

## Pembentukan Benih Sintetik Tanaman Nenas

Roostika, I<sup>1)</sup>, Purnamaningsih, R<sup>1)</sup>, Supriati, Y<sup>1)</sup>, Mariska, I<sup>1)</sup>, Khumaida, N<sup>2)</sup>, dan Wattimena, GA<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

<sup>2)</sup> Dep. Agronomi dan Hortikultura, Fak. Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti No.1, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680

<sup>3)</sup> Profesor Emeritus pada Dep. Agronomi dan Hortikultura, Fak. Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Jl. Meranti No.1, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680

Naskah diterima tanggal 23 Juli 2012 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 15 Oktober 2012

**ABSTRAK.** Nenas merupakan tanaman buah tropis dan subtropis yang komersial. Kultivar Smooth Cayenne memiliki tipe dan jumlah propagul yang terbatas, sehingga diperlukan dukungan teknologi lainnya untuk produksi benih secara masal. Teknologi benih sintetik dapat diterapkan untuk produksi benih secara masal dan konservasi. Tujuan penelitian ialah untuk mengetahui pengaruh kombinasi auksin dan sitokinin terhadap morfogenesis eksplan nenas yang terenkapsulasi, mengetahui pengaruh interaksi antara suhu penyimpanan dengan konsentrasi paklobutrazol atau manitol terhadap pertumbuhan eksplan nenas yang terenkapsulasi dan masa simpan. Penelitian dilaksanakan dari Bulan April sampai dengan Desember 2011 di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Percobaan disusun secara faktorial dalam rancangan acak lengkap terdiri atas enkapsulasi eksplan, pertumbuhan minimal menggunakan paklobutrazol, atau manitol yang dikombinasikan dengan suhu penyimpanan. Enkapsulasi dilakukan terhadap batang semu dan basal daun menggunakan Na-alginat 3% yang berisi media MS dengan penambahan BA (0, 1, 2, dan 3 mg/l) yang dikombinasikan dengan NAA (0, 1, 2, dan 3 mg/l). Untuk memacu proses diferensiasi, basal daun diberi praperlakuan menggunakan media MS yang mengandung BA 0,5 mg/l dan NAA 0,5 mg/l sebelum dienkapsulasi dengan perlakuan BA dan NAA pada konsentrasi 0; 0,5; dan 1 mg/l. Pertumbuhan minimal dilakukan menggunakan paklobutrazol (0, 1, 2, dan 3 mg/l) atau manitol (0, 1, 2, 3, 4, dan 5%) pada suhu penyimpanan 15 dan 25 °C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa basal daun nenas yang terenkapsulasi mampu berdiferensiasi setelah praperlakuan. Tidak terdapat interaksi yang nyata antara konsentrasi paklobutrazol dengan suhu penyimpanan terhadap daya hidup dan daya tembus kapsul tunas nenas. Biakan tersebut hanya dapat disimpan selama 1 bulan. Interaksi yang nyata juga tidak dijumpai antara konsentrasi manitol dengan suhu penyimpanan terhadap daya hidup dan daya tembus kapsul embrio somatik nenas. Manitol 4% mampu memperpanjang masa simpan hingga 4 bulan. Manitol dapat menggantikan aplikasi suhu rendah dalam penyimpanan kultur nenas yang terenkapsulasi.

Katakunci: Benih sintetik; Pertumbuhan minimal; Paklobutrazol; Manitol; *Ananas comosus*

**ABSTRACT.** Roostika, I, Purnamaningsih, R, Supriati, Y, Mariska, I, Khumaida, N, and Wattimena, GA 2012. **Artificial Seed Formation of Pineapple.** Pineapple is a commercial tropical and subtropical fruit crop. Smooth Cayenne cultivar has limited type and number of propagules so that it should be supported by the other technology to produce plenty seedlings. Artificial seed can be applied for seed production and conservation. The objectives of the study were to know the effect of combination treatments between auxin and cytokinin to the morphogenesis of encapsulated pineapple cultures, to know the effect of paclobutrazol, mannitol, and temperature of storage to the growth of encapsulated pineapple cultures. The experiment was conducted from April to December 2011 at Tissue Culture Laboratory, Researchers Group of Cell and Tissue of Biology, Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development, Bogor. Factorial of a completely randomized design was used. The study consisted of encapsulation, minimal growth by using paclobutrazol or mannitol combined with storage temperature. Encapsulation was conducted by using 3% Na-alginat containing of MS medium with addition of BA (0, 1, 2, and 3 mg/l) combined with NAA (0, 1, 2, and 3 mg/l). To promote differentiation, leaf bases were pre-cultured on MS media containing BA and NAA at concentration of 0.5 mg/l respectively prior to encapsulated by BA and NAA (0; 0.5; and 1 mg/l). Minimal growth was conducted by using paclobutrazol (0, 1, 2, and 3 mg/l), or mannitol (0, 1, 2, 3, 4, and 5%), and combined with storage temperature (15 and 25 °C). The results showed that encapsulated leaf bases of pineapple could differentiate after pre-treatment. There was no interaction between paclobutrazol and temperature to the survival rate and emergence rate of the encapsulated cultures. The encapsulated shoots could be stored for 1 months. There was also no interaction between mannitol and temperature to the survival rate and emergence rate of the encapsulated cultures. By using somatic embryos and 4% mannitol, the storage period could be prolonged for 4 months. Mannitol could substitute the use of low temperature in the conservation of encapsulated pineapple cultures.

Keywords: Artificial seed; Minimal growth; Paclobutrazol; Mannitol; *Ananas comosus*

Nenas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) merupakan tanaman penting di daerah tropis dan subtropis. Berdasarkan data produksi buah-buahan, nenas menempati peringkat keempat setelah pisang, mangga, dan jeruk (Badan Pusat Statistik 2009). Untuk peningkatan produksi penanaman bibit nenas sebanyak 40.000 tanaman/ha perlu diarahkan menjadi 100.000 tanaman/ha (Suminar 2010), sehingga jumlah bibit yang diperlukan juga meningkat.

Pada umumnya tanaman nenas diperbanyak secara vegetatif. Menurut Coppens d'Eckenbrugge Leal (2003), organ vegetatif nenas terdiri dari *crown* (mahkota), *sucker* (tunas yang berasal dari ketiak daun), *butt* atau *stump* (tanaman utuh setelah pemanenan), *hapas* (tunas yang diproduksi pada bagian dasar tangkai buah), *ratoon* (tunas yang muncul dari bagian batang yang tertimbun di dalam tanah), dan *slip* (tunas yang timbul dari tangkai buah pada bagian persis



di bawah buah atau yang tumbuh di sekitar mahkota). Pada kultivar Smooth Cayenne, tipe organ vegetatif tersebut hanya berupa mahkota, *sucker*, atau *ratoon* dan jumlahnya sangat terbatas.

Teknologi benih sintetik merupakan teknologi yang sangat prospektif dikembangkan untuk perbanyakan bibit dan konservasi (Rai *et al.* 2009). Benih sintetik didefinisikan sebagai embrio somatik yang berada di dalam mantel (kapsul), sehingga sifatnya mirip dengan benih zigotik (Redenbaugh 1992). Mantel tersebut berperan sebagai endosperma yang mengandung sumber karbon, nutrisi, dan zat pengatur tumbuh (ZPT). Dewasa ini, definisi benih sintetik dikembangkan lebih lanjut karena eksplan yang digunakan tidak terbatas pada embrio somatik melainkan juga tunas terminal, tunas aksilar, nodus, dan jaringan meristematik lainnya.

Teknik konservasi *in vitro* dapat dibedakan menjadi tiga macam yaitu (1) penyimpanan pada media tumbuh, (2) penyimpanan secara pertumbuhan minimal, dan (3) penyimpanan secara kriopreservasi (Mariska *et al.* 1996, Leunufna 2004). Teknik pertumbuhan minimal disarankan diterapkan untuk koleksi aktif (*working collection* atau *active collection*), sedangkan teknik kriopreservasi diterapkan untuk koleksi dasar (*base collection*) (Withers 1985).

Pada teknik penyimpanan dengan media tumbuh, tidak diperlukan penambahan zat penghambat tumbuh. Penyimpanan dengan cara tersebut, memerlukan tindakan subkultur yang frekuentif, sehingga kurang menghemat tenaga, waktu, dan biaya serta berisiko terhadap kontaminasi (Mariska *et al.* 1996). Selain itu, subkultur yang frekuentif juga berisiko terhadap timbulnya keragaman somaklonal (Eeuwens *et al.* 2002).

