan tahap induksi. Eksplan yang telah tumbuh dipotong berdasarkan mata tunasnya (ruas) untuk ditanam kembali pada media induksi dan multiplikasi tunas jati. Media modifikasi pada penelitian ini adalah mengubah komposisi nitrogen dalam media dimana komposisi antara NO^{3-} dan NH^{4+} adalah 3 : 1 (Witjaksono, Nugraheni, Hoesen, & Litz, 2009). Jumlah molekul N yang terkandung pada kedua media adalah sama yaitu 60 mmol. Eksplan ditanam dalam media dengan komposisi kandungan hara makro yang berbeda (konsentrasi nitrogen dalam media) sebagai perlakuan dalam penelitian ini, yaitu :
A1 = Media MS ditambah BAP 0,1 ppm

A2 = Media Modifikasi ditambah BAP 0,1 ppm

Rancangan percobaan yang digunakan dalam tahapan ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan media induksi. Setiap perlakuan terdiri dari 10 ulangan dan masing-masing ulangan terdiri dari 10 eksplan. Jumlah unit percobaan adalah $2 \times 10 \times 10 = 200$ unit percobaan. Pengamatan dilakukan pada minggu ke enam. Parameter yang diamati, yaitu:

- a. Jumlah tunas: selisih jumlah tunas pada akhir pengamatan dan awal pengamatan
- b. Tinggi tunas: tinggi tunas baru yang tumbuh
- c. Persentase tumbuh: jumlah eksplan yang dapat tumbuh pada tahap inisiasi dan multiplikasi tunas
- d. Jumlah ruas: selisih ruas pada akhir pengamatan dan awal pengamatan.

Tabel (Table) 1. Ringkasan analisis ragam pengaruh teknik sterilisasi terhadap pertumbuhan eksplan jati muna (*Summary of analysis of variance of the effect of sterilization techniques on the growth of explants of muna teak*)

Parameter (Parameters)	F Hitung (F value)
Percentase tumbuh (Growth percentage)	6,87*
Presentase kontaminasi (Contamination percentage)	1,83 ^{tn}
Presentase pencokelatan (Percentage of browning)	4,78*
Presentase eksplan kering (Percentage of dry explants)	0,45 ^{tn}

Keterangan (Remarks): * : Nyata pada tingkat kepercayaan 95% ; tn : Tidak nyata pada tingkat kepercayaan 95% (* : Significant at 95 % confident level; ^{tn} not significant at 95 % confident level)

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan teknik sterilisasi berpengaruh nyata terhadap persentase tumbuh dan persentase pencokelatan, namun perlakuan teknik

C. Analisis Data

Analisis data menggunakan software Microsoft Excel, SAS Version 9.1 dan Minitab Version 16. Data-data hasil penelitian dianalisis secara statistik dengan menggunakan rancangan acak lengkap untuk mendapatkan sidik ragam (ANOVA). Apabila berpengaruh nyata maka untuk mengetahui perbedaan perlakuan dan interaksi lebih lanjut dilakukan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Tahap persiapan (teknik sterilisasi)

Ringkasan analisis ragam pengaruh teknik sterilisasi benih terhadap pertumbuhan eksplan jati muna (persentase tumbuh, kontaminasi, pencokelatan, dan eksplan kering) disajikan pada Tabel 1.

sterilisasi tidak berpengaruh nyata terhadap persentase kontaminasi dan persentase eksplan kering. Untuk mengetahui lebih lanjut perlakuan yang menimbulkan perbedaan yang nyata, dilakukan uji lanjut Duncan (Tabel 2).

Tabel (Table) 2. Uji lanjut Duncan persentase tumbuh dan pencokelatan dari masing-masing perlakuan teknik sterilisasi (*Duncan's Test for the percentage of growth and Percentage of browning from each treatment sterilization technique*)

No	Teknik sterilisasi (<i>Sterilization technique</i>)	Persentase tumbuh <i>Percentage of Growth (%)</i>	Persentase pencokelatan (<i>Percentage of browning</i>) (%)
1.	Eksplan direndam dalam larutan klorox 10 % selama 90 menit (<i>Explants were immersed in 10% chlorox solution for 90 minutes</i>) (A1)	70±13,6 a	10±8 ab
2.	Eksplan direndam dalam larutan klorok 15% selama 60 menit (<i>Explants were immersed in 15% chlorox solution for 60 minutes</i>) (A2)	30±16,7 b	25±18,9 a
3.	Eksplan direndam dalam larutan klorox 20 % selama 30 menit (<i>Explants were immersed in 20% chlorox solution for 60 minutes</i>) (A3)	65±11,6 a	10±4,9 ab
4.	Eksplan direndam dalam larutan klorox 20 % selama 10 menit, direndam kembali dalam klorox 15% selama 15 menit (<i>Explants were immersed in 20% chlorox solution for 10 minutes, soaked again in 15% chlorox for 15 minutes</i>) (A4)	70±14,1 a	0±4 b
5.	Eksplan direndam dalam larutan klorox 20 % selama 20 menit, direndam kembali dalam klorox 15% selama 15 menit (<i>Explants were immersed in 20% chlorox solution for 20 minutes, soaked again in 15% chlorox for 15 minutes</i>) (A5)	60±6,3 a	0±4 b
6.	Eksplan direndam dalam larutan klorox 15 % selama 25 menit, direndam kembali dalam klorox 15% selama 30 menit (<i>Explants were immersed in 15% chlorox solution for 25 minutes, soaked again in 15% chlorox for 30 minutes</i>) (A6)	60±6,3 a	10±8,9 ab

Keterangan (Remarks) : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan nyata pada tingkat kepercayaan 95%
 (*The numbers followed by the same letters not differences at the 95% confidence level*)

Teknik sterilisasi yang menggunakan satu kali perendaman klorok 10% selama 90 menit (A1) menghasilkan persentase tumbuh sebesar 70%. Hasil tersebut sama dengan teknik sterilisasi dengan dua kali perendaman klorok yaitu perendaman klorox 20% selama 10 menit dilanjutkan dengan perendaman klorox 15% selama 15 menit (A4). Persentase pencokelatan yang terbaik adalah A4 dan A5 (0%). Persentase tumbuh eksplan menunjukkan bahwa 70% eksplan yang ditanam dapat tumbuh dalam kondisi aseptik, dan 30% eksplan mati karena benih tidak tumbuh atau karena terkontaminasi jamur dan

bakteri. Proses sterilisasi juga mengakibatkan beberapa eksplan mengalami kematian karena pencokelatan, eksplan yang mengalami pencokelatan terendah adalah perlakuan terbaik seperti perlakuan A4 dan A5, pada perlakuan ini benih tidak ada yang mengalami pencokelatan. Hasil sidik ragam persentase kontaminasi dan benih kering menunjukkan tidak berbeda nyata, untuk melihat perlakuan yang terbaik maka nilai rata-rata menjadi acuannya. Rata-rata persentase kontaminasi dan eksplan kering dari masing-masing perlakuan teknik sterilisasi dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel (Table) 3. Rata-rata persentase kontaminasi dan eksplan kering dari masing-masing perlakuan teknik sterilisasi (*The average percentage of contamination and dry explants from each treatment of sterilization technique*)

	Teknik sterilisasi (<i>Sterilization technique</i>)	Persentase kontaminasi (<i>Contamination percentage</i>) (%)	Persentase Eksplan kering (<i>Percentage of dry explants</i>) (%)
1.	Eksplan direndam dalam larutan klorox 10% selama 90 menit (<i>Explants were immersed in 10% chlorox solution for 90 minutes</i>) (A1)	10±9,7	10±11,7
2.	Eksplan direndam dalam larutan klorox 15% selama 60 menit (<i>Explants were immersed in 15% chlorox solution for 60 minutes</i>) (A2)	25±10,9	20±19,6
3.	Eksplan direndam dalam larutan klorox 20% selama 30 menit (<i>Explants were immersed in 20% chlorox solution for 60 minutes</i>) (A3)	5±4,9	20±17,2
4.	Eksplan direndam dalam larutan klorox 20 % selama 10 menit, direndam dalam klorox 15% selama 15 menit (<i>Explants were immersed in 20% chlorox solution for 10 minutes, soaked again in 15% chlorox for 15 minutes</i>) (A4)	10±9,8	20±6,3
5.	Eksplan direndam dalam larutan klorox 20% selama 20 menit, direndam dalam klorox 15% selama 15 menit (<i>Explants were immersed in 20% chlorox solution for 20 minutes, soaked again in 15% chlorox for 15 minutes</i>) (A5)	20±10,2	20±9,8
6.	Eksplan direndam dalam larutan klorox 15% selama 25 menit, direndam dalam klorox 15% selama 30 menit (<i>Explants were immersed in 15% chlorox solution for 25 minutes, soaked again in 15% chlorox for 30 minutes</i>) (A6)	20±8	10±4,9