Pada teknik pertumbuhan minimal, beberapa modifikasi media dan lingkungan dapat diterapkan, antara lain penurunan temperatur lingkungan dan intensitas cahaya (Hu & Wang 1983, Withers 1985, Keller *et al.* 2006), penggunaan regulator osmotik seperti sukrosa dan manitol (Withers 1985, Bessembinder *et al.* 1993), penurunan konsentrasi beberapa faktor esensial seperti pengenceran media (Desbrunais *et al.* 1992), serta penggunaan retardan seperti paklobutrazol, cycocel, dan ancymidol (Withers 1985). Dengan penerapan teknik pertumbuhan minimal, maka biakan dapat disimpan dalam jangka menengah (bulanan hingga tahunan).

Di Indonesia, teknik pertumbuhan minimal tanaman nenas belum pernah dilaporkan. Di mancanegara, dilaporkan bahwa teknik enkapsulasi tunas *in vitro* mampu menyimpan biakan nenas selama 1,5 bulan melalui aplikasi suhu 8°C menggunakan media MS

tanpa zat penghambat tumbuh (Gangopadhyay *et al.* 2005). Penyimpanan pada suhu sangat rendah memerlukan energi listrik yang biayanya cukup besar, sehingga diperlukan metode lain yang mampu menghambat pertumbuhan agar dapat menghemat biaya dan biakan dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama tanpa menurunkan daya regenerasi pascapenyimpanan.

Secara umum, penelitian ditujukan untuk pembentukan benih sintetik dan penyimpanan eksplan nenas dengan metode pertumbuhan minimal untuk menghambat perkecambahan dini. Secara khusus, tujuan penelitian ialah: (1) mengetahui pengaruh kombinasi auksin dan sitokinin terhadap morfogenesis eksplan nenas yang terenkapsulasi, (2) mengetahui pengaruh konsentrasi paklobutrazol dan suhu penyimpanan terhadap pertumbuhan tunas nenas yang terenkapsulasi, dan (3) mengetahui pengaruh konsentrasi manitol dan suhu penyimpanan terhadap pertumbuhan embrio somatik nenas yang terenkapsulasi. Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini ialah: (1) eksplan nenas yang terenkapsulasi akan mengalami morfogenesis pada media yang mengandung auksin dan sitokinin, (2) terdapat interaksi yang nyata antara perlakuan paklobutrazol dan suhu penyimpanan terhadap penghambatan pertumbuhan eksplan nenas yang terenkapsulasi, dan (3) terdapat interaksi yang nyata antara perlakuan manitol dan suhu penyimpanan terhadap penghambatan pertumbuhan eksplan nenas yang terenkapsulasi dan lama penyimpanan.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari Bulan April sampai dengan Desember 2011 di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Percobaan disusun secara faktorial dalam rancangan acak lengkap terdiri atas enkapsulasi eksplan, pertumbuhan minimal menggunakan paklobutrazol, atau manitol yang dikombinasikan dengan suhu penyimpanan. Sumber bahan tanaman yang digunakan adalah tunas *in vitro* tanaman nenas Smooth Cayenne yang berasal dari Subang, Jawa Barat. Tunas *in vitro* tersebut dipelihara pada media MS dengan penambahan *benzyl adenine* (BA) 0,5 mg/l dan kinetin (Kn) 1 mg/l. Inkubasi dilakukan di ruang kultur dengan suhu 25°C dan pencahayaan 800–1000 lux dengan fotoperiodisitas 16 jam. Penelitian dibagi atas tiga tahap percobaan, yaitu (1) enkapsulasi eksplan, (2) pertumbuhan menggunakan paklobutrazol, dan (3) pertumbuhan minimal menggunakan manitol.



### Enkapsulasi Eksplan

Eksplan yang digunakan ialah basal daun dan batang semu (*core*). Eksplan dienkapsulasi dengan natrium alginat (Na-alginat) 3% yang berisi media MS dengan penambahan BA (0, 1, 2, dan 3 mg/l) yang dikombinasikan dengan *naphthalene acetic acid* (NAA) pada konsentrasi 0, 1, 2, dan 3 mg/l. Proses enkapsulasi dilakukan dengan metode tetes ke dalam larutan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100 mM dan direndam selama 15 menit dengan penggojokan hingga membentuk gel atau kapsul. Setiap perlakuan diulang sebanyak dua kali (botol) dan setiap botol terdiri atas 10 kapsul. Kapsul-kapsul tersebut direndam dalam akuades steril dengan volume 25 ml. Inkubasi dilakukan pada suhu 25°C, fotoperiodisitas 16 jam terang dengan intensitas 800–1000 lux. Respons yang diamati ialah persentase biakan yang hidup dan persentase biakan yang menembus kapsul. Untuk memacu proses diferensiasi eksplan basal daun, maka pada tahap selanjutnya diterapkan pra-perlakuan menggunakan media MS yang mengandung BA 0,5 mg/l dan NAA 0,5 mg/l sebelum enkapsulasi menggunakan media yang mengandung BA dan NAA pada konsentrasi 0; 0,5; dan 1 mg/l.

### Pertumbuhan Minimal Menggunakan Paklobutrazol

Eksplan yang digunakan ialah tunas *in vitro* berukuran kecil (tinggi sekitar 2 cm). Beberapa daun tua dibuang dan disisakan daun muda sekitar 5 helai. Pucuk dan pangkal dipangkas sedemikian rupa sehingga diperoleh eksplan dengan ukuran kurang dari 0,5 cm. Percobaan disusun secara faktorial dalam lingkungan rancangan acak lengkap. Faktor pertama ialah konsentrasi paklobutrazol (0, 1, 2, dan 3 mg/l) Roostika & Sunarlim (2001) dan Roostika *et al.* (2009). Faktor kedua ialah suhu penyimpanan 25 °C dalam ruang kultur dan suhu 15°C dalam *growth chamber*. Setiap perlakuan diulang sebanyak empat kali (botol) dan setiap botol terdiri atas 10 kapsul. Eksplan dienkapsulasi dengan Na-alginat 3% yang berisi media MS dengan penambahan BA 1 mg/l dan *indole butyric acid* (IBA) 0,5 mg/l dengan penambahan *1-[4-chlorophenyl]-4,4-dimethyl-2-[1,2,4-triazol-1-yl] pentan-3-ol* (paklobutrazol). Proses enkapsulasi dilakukan dengan metode tetes ke dalam larutan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100 mM dan direndam selama 15 menit dengan penggojokan hingga membentuk kapsul. Inkubasi pada suhu 15°C dilakukan di dalam *growth chamber* dan inkubasi pada suhu 25°C dilakukan di ruang kultur dengan fotoperiodisitas 16 jam terang dengan intensitas 800–1000 lux. Respons yang

diamati ialah persentase daya hidup, persentase daya regenerasi, dan persentase biakan yang menembus kapsul. Biakan yang masih bertahan hidup kemudian dipindah ke media MS padat yang mengandung BA 0,5 mg/l dan Kn 1 mg/l untuk pemulihan dan regenerasi, kemudian diamati persentase biakan yang hidup dan persentase biakan yang beregenerasi, jumlah tunas, dan jumlah daun.

### Pertumbuhan Minimal Menggunakan Manitol

Eksplan yang digunakan ialah embrio somatik prematur. Induksi kalus dilakukan menggunakan eksplan berupa basal daun dan media yang mengandung *4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid* (pikloram) pada konsentrasi 21 µM dengan penambahan *thidiazuron* (TDZ) 9 µM. Inkubasi dilakukan pada suhu 25°C dalam keadaan gelap selama 3 minggu. Setelah itu, daun diisolasi dan dipotong pada bagian basalnya. Selanjutnya eksplan ditanam pada media yang sama dan diinkubasi pada kondisi gelap. Kalus disubkultur pada media *Bac* yang diperkaya dengan senyawa N-organik (glutamin 1 mg/l, kasein hidrolisat 500 mg/l, arginin 120 mg/l, dan glisin 2 mg/l) dan diinkubasi pada kondisi terang (800–1000 lux) selama 16 jam. Kalus embriogenik dipindahkan ke media MS dengan Kn 1 mg/l. Embrio somatik yang belum membuka daunnya (kurang dari 0,5 cm) digunakan sebagai eksplan untuk dienkapsulasi.

Percobaan disusun secara faktorial dalam lingkungan rancangan acak lengkap. Faktor pertama ialah konsentrasi manitol (0, 1, 2, 3, 4, dan 5%), sedangkan faktor kedua ialah suhu penyimpanan (15 dan 25°C). Setiap perlakuan diulang sebanyak empat kali (botol) dan setiap botol terdiri atas 10 kapsul. Eksplan dienkapsulasi dengan Na-alginat 3% yang berisi media MS yang mengandung BA 1 mg/l dan IBA 0,5 mg/l dengan penambahan manitol. Proses enkapsulasi dilakukan dengan metode tetes ke dalam larutan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100 mM dan direndam selama 15 menit dengan penggojokan hingga membentuk kapsul. Inkubasi pada suhu 15°C dilakukan di dalam *growth chamber* dan inkubasi pada suhu 25°C dilakukan di ruang kultur dengan fotoperiodisitas 16 jam terang dengan intensitas 800–1000 lux. Respons yang diamati ialah persentase daya hidup, persentase daya regenerasi, dan persentase biakan yang menembus kapsul. Biakan yang masih bertahan hidup kemudian dipindah ke media MS padat yang mengandung BA 0,5 mg/l dan Kn 1 mg/l untuk pemulihan dan regenerasi. Respons yang diamati ialah persentase biakan yang hidup dan biakan yang menembus kapsul serta jumlah tunas dan jumlah daun.



## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Enkapsulasi Eksplan

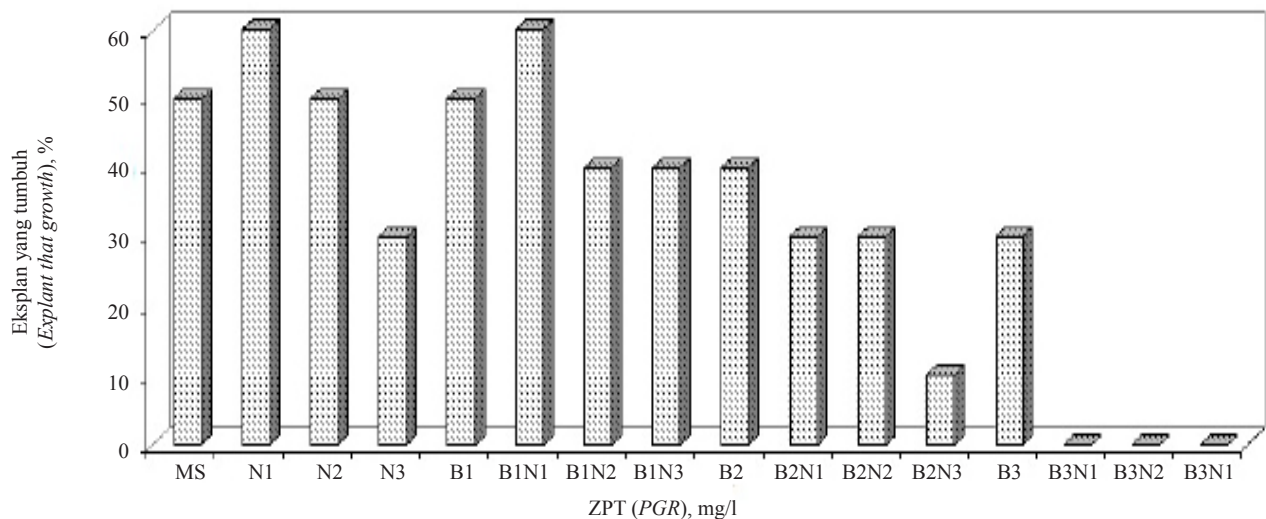
Berdasarkan hasil percobaan sebelumnya diketahui bahwa basal daun nenas memberikan respons yang baik pada media padat dan cair. Pada tahap ini dapat diketahui apakah respons yang sama juga diperoleh ketika eksplan dienkapsulasi dengan kapsul alginat untuk pembentukan benih sintetik dan penyimpanannya secara pertumbuhan minimal. Oleh karena itu, digunakan eksplan berupa basal daun dan sebagai pembandingnya digunakan batang semu.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa basal daun tidak menunjukkan respons pertumbuhan walaupun kapsul alginat mengandung sitokinin dan auksin. Setelah 1 bulan, semua eksplan basal daun mengalami pencoklatan. Sebaliknya, batang semu mampu beregenerasi membentuk tunas dengan persentase mencapai 60% (Gambar 1 dan 2). Diduga eksplan basal daun mengalami hambatan dalam proses respirasi atau sel-sel meristematis pada area basal daun tersebut menerima tekanan mekanis yang cukup kuat dalam kapsul alginat sehingga tidak mampu bertahan hidup dan tumbuh lebih lanjut, hingga akhirnya mati. Sebaliknya, batang semu mempunyai kemampuan tumbuh yang lebih baik karena mengandung mata tunas aksilar yang secara struktural lebih terorganisir dibandingkan dengan sel-sel meristematis pada area basal daun. Namun demikian, tunas-tunas yang tumbuh

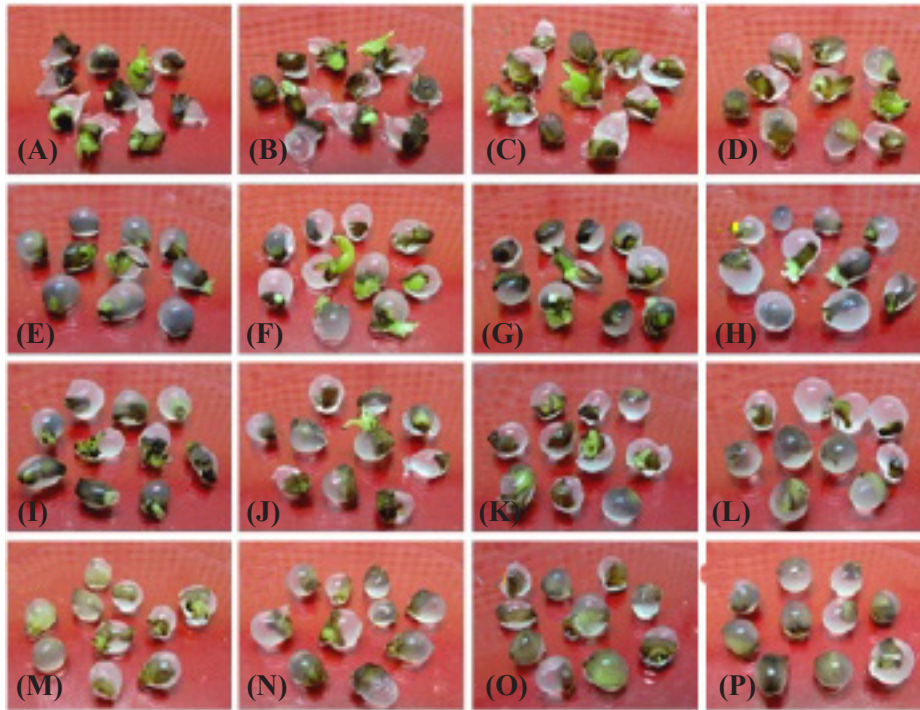
dari batang semu tersebut terlalu cepat menembus kapsul (dalam waktu 1 bulan), sehingga eksplan ini kurang ideal digunakan dalam pembentukan benih sintetik karena periode simpannya sangat singkat. Selain itu, jumlah batang semu lebih terbatas, sehingga memerlukan bahan tanaman induk yang lebih banyak.

Untuk menginduksi diferensiasi sel-sel pada area basal daun, perlu adanya praperlakuan basal daun sebelum enkapsulasi untuk memberi peluang bagi sel-sel di daerah basal mengalami diferensiasi. Oleh karena itu, dilakukan praperlakuan basal daun menggunakan media terbaik untuk menginduksi pembentukan nodul berdasarkan hasil penelitian pada tahap sebelumnya. Pada tahap ini, pembentukan nodul lebih dikehendaki daripada pembentukan tunas supaya biakan tidak terlalu cepat menembus kapsul karena penelitian ini diarahkan untuk konservasi *in vitro*.