Berdasarkan hasil nilai rata-rata terlihat bahwa persentase kontaminasi terbaik adalah A3 (5%) dan persentase eksplan kering terbaik adalah A1 dan A6 (10%). Persentase kontaminasi menunjukkan bahwa eksplan yang ditanam terserang oleh bakteri dan jamur yang mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan eksplan. Nilai kontaminasi 5% merupakan nilai terkecil dari semua perlakuan yang menandakan bahwa eksplan tersebut hanya terserang bakteri dan jamur sebanyak 5%. Selain jamur, bakteri dan pencokelatan,

eksplan kering merupakan salah satu faktor yang membuat eksplan tidak dapat tumbuh. Sebanyak 10%-20% dari benih yang ditanam mengalami benih kering.

2. Tahap Induksi dan Multiplikasi (perlakuan media pertumbuhan)

Berdasarkan ringkasan hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan media pertumbuhan berpengaruh nyata terhadap jumlah tunas, tinggi tunas, persentase tumbuh dan jumlah ruas eksplan jati muna (Tabel 4).

Tabel (Table) 4. Ringkasan analisis sidik ragam pengaruh perlakuan media pertumbuhan terhadap jumlah tunas, tinggi tunas, persentase tumbuh dan jumlah ruas eksplan jati muna (*Summary of variance analysis of various treatment effects of growth media on number of shoots, shoot height, percentage of growth and number of segments of muna teak explants*)

Respon (Response)	F Hitung (F value)
Jumlah tunas (number of shoots)	19,60*
Tinggi tunas (shoot height)	49,09*
Persentase tumbuh (percentage of growth)	30,80*
Jumlah ruas (number of segments)	85,01*

Keterangan (Remarks): * : Nyata pada tingkat kepercayaan 95% (*: significant at 95 % confident level)

Berdasarkan hasil analisis ragam, terlihat bahwa jumlah tunas, tinggi tunas, persentase tumbuh dan jumlah ruas berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%. Untuk mengetahui lebih lanjut perlakuan yang menimbulkan perbedaan yang nyata, dilakukan uji beda Duncan (Tabel 5). Berdasarkan hasil uji

Duncan terlihat bahwa media modifikasi ditambah dengan BAP sebanyak 0,1 mg.l⁻¹ (A2) menghasilkan jumlah tunas (2 tunas), tinggi tunas (4,1 cm), persentase tumbuh (91%) dan jumlah ruas (6 ruas per tunas) terbaik.

Tabel (Table) 5. Uji Lanjut Duncan untuk jumlah tunas, tinggi tunas, persentase tumbuh dan jumlah ruas eksplan jati muna dari masing-masing perlakuan media pertumbuhan (*Duncan's Test for number of shoots, shoot height, percentage of growth and number of muna teak explant segments from each treatment of growth media*)

Perlakuan (Treatments)	Jumlah tunas (number of shoots)	Tinggi tunas (shoot height) (cm)	Persentase tumbuh (Percentage of growth) (%)	Jumlah ruas (number of segments)
Media MS ditambah BAP 0,1 ppm (MS media plus BAP hormone as much as 0.1 mg / L) (A1)	1±0,07 b	2,3±0,2 b	64±9,3 b	3±0,4 b
Media Modifikasi ditambah BAP 0,1 ppm (modified media plus BAP hormone 0.1 mg / L.) (A2)	2±0,4 a	4,1±0,8 a	9,1±8,7 a	6±0,9 a

Keterangan (Remark): Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan nyata pada tingkat kepercayaan 95% (The numbers followed by the same letters not differences at the 95% confidence level)

B. Pembahasan

1. Tahap Persiapan (teknik sterilisasi)

Besarnya tingkat persentase tumbuh eksplan dipengaruhi oleh persentase pencokelatan, tingkat kontaminasi, dan

persentase eksplan kering. Kontaminasi merupakan masalah yang paling sering ditemui pada teknik mikropropagasi. Sumber kontaminasi secara umum ada tiga yaitu tanaman, kondisi lingkungan dan cara kerja

yang salah (Onwubiko, Nkogho, Anyanwu, & Onyeishi, 2013). Kontaminasi disebabkan oleh aktivitas jamur dan bakteri pada eksplan yang mengakibatkan kematian pada proses pertumbuhannya sehingga menurunkan produktivitas dan tingkat keberhasilan kultur (Çölgeçen, Koca, & Toker, 2011). Kondisi eksplan aseptik merupakan syarat untuk keberhasilan eksplan tumbuh dan dapat dilanjutkan untuk tahap berikutnya.

Kontaminasi terjadi pada hari ke-7 setelah penanaman. Kontaminasi yang paling banyak terjadi akibat infeksi jamur. Hifa jamur awalnya tumbuh pada areal permukaan eksplan kemudian hifa menyebar hingga menutupi eksplan dan mengakibatkan eksplan mati. Berdasarkan hasil pada akhir pengamatan terlihat bahwa perlakuan sterilisasi menggunakan klorox mempengaruhi presentasi tumbuh eksplan dan pencoklatan eksplan. Perendaman dalam larutan klorox 10%, 90 menit (A1), dan perendaman dua kali dalam klorox 20%, 10 menit dan 15%, 15 menit, (A4) merupakan teknik sterilisasi terbaik berdasarkan nilai presentasi tumbuh eksplan (Tabel 2). Nilai tertingginya ada pada teknik sterilisasi A1 dan A4 adalah 70%. Jika dilihat dari waktu perendaman maka teknik sterilisasi A4 merupakan yang tercepat hanya memerlukan waktu 25 menit, sementara A1 memerlukan waktu 90 menit. Teknik sterilisasi yang tepat untuk eksplan benih jati pada penelitian ini menggunakan perendaman

klorox (*natrium hipoklorit*) secara bertahap didalam *laminar air flow*. Perendaman klorox yang diulang dapat meningkatkan presentasi tumbuh eksplan hingga 70%. Berdasarkan hal tersebut terbukti bahwa sterilisasi menggunakan bahan desinfektan klorox atau NaOCl mampu menurunkan tingkat kontaminasi terhadap bakteri dan jamur (Badoni & Chauhan, 2010; Peiris *et.al.*, 2012). Penggunaan klorox terbukti dapat mengeliminasi jamur dan bakteri tanpa terjadi pencoklatan pada eksplan.

Beberapa penelitian menggunakan larutan merkuri 0,1%-1% dengan waktu perendaman antara 3 – 5 menit untuk sterilisasi permukaan (Kozgar & Shahzad, 2012; Mishra *et al.*, 2018). Penggunaan merkuri memerlukan waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan klorox, akan tetapi dampaknya negatif karena dapat mencemari lingkungan dan berbahaya bagi kesehatan. Penggunaan klorox terbukti dapat menggantikan merkuri yang biasa digunakan untuk sterilisasi benih jati, walaupun waktu yang dibutuhkan relatif lebih lama.

Perendaman dengan sterilan klorox menggunakan perlakuan A4 memiliki persentase tumbuh paling tinggi 70% dengan persen kontaminasi 10%. Penggunaan NaOCl tergantung pada kondisi eksplan yang disterilkan. Respon eksplan pada benih juga menghasilkan respon yang berbeda, tergantung kondisi benihnya. Sterilisasi permukaan pada