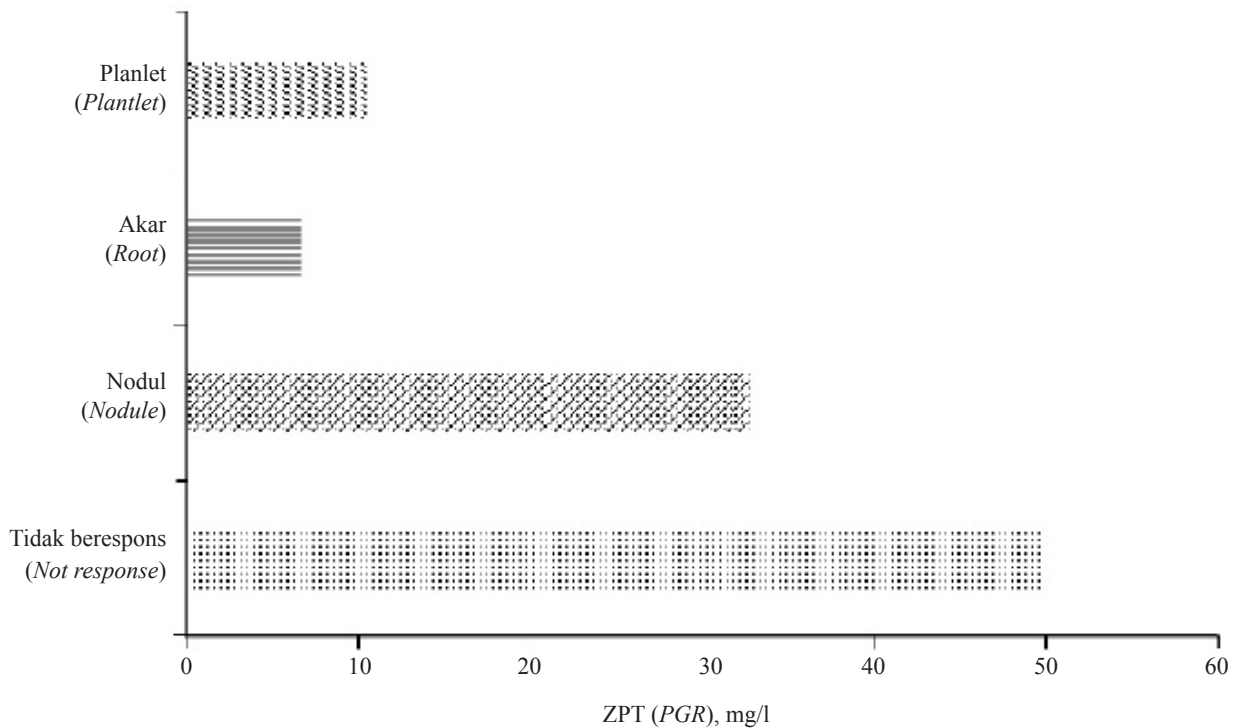
Hasil praperlakuan terhadap 650 helai basal daun menunjukkan bahwa lebih dari 50% eksplan memberikan respons dan didominasi dengan pembentukan nodul lebih dari 30% (Gambar 3). Basal yang mengandung nodul tersebut kemudian digunakan dalam enkapsulasi karena lebih ideal daripada basal daun yang mengandung akar atau tunas. Hasil enkapsulasi basal daun yang mengandung nodul tersebut menunjukkan bahwa eksplan memiliki respons yang rendah, di mana akar lebih mudah terbentuk daripada tunas dengan persentase masing-masing sebesar 30 dan 5% (Gambar 4). Selain



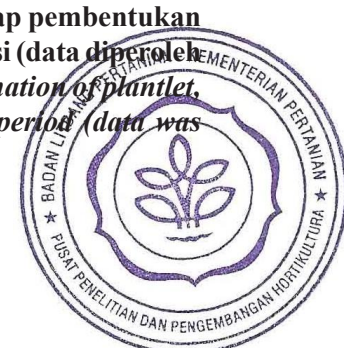
**Gambar 1.** Pengaruh BA dan NAA terhadap pertumbuhan eksplan batang semu nenas kultivar Smooth Cayenne yang terenkapsulasi, 1 bulan masa inkubasi (*Effect of BA and NAA to the growth of encapsulated core explants of pineapple cultivar Smooth Cayenne, 1 month incubation period*) MS = tanpa ZPT (*without plant growth regulator*) (PGR), N1 = NAA 1 mg/l, N2 = NAA 2 mg/l, N3 = NAA 3 mg/l, B1 = BA 1 mg/l, B1N1 = BA 1 mg/l + NAA 1 mg/l, B1N2 = BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l, B1N3 = BA 1 mg/l + NAA 3 mg/l, B2 = BA 2 mg/l, B2N1 = BA 2 mg/l + NAA 1 mg/l, B2N2 = BA 2 mg/l + NAA 2 mg/l, B2N3 = BA 2 mg/l + NAA 3 mg/l, B3 = BA 3 mg/l, B3N1 = BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l, B3N2 = BA 3 mg/l + NAA 2 mg/l, dan B3N3 = BA 3 mg/l + NAA 3 mg/l.

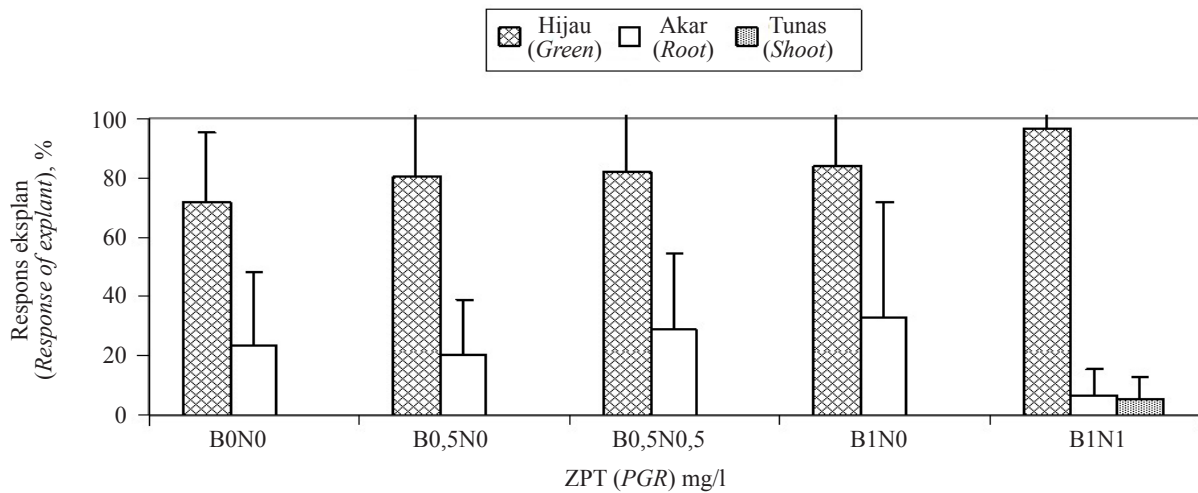


**Gambar 2. Keragaan eksplan batang semu nenas kultivar Smooth Cayenne yang terenkapsulasi (1 bulan masa inkubasi) (*Performance of encapsulated core explants of pineapple cultivar Smooth Cayenne, 1 month incubation period*):** (A) kontrol (*check*), (B) NAA 1 mg/l, (C) NAA 2 mg/l, (D) NAA 3 mg/l, (E) BA 1 mg/l, (F) BA 1 mg/l + NAA 1 mg/l, (G) BA 1 mg/l + NAA 2 mg/l, (H) BA 1 mg/l + NAA 3 mg/l, (I) BA 2 mg/l, (J) BA 2 mg/l + NAA 1 mg/l, (K) BA 2 mg/l + NAA 2 mg/l, (L) BA 2 mg/l + NAA 3 mg/l, (M) BA 3 mg/l, (N) BA 3 mg/l + NAA 1 mg/l, (O) BA 3 mg/l + NAA 2 mg/l, dan (P) BA 3 mg/l + NAA 3 mg/l



**Gambar 3. Pengaruh praperlakuan eksplan dengan BA 0,5 mg/l dan NAA 0,5 mg/l terhadap pembentukan planlet, akar, dan nodul nenas kultivar Smooth Cayenne, 2 bulan periode inkubasi (data diperoleh dari total 650 eksplan basal daun) (*Effect of pre-treatment of explants to the formation of plantlet, root, and nodule of pineapple cultivar Smooth Cayenne, 2 months incubation period (data was collected from totally 650 leaf base explants)*)**





**Gambar 4.** Pengaruh kombinasi BA dan NAA terhadap respons eksplan basal daun nenas kultivar Smooth Cayenne yang terenkapsulasi (*Effect of combination of BA and NAA to the response of leaf base explants of pineapple cultivar Smooth Cayenne*)

itu, warna daun eksplan memudar dan diikuti dengan menurunnya daya hidup, hingga mengalami kematian. Dengan demikian, disimpulkan bahwa eksplan basal daun yang mengandung nodul (hasil praperlakuan selama 2 bulan) masih belum layak digunakan dalam pembentukan benih sintetik melalui teknik enkapsulasi, sehingga perlu digunakan jenis eksplan lainnya, misalnya tunas.