benih Cowpea, padi dan sorgum menggunakan NaOCl 3,5%, 30 menit sangat efektif dalam menghasilkan benih aseptik (Oyebanji *et al.*, 2009). Kondisi benih Cowpea, padi dan sorgum memiliki karakteristik berbeda dengan benih jati muna. Benih jati muna memerlukan konsentrasi yang lebih tinggi sebesar ± 5 kalinya dengan waktu lebih cepat. Akan tetapi benih jati memerlukan perendaman 2 kali untuk mendapatkan hasil yang maksimal. Perendaman pertama akan menghancurkan jamur dan bakteri pada permukaan, perendaman kedua akan menghancurkan sisisa jamur dan bakteri yang masih menempel dan masuk kedalam jaringan tanpa merusaknya. Hasil penelitian Shofiyani dan Hajoeningtjas (2010) menunjukkan bahwa penggunaan senyawa kimia NaOCl 20% mampu mengurangi kontaminasi baik eksternal maupun internal yang disebabkan oleh jamur maupun bakteri.

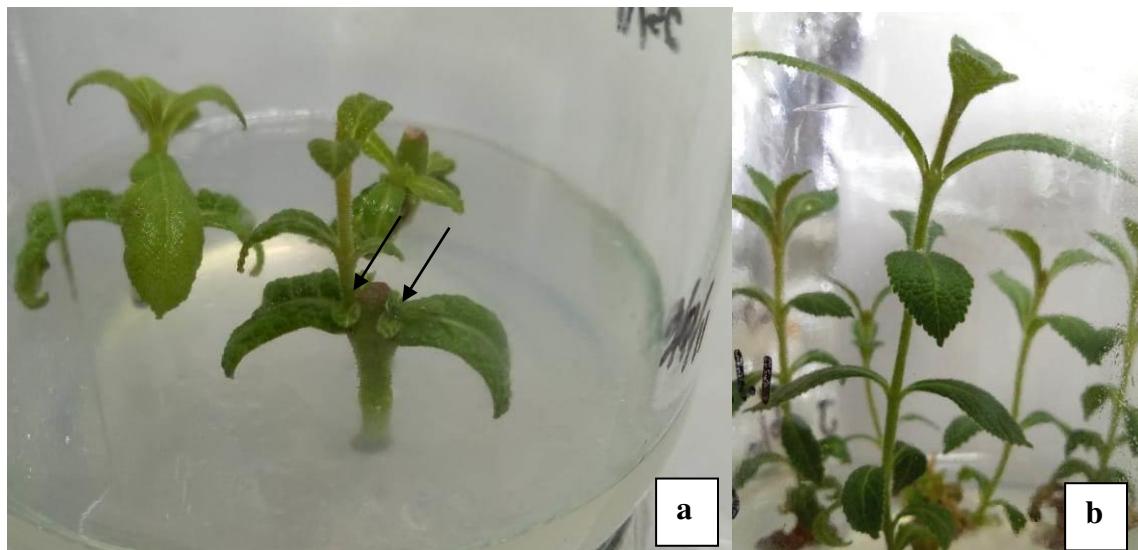
Berbeda dengan benih, eksplan yang berasal dari tunas juga akan memiliki respon yang berbeda terhadap perendaman klorox. Tunas durian (*Durio zibethinus*), memerlukan konsentrasi sebesar 20% dan 10 persen untuk menghasilkan eksplan aseptik (Sugiyarto & Kuswandi, 2013). Seperti benih jati muna, tunas durian juga menggunakan konsentrasi yang sama untuk menghilangkan jamur dan bakteri yang menempel. Disini kita melihat bahwa benih jati dan tunas durian memiliki

respon yang sama terhadap dua kali perendaman klorox.

Perendaman bertahap telah banyak diterapkan untuk teknik sterilisasi seperti dalam penelitian Sianturi, Supriyanto, Wulandari, dan Subandy (2017) dan Ardiansyah, Supriyanto, Wulandari, Subandy dan Fitriani (2014). Klorox dikenal dengan aktivitas anti bakteri yang kuat, mampu membunuh bakteri dengan cara yang cepat. Penggunaan klorox secara berlebih juga dapat membunuh eksplan jika digunakan dalam konsentrasi yang tinggi. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini (10% dan 20%) belum bersifat racun bagi eksplan jati muna.