#### Pertumbuhan Minimal Menggunakan Paklobutrazol

Setelah diketahui bahwa eksplan basal daun bernodul masih kurang sesuai untuk dienkapsulasi, maka pada tahap ini digunakan eksplan berupa tunas *in vitro* dengan ukuran kurang dari 0,5 cm. Hasil percobaan menunjukkan tidak terdapat interaksi yang nyata antara suhu inkubasi dengan konsentrasi paklobutrazol terhadap daya tembus eksplan pada umur simpan 1 bulan. Daya tembus eksplan pada umur simpan 1 bulan tersebut dipengaruhi secara nyata oleh faktor tunggal, yaitu konsentrasi paklobutrazol atau suhu penyimpanan (Tabel 1). Suhu penyimpanan tidak

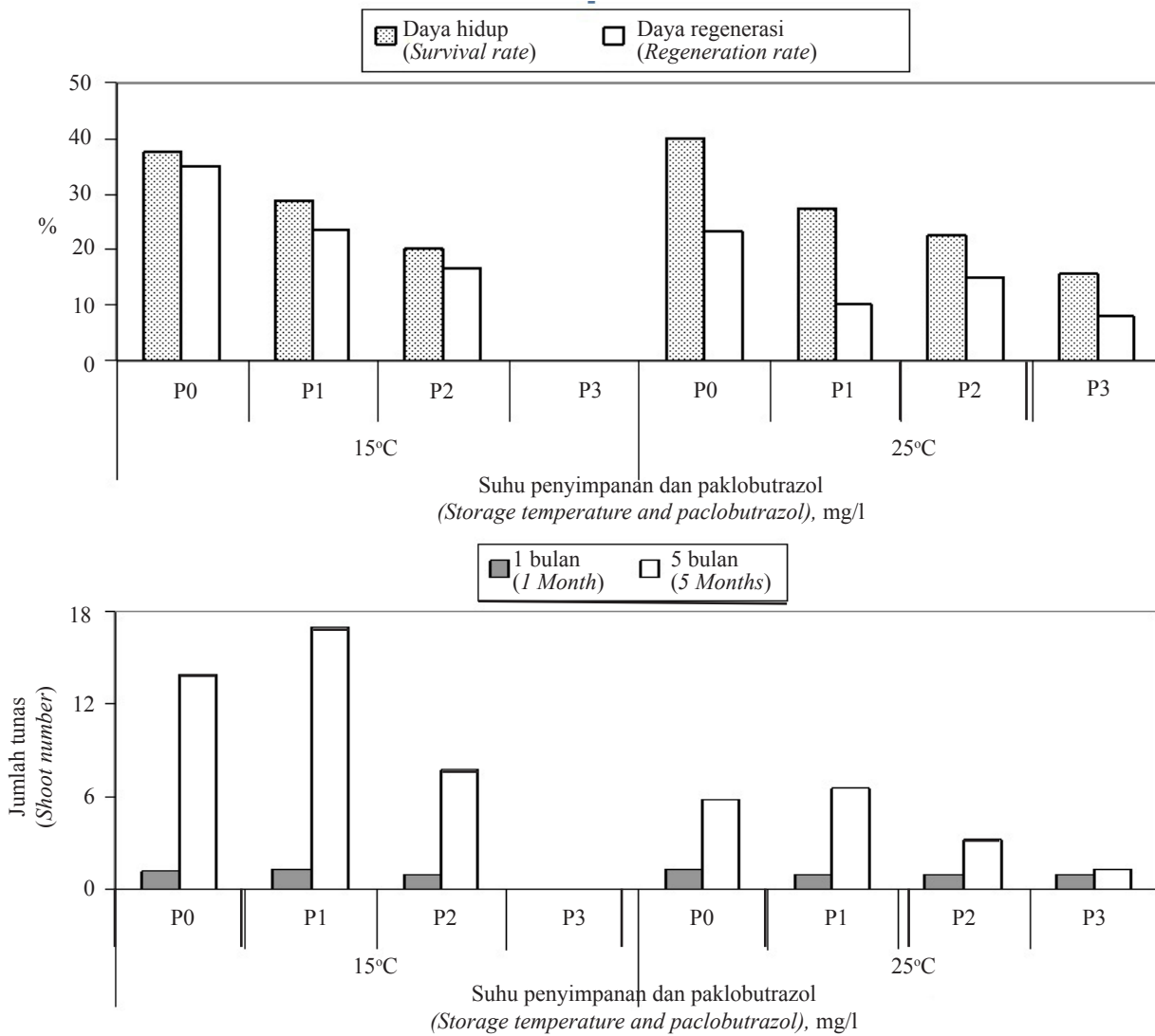
berpengaruh nyata terhadap daya hidup biakan, baik pada periode simpan 1 bulan maupun 3 bulan, namun berpengaruh nyata terhadap daya tembus biakan nenas pada periode 1 bulan simpan, sedangkan pada periode simpan berikutnya (3 bulan) tidak berpengaruh nyata (Gambar 5). Walaupun biakan dapat bertahan hidup hingga periode simpan 3 bulan, namun sebagian besar biakan menembus kapsul (Tabel 1), sehingga penyimpanan tidak layak untuk dilanjutkan. Biakan yang disimpan pada suhu rendah (15°C) mempunyai daya tembus yang lebih rendah (37%) daripada biakan yang disimpan pada suhu 25°C (63%). Menurut Taiz & Zeiger (2003), kecepatan respirasi menurun pada suhu rendah, begitu pula dengan proses sintesis dan konsumsi *adenosine triphosphate* (ATP), sehingga dalam kondisi demikian, maka pertumbuhan biakan juga terhambat.

Sebagaimana pengaruh suhu penyimpanan, paklobutrazol juga memberikan pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan biakan, hanya pada periode simpan 1 bulan. Dalam hal ini, pemberian paklobutrazol menghambat pertumbuhan biakan

**Tabel 1.** Pengaruh suhu penyimpanan dan paklobutrazol terhadap pertumbuhan biakan tunas nenas kultivar Smooth Cayenne yang terenkapsulasi (*Effect of temperature and paclobutrazol to the growth of encapsulated shoots of pineapple Smooth Cayenne cultivar*)

Perlakuan (Treatments)	Daya hidup (Survival rate), %		Daya tembus (Emergence rate), %	
	1 bulan (1 month)	3 bulan (3 months)	1 bulan (1 month)	3 bulan (3 months)
Suhu (Temperature), °C				
15	100 a	48 a	37 a	78 a
25	100 a	45 a	63 b	76 a
Paklobutrazol (Paclobutrazol), mg/l				
0	100 a	43 a	74 a	94 a
1	100 a	63 a	46 b	72 a
2	100 a	55 a	41 b	72 a
3	100 a	20 a	36 b	66 a





**Gambar 5.** Daya hidup, daya regenerasi, dan jumlah tunas nenas kultivar Smooth Cayenne pada tahap pemulihan pascapenyimpanan dengan paklobutrazol (*Survival rate, regeneration rate, and number of shoot of encapsulated shoots of pineapple cultivar Smooth Cayenne during recovery step after preservation by paclobutrazol*)

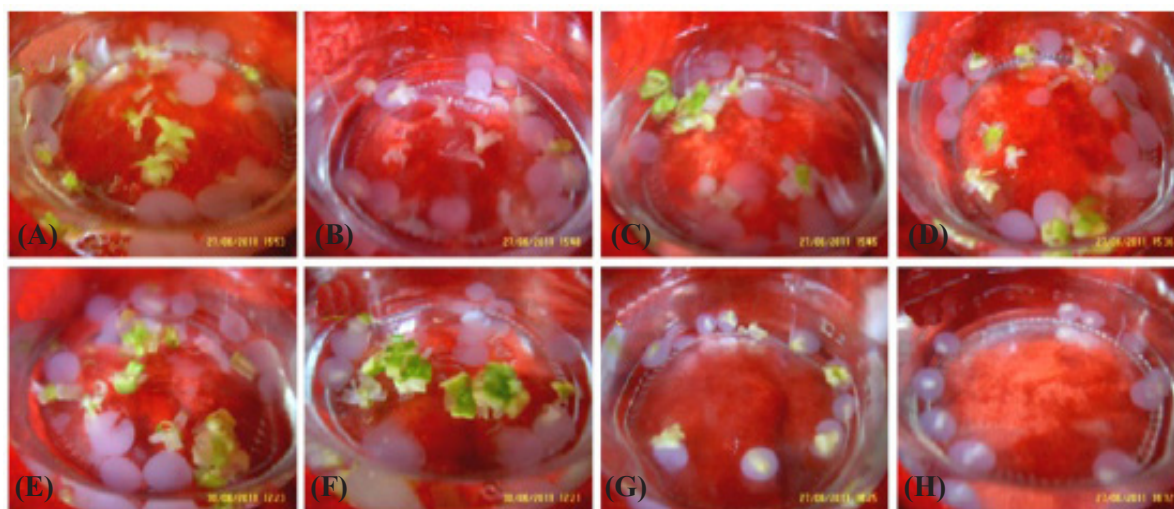
sehingga persentase biakan yang menembus kapsul lebih rendah daripada biakan yang ditumbuhkan pada media tanpa pemberian paklobutrazol. Menurut Arteca (1996), senyawa paklobutrazol merupakan retardan kelompok triazol yang mereduksi pertumbuhan biakan dengan cara menghambat oksidasi kauren, kaurenol, dan kaurenal yang dikatalisis oleh kauren oksidase pada biosintesis giberelin. Giberelin merupakan ZPT yang berpengaruh secara fisiologis pada pembentukan meristem subapikal, sehingga penghambatannya dapat menyebabkan tanaman menjadi roset.

Pada periode simpan berikutnya (3 bulan), paklobutrazol tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap daya tembus dan daya hidup biakan (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa pengaruh dari paklobutrazol tersebut berlangsung dalam waktu yang sangat singkat. Pengaruh retardan yang cukup lama

dapat teramati pada ubi jalar (Roostika & Sunarlim 2001, Sunarlim & Roostika 2003), gembili (Sunarlim *et al.* 2004), pule, pulasari, daun dewa (Lestari & Mariska 1997), serta purwoceng (Roostika *et al.* 2009) dengan ciri-ciri visual terbentuknya biakan roset atau pemendekan ruas, sehingga biakan dapat disimpan dalam waktu yang cukup lama (12-18 bulan). Walaupun demikian, tidak semua biakan memberikan ciri-ciri visual tersebut, seperti yang terjadi pada biakan kentang hitam (Roostika *et al.* 2005). Kurangnya efek penghambatan pertumbuhan biakan nenas kemungkinan disebabkan oleh rendahnya konsentrasi paklobutrazol atau jenis retardan yang digunakan dalam penelitian ini kurang sesuai.

Pada tahap pemulihan dan regenerasi pascapenyimpanan, daya hidup dan daya regenerasi biakan pada perlakuan suhu 25°C lebih tinggi daripada





**Gambar 6.** Keragaan tunas nenas kultivar Smooth Cayenne yang terenkapsulasi dalam media yang mengandung paklobutrazol dan disimpan pada suhu yang berbeda (*Performance of encapsulated shoots of pineapple cultivar Smooth Cayenne treated by paclobutrazol and temperature*): (A) kontrol (*check*) pada suhu 15 °C, (B) paklobutrazol 1 mg/l suhu 15 °C, (C) paklobutrazol 2 mg/l suhu 15 °C, (D) paklobutrazol 3 mg/l suhu 15 °C, (E) tanpa paklobutrazol suhu 25 °C, (F) paklobutrazol 1 mg/l suhu 25 °C, (G) paklobutrazol 2 mg/l suhu 25 °C, dan (H) paklobutrazol 3 mg/l suhu 25°C

biakan pada perlakuan suhu 15°C. Perlakuan tanpa paklobutrazol dan suhu 15°C menghasilkan daya regenerasi yang tertinggi setelah 1 bulan masa pemulihan (Gambar 5). Pada masa pemulihan 5 bulan, pertumbuhan biakan dari perlakuan suhu 15°C jauh lebih pesat daripada biakan yang berasal dari perlakuan suhu 25°C, di mana paklobutrazol 1 mg/l dan suhu 15°C menghasilkan jumlah tunas yang tertinggi (Gambar 5). Secara visual, biakan yang berasal dari perlakuan paklobutrazol lebih tegar daripada biakan yang tidak diberi perlakuan paklobutrazol (Gambar 6). Hal ini menunjukkan pengaruh positif dari paklobutrazol yang dapat memacu pertumbuhan biakan. Secara fisiologis, retardan dilaporkan dapat mendukung terbentuknya klorofil sehingga kultur tampak lebih tegar (Cathey 1975, Bessembinder *et al.* 1993). Arteca (1996) mengatakan bahwa selain memblokir biosintesis giberelin, paklobutrazol juga dapat mereduksi *abscisic acid* (ABA), etilen, dan *indole-3-acetic acid* (IAA), serta dapat meningkatkan kandungan sitokinin. Banyaknya klorofil yang terbentuk dapat meningkatkan efisiensi fotosintesis sehingga pertumbuhan kultur menjadi lebih tegar dan terpacu. Secara umum dapat dikatakan bahwa penggunaan paklobutrazol 1 mg/l merupakan perlakuan terbaik dibandingkan perlakuan lainnya. Perlakuan tersebut sebaiknya diaplikasikan untuk penyimpanan kapsul tunas nenas dalam jangka waktu yang pendek (1 bulan) atau untuk keperluan transportasi benih sintetik dalam jarak dekat.

#### Pertumbuhan Minimal dengan Manitol

Jika paklobutrazol menghambat pertumbuhan melalui pemblokiran biosintesis giberelin (Arteca 1996), manitol merupakan gula alkohol yang berdifusi di bagian ekstraseluler namun tidak dapat memasuki sel (Taiz & Zeiger 2003), sehingga berfungsi sebagai regulator osmotik. Penggunaan regulator osmotik terbukti dapat menyimpan biakan ubi jalar selama 10 bulan (Roostika *et al.* 2001), biakan kentang hitam selama 3 bulan (Roostika *et al.* 2005), biakan purwoceng selama 7 bulan (Roostika *et al.* 2008), dan biakan jeruk besar selama 5 bulan (Dewi *et al.* 2010).

Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat interaksi yang nyata antara suhu penyimpanan dengan konsentrasi manitol terhadap daya tembus biakan. Daya tembus biakan tersebut sangat rendah hingga akhir periode simpan (5 bulan). Hal ini menunjukkan bahwa manitol mampu menekan pertumbuhan embrio somatik nenas dalam kondisi terenkapsulasi dengan Na-alginat 3%. Data tersebut perlu didukung dengan data daya hidup biakan, sehingga dapat ditentukan perlakuan yang terbaik untuk penyimpanan (Tabel 2).

Hasil penelitian ini menunjukkan tidak terdapat interaksi yang nyata antara suhu penyimpanan dengan konsentrasi manitol terhadap daya hidup biakan. Dalam hal ini, pertumbuhan embrio somatik nenas yang terenkapsulasi dengan Na-alginat 3% dipengaruhi secara nyata oleh faktor tunggal yang dominan, yaitu suhu penyimpanan atau konsentrasi manitol. Pada periode