2. Tahap induksi dan multiplikasi (perlakuan media pertumbuhan)

Induksi tunas jati ditandai dengan munculnya tunas pada ketiak daun jati, biasanya tunas hanya muncul pada satu ketiak daun saja tetapi sesekali muncul pada kedua ketiak daun (Gambar 1a). Tunas yang muncul pada ketiak daun akan tumbuh sepasang daun baru dan seterusnya sampai tinggi tunas mencapai maksimal. Banyaknya tunas jati hasil regenerasi baru pada tahap multiplikasi didapatkan dari setiap ruas yang dihasilkan dari satu tunas tersebut (Gambar 1b). setiap ruas jati memiliki dua mata tunas yang berpeluang untuk menghasilkan dua tunas yang baru.



Gambar (Figure) 1. (a) Tunas jati muna pada ketiak daun, (*Muna teak shoots on the armpit of the leaf*); (b) ruas jati muna pada tahap multiplikasi (*Muna teak segment at the multiplication stage*);

Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan pada minggu ke enam setelah tanam, terlihat bahwa rata-rata jumlah tunas, tinggi tunas, persentase tumbuh, dan jumlah ruas yang terbaik adalah menggunakan media A2 (media modifikasi ditambah BAP 0.1 ml). Hal ini berarti bahwa media terbaik untuk tahap induksi dan multiplikasi tunas jati muna dalam penelitian ini adalah media modifikasi (komposisi antara NO^{3-} dan NH^{4+} adalah 3:1 v/v). Media yang digunakan untuk pemeliharaan kalus alpukat pada media cair dengan komposisi perbandingan nitrogen antara NO^{3-} dan NH^{4+} adalah 3 : 1 v/v (Witjaksono *et al.*, 2009) dapat digunakan untuk perbanyak eksplan jati muna pada media padat dengan perbandingan konsentrasi nitrogen tersebut.

Konsentrasi nitrogen dalam media sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan tunas jati muna. Hasil penelitian membuktikan bahwa

konsentrasi nitrogen dalam media modifikasi dapat menginduksi tunas jati muna lebih banyak dibandingkan dengan media dasar MS. Ammonium dan nitrat merupakan komponen nitrogen dalam media MS yang sangat berpengaruh terhadap pembentukan dan regenerasi eksplan vegetatif seperti daun, batang dan akar juga terhadap pembentukan tunas dan kecepatan penggandaan tunas (Tsay & Saunder, 1999).

Konsentrasi nitrat yang dinaikkan hingga tiga kali lebih banyak dari amonium dapat menaikkan jumlah tunas, tinggi tunas, persentase hidup dan jumlah ruas pada eksplan jati muna. Eksplan yang dihasilkan dari media tersebut maksimal sebanyak 12 eksplan baru (jumlah tunas x jumlah ruas). Perubahan konsentrasi nitrogen (NO_3^-) berpengaruh terhadap respon pembelahan sel, regenerasi eksplan, pemunculan tunas adventif, pertambahan biomasa dan abnormalitas

pertumbuhan (Ivanova & Van Staden, 2008; Rahman, Haider, Hossain, & Islam, 2011; Sianturi *et al.*, 2017). Pada media modifikasi konsentrasi KNO_3 (kalium nitrat) lebih banyak dibandingkan dengan NH_4NO_3 (ammonium nitrat). Penggunaan ammonium dalam media lebih sedikit dikarenakan ammonium bersifat racun dalam jumlah yang banyak untuk tanaman (Iranbakhsh, Ebadi, & Zare, 2011).

Selain pengaruh dari konsentrasi nitrogen, BAP juga memegang peranan dalam memunculkan tunas. Dalam penelitian ini, penggunaan BAP dalam media cukup rendah ($0,1 \text{ mg}^{-1}$) belum mampu untuk mendorong terbentuknya tunas lebih banyak pada media MS, akan tetapi sudah cukup untuk mendorong munculnya tunas pada media modifikasi. Induksi tunas jati muna pada konsentrasi BAP yang tinggi ($3-4 \text{ mg}^{-1}$) dapat meningkatkan jumlah tunas sampai 5 tunas per eksplan, tetapi menjadikan eksplan yang dihasilkan pendek (3 cm) (Nursyamsi, Suhartati, & Qudus T, 2007). Akan tetapi jumlah ruas yang didapat pada penelitian tersebut tidak diamati. Pada tahap multiplikasi jati sebaiknya memperhatikan tinggi tunas dan jumlah ruas yang dihasilkan. Jumlah ruas yang dihasilkan akan berpengaruh terhadap jumlah eksplan baru yang dapat ditanam kembali pada tahap multiplikasi. Pada penelitian ini ruas yang dihasilkan pada media modifikasi sebanyak 6 ruas per tunas dengan jumlah tunas

sebanyak 2 tunas per eksplan. Regenerasi tunas yang baru dari 1 eksplan akan dihasilkan sebanyak 12 eksplan baru untuk ditanam kembali.

IV. KESIMPULAN

Teknik sterilisasi yang tepat untuk mendapatkan eksplan benih jati muna steril adalah perendaman dalam larutan klorox 20% selama 10 menit, kemudian dilanjutkan dengan klorox 15% selama 15 menit. Sedangkan media terbaik untuk tahap induksi dan multiplikasi tunas jati muna yaitu media modifikasi ditambah hormon BAP sebanyak $0,1 \text{ mg}^{-1}$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Balai Litbang Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan yang telah membiayai penelitian ini. Dinas Kehutanan Sulawesi Tenggara atas bantuan dalam pengambilan benih di Pulau Muna. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada seluruh teknisi Laboratorium Kultur Jaringan Balai Litbang Teknologi Perbenihan Tanaman Hutan yang telah membantu dalam kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinugraha, H. A., Pudjiono, S., & Mahfudz. (2013). Variasi pertumbuhan dan parameter genetik uji keturunan jati umur 5 tahun di gunung kidul, yogyakarta. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 7(3), 167–178.

- Antony, T., Anees, P. V. M., Kumar, V., Sangamithra, D., Philip, T., & Santhoshkumar, A. V. (2015). Application of mercuric chloride and charcoal in micro-propagation of teak (*Tectona grandis*). *Indian J Trop Biodev*, 23(2), 157-166.
- Ashraf, M. W., Bilal, M., & Iqbal, M. (2014). Allium sativum aqueous extract inhibitory effect on advanced glycation end product. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 4, 38-44.
- Ardiansyah, R., Supriyanto, Wulandari, A. S., Subandy, B., & Fitriani, Y. (2014). Teknik sterilisasi eksplan dan induksi tunas dalam mikropropagasi tembesu (*Fagraea fragrans* ROXB). *Jurnal Silvikultur Tropika*, 5(3), 167–173.
- Badoni, A., & Chauhan, J. S. (2010). In vitro sterilization protocol for micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. "Kufri Himalini." *Academia Arena*, 2(4), 24–27. <https://doi.org/10.1136/vr.100027>
- Çölgeçen, H., Koca, U., & Toker, G. (2011). Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Tubitak*, 35, 513–520. <https://doi.org/10.3906/biy-0911-161>
- Fauzan, Y. S. A., Supriyanto, S., & Tajuddin, T. (2017). Growth and morphological changes as an early indication of invitro ploidization of teak (*Tectona grandis* L.f.). *Jurnal Penelitian Hutan Tanaman*, 14(2), 128–139. <https://doi.org/10.20886/jpht.2017.14.2.128-139>
- Goswami, N. K., & Handique, P. J. (2013). 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.
- Harahap, P. S., Siregar, L. A. M., & Husni, Y. (2015). Kajian awal: Respon eksplan nodus dalam inisiasi tunas mikro tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) dalam Medium MS. *Jurnal Agroekoteknologi Universitas Sumatera Utara*, 3(1), 103043.
- Iranbakhsh, A., Ebadi, M., & Zare, Z. (2011). Effects of nitrogen and potassium on in vitro microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L. var Agria). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(12), 442–448.
- Ivanova, M., & Van Staden, J. (2008). Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of in vitro regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(2), 227–231. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9311-7>
- Kozgar, M. I., & Shahzad, A. (2012). An improved protocol for micropropagation of teak tree (*Tectona grandis* L.). 195–202. <https://doi.org/10.1007/s12210-012-0176-2>
- Mishra, J. P., Bhadrawale, D., & Yadav, U. (2018). Effect of various plant growth regulators on in vitro seed germination and shoot organogenesis in *Tectona grandis* L. f. 5(June), 152–159. <https://doi.org/10.22271/tpr.2018.v5.i2.020>
- Nursetiadi, E. (2008). *Kajian macam media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi tanaman manggis (*Garcinia mangostana* l.) secara in vitro*. Masters thesis, Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Nursyamsi, Suhartati, & Qudus T, A. Q. (2007). Pengaruh zat pengatur tumbuh pada perbanyak jati muna secara kultur jaringan. *Jurnal Penelitian Hutan Dan Konservasi Alam*, 4(4), 385–390.
- 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, N. C., Nkogho, C. S., Anyanwu, C. P., & Onyeishi, G. C. (2013). Effect of different concentration of sterilant and exposure time on sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) explants. 2(8), 14–20.
- Oyebanji, O., Nweke, O., Odebunmi, O., Galadima, N., Idris, M., Nnodi, U., ... Oghadu, G. (2009). Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol fo cowpe, rica and sorgum seeds. *African Journal of Biotechnology*, 8(20), 5395–5399.
- Peiris, S. E., de Silva, E. D. U. D., Edussuriya, M., Attanayake, A. M. U. R. K., & Peiris, B. C. N. (2012). CSUP technique: A low cost