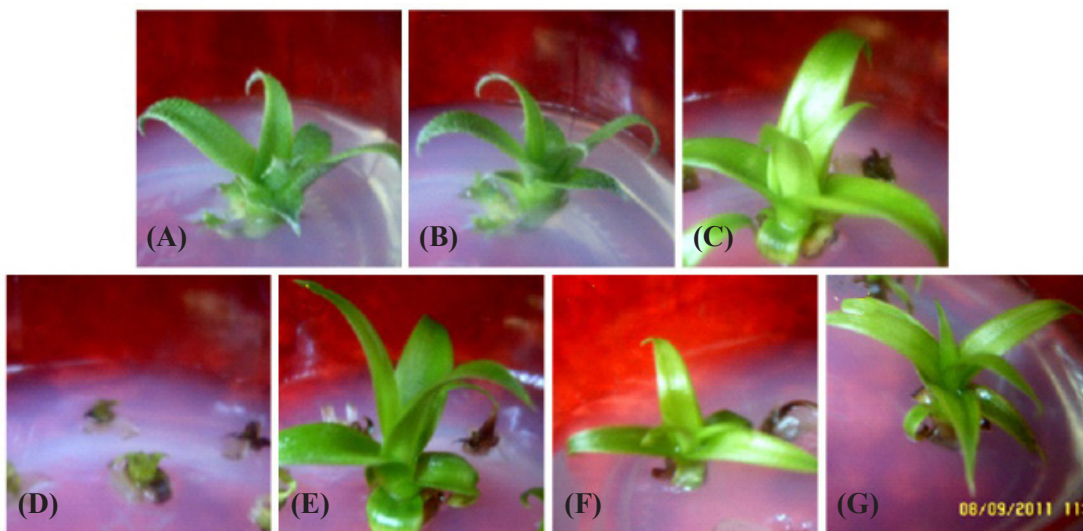


**Tabel 2. Pengaruh suhu penyimpanan dan manitol terhadap daya tembus biakan nenas kultivar Smooth Cayenne yang terenkapsulasi (Effect of temperature and mannitol to the emergence rate of encapsulated pineapple cultures cultivar Smooth Cayenne)**

Perlakuan (Treatments)	Daya tembus (Emergence rate), %				
	1 bulan (1 month)	2 bulan (2 months)	3 bulan (3 months)	4 bulan (4 months)	5 bulan (5 months)
Manitol, % (Mannitol)					
0	3	3	3	8	9
1	1	1	3	3	12
2	5	5	10	20	25
3	6	6	11	26	29
4	13	13	23	25	32
5	0	0	8	8	9
Suhu, °C (Temperature)					
15	0,6 a	0,6 a	4,3 a	6,9 a	10,6 a
25	7,7 b	7,7 b	13,7 a	19,8 a	25,1 b

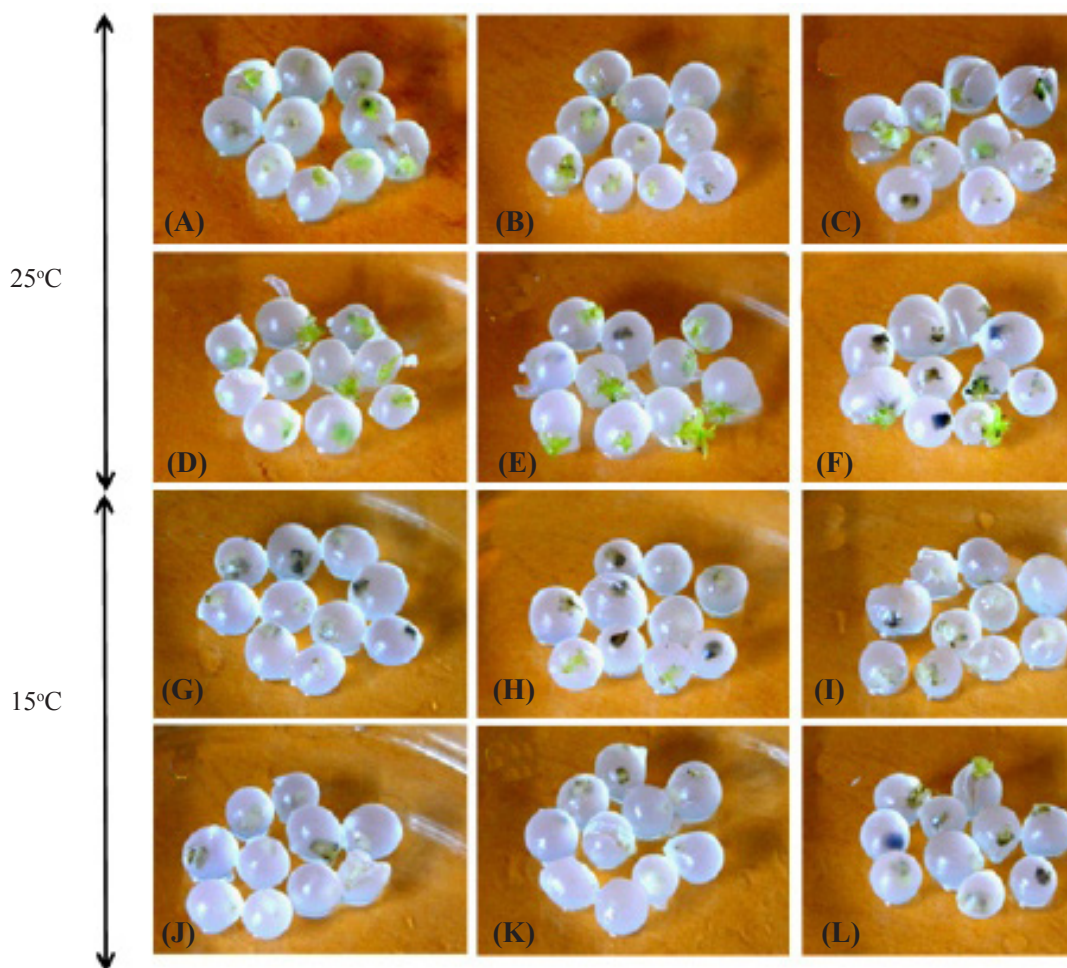
**Tabel 3. Pengaruh suhu penyimpanan dan manitol terhadap daya hidup biakan nenas kultivar Smooth Cayenne yang terenkapsulasi (Effect of temperature and mannitol to the survival rate of encapsulated pineapple cultures cultivar Smooth Cayenne)**

Perlakuan (Treatments)	Daya hidup (Survival rate), %				
	1 bulan (1 month)	2 bulan (2 months)	3 bulan (3 months)	4 bulan (4 months)	5 bulan (5 months)
Manitol, % (Mannitol)					
0	81 ab	79 a	59 a	54 a	22 a
1	72 a	57 a	56 a	48 a	8 a
2	92 b	79 a	78 a	51 a	17 a
3	91 b	80 a	66 a	40 a	14 a
4	87 b	80 a	72 a	53 a	33 a
5	72 a	64 a	43 a	18 a	8 a
Suhu, °C (Temperature)					
15	80 a	72 a	64 a	49 a	3 a
25	83 a	73 a	58 a	38 a	27 b



**Gambar 7. Penampilan tunas nenas kultivar Smooth Cayenne (1 bulan masa pemulihan) pascapenyimpanan dengan paklobutrazol (Performance of encapsulated shoots of pineapple cultivar Smooth Cayenne (1 month of recovery period) post-preservation with paclobutrazol): (A) kontrol suhu 15°C, (B) paklobutrazol 1 mg/l suhu 15°C, (C) paklobutrazol 2 mg/l suhu 15°C, (D) kontrol suhu 25°C, (E) paklobutrazol 1 mg/l suhu 25°C, (F) paklobutrazol 2 mg/l suhu 25°C, dan (G) paklobutrazol 3 mg/l suhu 25°C**





**Gambar 8.** Keragaan kapsul embrio somatik nenas kultivar Smooth Cayenne (4 bulan periode simpan) dari perlakuan manitol dan suhu penyimpanan (*Performance of encapsulated somatic embryos of pineapple cultivar Smooth Cayenne (4 months storage period) treated by mannitol and temperature*): (A dan G) manitol 0%, (B dan H) manitol 1%, (C dan I) manitol 2%, (D dan J) manitol 3%, (E dan K) manitol 4%, dan (F dan L) manitol 5%

simpan 1 bulan, konsentrasi manitol berpengaruh nyata terhadap daya hidup biakan. Konsentrasi manitol 2, 3, dan 4% justru meningkatkan daya hidup biakan, namun pengaruh tersebut tidak berbeda nyata dengan bertambahnya periode simpan hingga 5 bulan (Tabel 3). Dari tabel tersebut tampak bahwa daya hidup biakan menurun drastis dari periode simpan 4 bulan ke periode simpan 5 bulan. Manitol merupakan osmoregulator yang dapat meningkatkan tekanan osmotik media sehingga nutrisi mengalir secara perlahan ke dalam jaringan. Konsentrasi manitol yang sangat tinggi dapat menyebabkan tekanan osmotik yang sangat tinggi pula, sehingga menyebabkan seolah-olah nutrisi tidak tersedia dan memungkinkan terjadinya dehidrasi jaringan. Oleh karena itu, biakan yang disimpan dengan manitol pada konsentrasi yang tinggi tidak dapat bertahan hidup lebih lanjut. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa biakan nenas yang terenkapsulasi dengan Na-alginat 3% sebaiknya disimpan dengan manitol 4% tidak lebih dari 4 bulan.

Berbeda dengan pengaruh manitol, suhu penyimpanan memberikan pengaruh yang nyata hanya pada 5 bulan periode penyimpanan (Tabel 3), dengan daya hidup yang sangat rendah (3 dan 27%) yang ditandai dengan banyaknya biakan yang mencoklat (Gambar 7). Kecepatan respirasi menurun pada suhu rendah, begitu pula dengan proses sintesis ATP, sehingga dalam kondisi tersebut pertumbuhan biakan sangat terhambat dan berakibat pada kematian (Taiz & Zeiger 2003). Oleh karena itu, penyimpanan dengan penurunan suhu tidak disarankan untuk dilakukan. Selain daya hidup yang sangat rendah, penyimpanan dengan penurunan suhu memerlukan energi listrik dengan biaya yang lebih tinggi dibandingkan menggunakan manitol.

Penurunan suhu (2–10 °C) telah diterapkan pada beberapa macam tanaman, seperti kentang, bawang, dan mentha dengan periode simpan hingga 18 bulan (Keller *et al.* 2006). Namun demikian, pada penelitian ini penurunan suhu penyimpanan hingga

15°C tidak mampu mempertahankan daya hidup dan memperpanjang masa simpan biakan nenas. Sebaliknya penggunaan manitol lebih baik daripada penurunan suhu penyimpanan. Hasil penelitian ini lebih baik daripada hasil penelitian sebelumnya yang dilaporkan oleh Gangopadhyay *et al.* (2004) yang hanya mampu menyimpan kapsul nenas selama 1,5 bulan pada suhu 8°C.

## KESIMPULAN

1. Basal daun nenas yang terenkapsulasi mampu berdiferensiasi setelah diperlakukan.
2. Tidak terdapat interaksi yang nyata antara konsentrasi paklobutrazol dengan suhu penyimpanan terhadap daya hidup dan daya tembus kapsul tunas nenas. Biakan tersebut hanya dapat disimpan selama 1 bulan.
3. Tidak terdapat interaksi yang nyata antara konsentrasi manitol dan suhu penyimpanan terhadap daya hidup dan daya tembus kapsul embrio somatik nenas.
4. Penggunaan manitol 4% dapat memperpanjang masa simpan hingga 4 bulan. Penurunan suhu penyimpanan tidak disarankan karena terbukti tidak mampu memperpanjang masa simpan biakan nenas dan memerlukan energi listrik serta biaya yang lebih tinggi.

## PUSTAKA

1. Arteca, RN 1996, *Plant Growth Substances*, Chapman and Hall, New York.
2. Bessembinder, JJE, Staritsky, G & Zandvoort, EA 1993, 'Longterm *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions', *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, vol. 33, pp. 121-27.
3. Badan Pusat Statistik Republik Indonesia 2009, *Produksi buah-buahan di Indonesia*, Jakarta.
4. Coppens d'Eeckenbrugge, GBPS & Leal, F 2003, 'Morphology, anatomy, and taxonomy', in Bartholomew, DP, Paull, RE, Rohrbach, KE (eds.), *The pineapple botany: Production and Uses*, CABI Publishing, Wallingford, pp. 13-32.
5. Cathey, HM 1975, 'Comparative plant growth-retarding activities of ancymidol with ACPC, phosfon, chlormequat, and SADH on ornamental plant species', *HortSci.*, vol. 10, no. 3, pp. 204-15.
6. Desbrunais, AB, Noirot, M & Charrier, A 1992, 'Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.)', *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, vol. 31, pp. 105-10.
7. Dewi, IS, Jawak, G, Roostika, I, Sabda, M, Purwoko, BS & Adil WH 2010, 'Konservasi *in vitro* tanaman jeruk besar (*Citrus maxima* (Burn.) Merr.) kultivar Srinjanya menggunakan osmotikum dan retardan', *J. Agrobiogen*, vol. 6, no. 2, pp. 84-90.
8. Eeuwens, CJ, Lord, S, Donough, CR, Rao, V, Vallejo, G & Nelson, S 2002, 'Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of mantled flowering in clonally propagated oil palm', *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, vol.70, pp. 311-23.
9. Gangopadhyay, G, Bandyopadhyay, T, Poddar, R, Gangopadhyay, SB & Mukherjee, KK 2005, 'Encapsulation of micro shoots in alginate beads for temporary storage', *Curr. Res.*, vol. 88, no. 6, pp. 972-77.
10. Hu, CY & Wang, PJ 1983, 'Meristem, shoot tip, and bud culture', in Evans, DA, Sharp, WR, Amiroto, PV, Yamada, Y (eds.), *Handbook of plant cell culture Vol. I. Techniques for propagation and breeding*, McMillan Publishing, New York, pp. 177-227.
11. Keller, ERJ, Senula, A, Leunufna, S & Grube, M 2006, 'Slow growth storage and cryopreservation-tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections', *Int. J. Refr.*, vol. 29, pp. 411-17.
12. Lestari, EG & Mariska, I 1997, 'Kultur *in vitro* sebagai metode pelestarian tumbuhan obat langka', *Bul. Plasma Nutfah*, vol. 2, no. 1, hlm. 1-8.
13. Leunufna, S 2004, 'Improvement of the *in vitro*, maintenance and cryopreservation of yams (*Dioscorea* spp.)', Dissertation Martin-Luther-Universitat Halle-Wittenberg, Berlin.
14. Mariska, I, Suwarno & Damardjati, DS 1996, 'Pengembangan konservasi *in vitro* sebagai salah satu bentuk pelestarian plasma nutfah di dalam bank gen', *Seminar Penyusunan Konsep Pelestarian Ex Situ Plasma Nutfah Pertanian*, Bogor, 18 Desember.
15. Rai, MK, Asthana P, Singh ,SK, Jaiswal, VS & Jaiswal, U 2009, 'The encapsulation technology in fruit plants –A review', *Biotech Adv.*, vol. 27, pp. 671-79.
16. Redenbaugh, K 1992, *Synseeds: Application of synthetic seeds to crop improvement*, CRC Press, London, pp. 481.
17. Roostika, I & Sunarlim, N 2001, 'Penyimpanan *in vitro* tunas ubi jalar dengan penggunaan paklobutrazol dan ancymidol', *J. Penel. Pertanian*, vol. 20, no. 3, pp. 48-56.
18. Roostika, I, Sunarlim, N & Arief, VN 2005, 'Penyimpanan kentang hitam (*Coleus tuberosus*) secara kultur *in vitro*', *J.Hort.*, vol. 15, no. 1, pp. 46-52.
19. Roostika, I, Purnamaningsih, R & Arief, VN 2008, 'Pengaruh sumber karbon dan kondisi inkubasi terhadap pertumbuhan kultur *in vitro* purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.)', *AgroBiogen*, vol. 4, no. 2, pp. 65-9.
20. Roostika, I & Purnamaningsih, R & Darwati, I 2009, 'Penyimpanan *in vitro* tanaman purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) melalui aplikasi pengenceran media dan paklobutrazol', *J. Littri*, vol. 15, no. 2, pp. 84-90.
21. Suminar, E 2010, 'Induksi keragaman genetik dengan mutagen sinar gamma pada nenas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) secara *in vitro*', Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
22. Sunarlim, N, Roostika I & Arief VN 2004, 'Penyimpanan *in vitro* gembili melalui pertumbuhan minimal', *Prosiding Seminar Kinerja Penelitian Mendukung Agribisnis Kacang-kacangan dan Umbi-umbian*, BALITKABI, Malang, hlm. 267-75.
23. Sunarlim, N & Roostika I 2003, 'Penggunaan zat penghambat tumbuh dan regulator osmotik manitol dalam penyimpanan ubi-ubian secara kultur jaringan', *Prosiding Seminar Teknologi Inovatif Agribisnis Kacang-kacangan dan Umbi-umbian untuk Mendukung Ketahanan Pangan*, BALITKABI, Malang, hlm. 83-91
24. Taiz, L & Zeiger E 2003, *Plant physiology*-on line 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates. doi:10.1093/aob/mcg079.
25. Withers, LA 1985, 'Cryopreservation and storage of germplasm', in Dixon, DA (ed.) *Plant Cell Culture*, IRL Press, Washington, pp. 169-90.