- sterilization method using sodium hypochlorite to replace the use of expensive equipment in micropropagation. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 40(1), 49–54. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v40i1.4168>
- Pratiwi, R.S., Siregar, L.A.M, Nuriadi, I. (2015). Pengaruh lama penyinaran dan komposisi media terhadap mikropropagasi tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Jurnal Agroekoteknologi Universitas Sumatera Utara*, 4 (1),1762-1767, doi: [10.32734 / jaet. y4i1. 12347.](https://doi.org/10.32734/jaet.v4i1.12347)
- Prasetyawati, C. A. (2014). Variasi pertumbuhan awal beberapa klon tanaman jati pada tanah masam dengan pemberian dolomit. *Jurnal Hutan Tropis*, 2(3), 204–212.
- Rahman, M. H., Haider, S. A., Hossain, M., & Islam, R. (2011). Effect of potassium and ammonium nitrate media on in vitro growth response of potato (*Solanum tuberosum* L.). *International Journal of Biosciences*, 1(2), 54–57.
- Shofiyani, A., & Hajoeningtjas, O. D. (2010). Pengaruh sterilan dan waktu perendaman pada eksplan daun kencur (*Kaemferia galanga* L) untuk meningkatkan keberhasilan kultur kalus. *Agritech: Jurnal Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Purwokerto*, 12(1),11-29.
- Sianturi, R. U. D., Supriyanto, Wulandari, A. S., & Subandy, B. (2017). Regenerasi tunas adventif dari eksplan daun tembesu (*Fagraea fragrans* Roxb.) melalui teknik kultur jaringan. *Penelitian Hutan Tanaman*, 14(1), 1–17.
- Sugiyarto, L., & Kuswandi, P. C. (2013). Eksplorasi metode sterilisasi dan macam media untuk perbanyak durian (*Durio zibethinus*, L.) secara in vitro. *Jurnal Sains Dasar*, 2(1), 20-24.
- Topo Jers, L.O. (2016). Resistensi kelompok masyarakat lokal atas pengelolaan Sumber daya hutan di kabupaten muna. *Etnoreflika*, 5(3), 185–197.
- Tsai, C. J., & Saunders, J. W. (1999). Evaluation of sole nitrogen sources for shoot and leaf disc cultures of sugarbeet. *Plant cell, tissue and organ culture*, 59(1), 47-56.
- Widyatmoko, A., Rimbawanto, A., & Chasani, A. R. (2013). Hubungan kekerabatan antar etnik. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 7(November), 151–166. Retrieved from <http://anwarhapid.blogspot.com/2013/01/hungan-kekerabatan-antar-etnik-di.html>
- Witjaksono, Y., Nugraheni, U. K., Hoesen, D. H., & Litz, R. E. (2009). Regeneration from irradiated avocado (*Persea americana* Mill.) embryogenic cultures. *Induced Mutation in Tropical Fruit Trees*, 83–90. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency.