

Pengaruh Bahan Sterilan terhadap Keberhasilan Inisiasi Eksplan *Paulownia* (*Paulownia elongata* SY Hu) secara *In Vitro*

*The Effect of Sterilant Material on the Success of Initiation *Paulownia* Explant (*Paulownia elongata* SY Hu) by *In Vitro**

Arum Sekar Wulandaridan Sabar Sampulan Nasution

Departemen Silviculture, Fakultas Kehutanan IPB

ABSTRACT

The availability of minimal seed requires alternative reproduction system of paulownia. *In vitro* culture is used as one of the solutions in the reproduction of paulownia. *In vitro* cultural contamination is the main problem in the initiation phase. This research studies about the influence of sterilization treatment to the percentage of contamination, browning, and induction of paulownia bud. Sterilization techniques give the same effect against the percentage of contamination, browning, and induction of paulownia bud. The sterilization technique used in the study consisted of four treatment such as A (fungicide 0.2 g/L, bactericidal 0.2 g/L, NaOCl 20%, 15%, 10%), B (fungicide 2 g/L, bactericidal 2 g/L, NaOCl 15%, 10%, 5%), C (fungicide 0.2 g/L, bactericidal 0.2 g/L, detergent 20%, 15%, 10%), dan D (fungicide 2 g/L, bactericidal 2 g/L. Contamination that happened 93.96 % caused by bacteria and 11.5 % by fungi. Eksplan that is free from contamination and browning show the development of the aksilar. There is the development of a callus on some eksplan because the rates of hormone endogenous which is quite high. It strengthened by 100% the formation of callus on the stage multiplication by the addition of regulator substance growing auksin in small quantities.

Keywords: axillary bud, browning, contamination, paulownia, sterilization

PENDAHULUAN

Sepanjang tahun 2011 tercatat jumlah lahan kritis di Indonesia sebesar 27.294.842 ha (Dirjen DAS dan Pengelolaan Sosial). Dalam upaya pemulihan lahan kritis diperlukan pemilihan tanaman yang tepat agar waktu yang dibutuhkan untuk penghijauan kembali relatif lebih singkat dan memberikan hasil bagi masyarakat. Jenis tanaman *fast growing species* menjadi pilihan dalam pemulihan kembali lahan-lahan yang kritis, salah satunya adalah paulownia.

Paulownia merupakan tanaman yang memiliki pertumbuhan yang cepat dan mampu hidup pada lahan-lahan kritis serta memiliki karakteristik kayu yang baik sehingga sangat potensial dalam mendukung pemenuhan kebutuhan industri perkayuan seperti *vener*, *playwood*, furnitur, dan kertas. Paulownia dapat diperbanyak secara generatif dan vegetatif. Perbanyak paulownia secara generatif sulit diterapkan karena sulitnya memperoleh benih mengingat paulownia berasal dari Cina.

Perbanyak tanaman melalui kultur jaringan dapat menghasilkan tanaman dalam jumlah besar yang berasal dari satu tanaman induk. Selain itu dengan teknik tersebut dapat dihasilkan tanaman yang bebas dari penyakit dan memiliki sifat genetik yang sama dengan induknya. Oleh karena itu penelitian tentang Pengaruh Bahan

Sterilan Terhadap Keberhasilan Inisiasi Eksplan *Paulownia* (*Paulownia elongata* SY Hu) Secara *In Vitro* perlu dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh teknik sterilisasi pada inisiasi eksplan paulownia terhadap persentase kontaminasi, *browning*, dan pertumbuhan pucuk eksplan paulownia melalui teknik *in vitro*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang teknik sterilisasi yang efektif (konsentrasi dan lamanya waktu perendaman) pada paulownia dalam mengatasi masalah kontaminasi dan *browning* yang sering terjadi saat mengisolasi bagian tanaman untuk menghasilkan tanaman yang steril. Selain itu dengan penelitian ini diharapkan dapat memberikan alternatif dalam memilih bahan sterilisasi yang tepat dan mudah didapat dalam melakukan perbanyak tanaman melalui teknik *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Silviculture, Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor (IPB). Penelitian dilaksanakan selama ± delapan bulan yaitu dari bulan Juni 2012 sampai dengan Januari 2013.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan tanam (eksplan) dari bibit paulownia, media tanam Murashige dan Skoog (MS), gula, zat pengatur tumbuh NAA dan BA, serta bahan-bahan sterilan berupa deterjen, fungisida (bahan aktif: mankozeb 80%), bakterisida (bahan aktif: streptomisin sulfat 20%), NaOCl 20%, 15%, 10%, 5%, deterjen 20%, 15%, 10%, 5%, alkohol 70%, alkohol 95%, antiseptik (bahan aktif: mundidone), dan air steril.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain botol kultur, gelas piala, labu enlenmeyer, labu ukur, cawan petri, pipet, pipet bulb, sendok takar, spatula, gunting, pinset, *skalpel*, lampu bunsen, timer, sprayer, kertas lakmus, tissue, plastik, karet gelang, sarung tangan, timbangan analitik, *magnetik stirer*, oven, otoklaf, *laminar air flow*, dan ruang kultur serta alat-alat lainnya yang biasa digunakan dalam kegiatan *in vitro*.

Prosedur Kerja

Penyiapan Alat dan Bahan Tanaman

Semua alat-alat yang dibutuhkan dalam proses kegiatan terlebih dahulu disterilisasi. Bahan tanaman yang berasal dari bibit yang diperbanyak secara generatif terlebih dahulu dipangkas untuk mendapatkan pucuk-pucuk muda dalam jumlah besar dan disemprot dengan fungisida dan bakterisida untuk meminimalkan sumber kontaminan yang berasal dari eksplan.

Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam kegiatan tersebut harus dalam keadaan steril. Alat-alat logam (pinset, gagang *scalpel*, gunting, dll), gelas (cawan petri, botol kultur, pipet, dll) dibungkus dengan kertas kemudian disterilisasi dengan otoklaf pada suhu 121 °C selama ± 60 menit. Pada saat penanaman alat yang digunakan disterilisasi dengan mencelupkannya ke dalam alkohol 70% dan membakarnya dengan bunsen. Alat-alat logam dan kaca (pipet dan cawan petri) setelah di sterilisasi selanjutnya disimpan di dalam oven dengan suhu 50 °C sampai alat-alat tersebut digunakan dan botol kultur disimpan di dalam rak inisiasi.

Sterilisasi Air

Air yang digunakan berasal dari air kemasan yang disterilisasi dengan otoklaf. Air dimasukkan ke dalam botol kultur sebanyak 1/3 volume botol. Mulut botol ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet gelang agar air tidak menguap.

Sterilisasi air dilakukan selama ±30 menit. Setelah selesai, air steril disimpan di dalam ruang inkubasi sampai digunakan dalam penanaman.

Pembuatan Media

Media yang digunakan adalah media MS (Murashige dan Skoog) lengkap yang telah ditambahkan vitamin, asam amino, sumber energi, dan pematid media. Media yang digunakan merupakan media kultur siap pakai berupa bubuk kering. Media dimasukkan ke dalam 500 mL air kemudian diaduk hingga rata. Sumber energi diperoleh dengan pemberian gula sebanyak 30 g/L yang dilarutkan dalam 200 mL air kemudian ditambahkan ke dalam larutan media dan pH diukur hingga berkisar 5.5–5.8 sebelum ditambahkan bahan pematid. Media dipanaskan di atas pemanas dengan magnetik stirer kemudian ditambahkan agar-agar sebanyak 8 g/L secara perlahan sambil diaduk. Kemudian ditambahkan air sampai tepat mencapai 1000 mL. Pemanasan media dilakukan sampai media mendidih. Selanjutnya media dituangkan ke dalam botol kultur dengan ketebalan media ± 1 cm, ditutup rapat dengan plastik dan diikat dengan karet gelang serta disterilisasi dengan otoklaf pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit.

Sterilisasi Lingkungan Kerja

Sebelum penanaman permukaan *laminar air flow* disterilisasi dengan menyalakan lampu ultraviolet selama ± 30 menit untuk membunuh kontaminan yang terdapat di permukaan meja kerja. Meja kerja disemprot terlebih dahulu dengan alkohol 70%, dibersihkan dengan tissue dan kemudian blower dinyalakan untuk meniupkan udara steril secara kontinu melewati tempat kerja. Tangan pekerja juga disterilkan dengan menyemprotkan alkohol 70% serta menggunakan jas laboratorium dan masker untuk menghindari kontaminan yang berasal dari pekerja.

Sterilisasi Eksplan

Eksplan yang diambil dari lapangan dimasukkan ke dalam wadah yang berisi air untuk menjaga kadar air eksplan. Kemudian dibersihkan di bawah air mengalir dengan menyikat bagian-bagian tanaman. Selanjutnya direndam dalam air yang telah diberi deterjen 2 g/100 mL dan dilanjutkan dengan perendaman eksplan di dalam 100 mL air yang telah ditambahkan deterjen secukupnya kemudian dibilas dengan air mengalir hingga bersih. Setelah itu ukuran eksplan diperkecil lagi dan direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida selama 30 menit serta dibilas hingga bersih di bawah air mengalir. Pada tahap akhir, sterilisasi dilakukan di dalam *laminar air flow* dengan perendaman eksplan ke dalam alkohol 70%, larutan NaOCl selama 20, 15, 10,

dan 5 menit), antiseptik, dan pembilasan dengan air steril.

Penanaman Eksplan

Eksplan yang telah disterilisasi diambil dengan menggunakan pinset yang telah dicelupkan ke dalam larutan alkohol dan ditanam pada media MS₀. Selanjutnya pada multiplikasi ekplan steril yang telah tumbuh di dalam media MS₀ dipindahkan ke dalam media MS yang telah ditambahkan zat pengatur tumbuh berupa NAA dan BA.

Pemeliharaan

Botol-botol kultur yang telah berisi eksplan dimasukkan ke dalam ruang inkubasi. Selanjutnya dilakukan pengamatan dan memisahkan botol-botol yang telah terkontaminasi.

Analisis Data

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor yang terdiri dari empat taraf perlakuan yaitu A (fungisida 0.2 g/L, bakterisida 0.2g/L, NaOCl 20%, 15%, 10%), B (fungisida 2 g/L, bakterisida 2 g/L, NaOCl 15%, 10%, 5%), C (fungisida 0.2 g/L, bakterisida 0.2 g/L, deterjen 20%, 15%, 10%), dan D (fungisida 2 g/L, bakterisida 2 g/L, deterjen 15%, 10%, 5%). Jumlah ulangan setiap perlakuan adalah empat kali ulangan dan terdiri dari sepuluh unit percobaan berupa botol kultur.

Persen kontaminasi

Perhitungan persen kontaminasi dihitung dengan cara:

$$\% \text{ Kontaminasi} = \frac{\sum \text{eksplan yang terkontaminasi}}{\text{jumlah seluruh eksplan}}$$

Persen Browning

Persentasi *browning* dihitung dengan cara:

$$\% \text{ Browning} = \frac{\sum \text{eksplan yang terjadi } \textit{browning}}{\text{jumlah seluruh eksplan}}$$

Persen Pembentukan Tunas

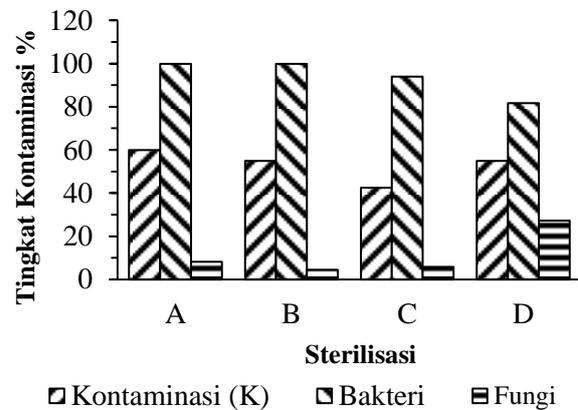
Persentasi pembentukan tunas dihitung dengan cara:

$$\% \text{ pembentukan tunas} = \frac{\sum \text{pembentukan tunas}}{\text{jumlah seluruh eksplan}}$$

Pengolahan data hasil pengamatan pada penelitian ini dibantu dengan menggunakan program SPSS 18 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat Kontaminasi

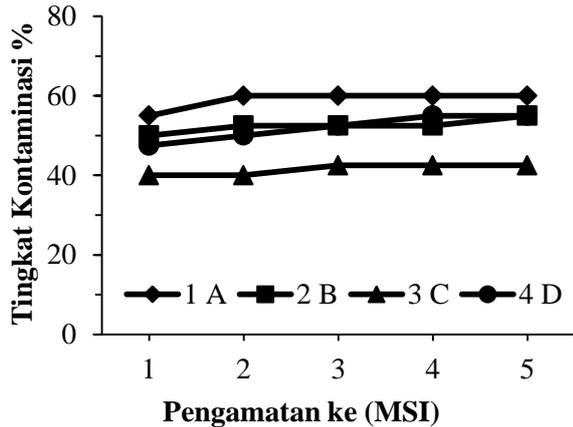


Gambar 1 Tingkat kontaminasi dan jenis kontaminan eksplan paulownia

Dari hasil analisis ragam diperoleh nilai F hitung sebesar 0.626 dan nilai Sig. 0.612 menunjukkan bahwa teknik sterilisasi dari keempat perlakuan tidak berbeda nyata terhadap tingkat kontaminasi pada eksplan paulownia karena nilai P > 0.05. Dengan demikian penggunaan keempat bahan sterilan memberikan pengaruh yang sama terhadap tingkat kontaminasi eksplan paulownia.

Dalam kultur *in vitro* kontaminasi merupakan masalah utama dalam tahap inisiasi pertama. Kontaminasi pada kultur eksplan paulownia tersebut disebabkan oleh mikroorganisme berupa bakteri dan fungi. Kontaminasi didominasi oleh bakteri dengan nilai 100% pada perlakuan A dan B, 94.1% pada perlakuan C, dan 81.8% pada perlakuan D, sedangkan fungi memberikan pengaruh yang relatif lebih kecil dengan masing-masing nilai 8.3% (A), 4.5% (B), 5.9% (C), dan 27.3% untuk perlakuan D. Dengan demikian tingkat kontaminasi yang terjadi pada eksplan paulownia, 93.96% disebabkan oleh bakteri dan 11.5% disebabkan oleh fungi.

Hasil pengamatan selama lima minggu setelah inokulasi menunjukkan kontaminasi yang terjadi berasal dari eksplan dan media kultur. Masing-masing kontaminan baik bakteri maupun fungi terdiri dari beberapa jenis, ada yang berwarna putih, merah, dan coklat kehitaman. Kontaminasi mulai terjadi pada minggu pertama pengamatan dan meningkat pada minggu kedua, sedangkan pada minggu berikutnya stabil (Gambar 2).



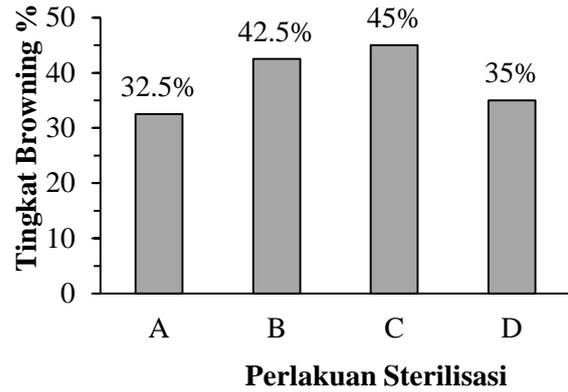
Gambar 2 Laju tingkat kontaminasi eksplan paulownia selama lima minggu setelah inokulasi

Dari hasil analisis ragam diperoleh nilai F hitung sebesar 0.430 dan nilai Sig. sebesar 0.735 menunjukkan teknik sterilisasi dari keempat perlakuan tidak berbeda nyata terhadap persentase *browning* pada eksplan paulownia karena nilai $P > 0.05$. Penggunaan bahan sterilan memberikan pengaruh yang sama terhadap persentase *browning* eksplan paulownia.

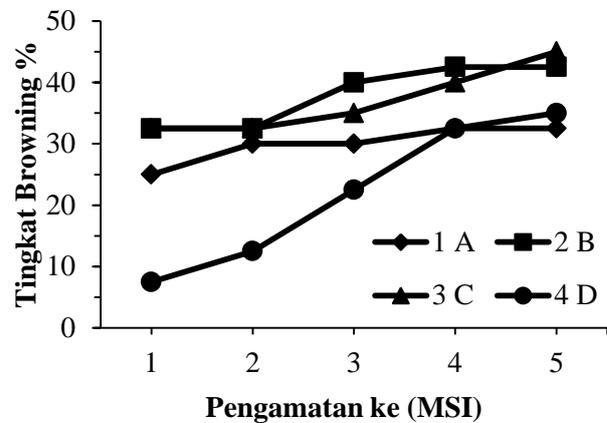
Gambar 3 menunjukkan persentase *browning* pada kultur eksplan paulownia selama lima minggu setelah inokulasi. Tingkat *browning* tertinggi terjadi pada perlakuan C 45%, kemudian diikuti oleh perlakuan B, D, dan A dengan masing-masing nilai sebesar 42.5%, 35%, dan 32.5%. *Browning* merupakan proses kemunduran fisiologi dari suatu eksplan yang sering dijumpai pada kultur *in vitro*. Dalam kultur *in vitro* sering dijumpai peristiwa *browning* yang pada akhirnya menghambat perkembangan dari suatu eksplan. Masalah *browning* pada kultur eksplan paulownia mulai terjadi pada minggu pertama setelah inokulasi dan terus meningkat sampai akhir pengamatan (Gambar 4).

Tingkat Persentase *Browning*

Penggunaan bahan sterilan selain menghambat perkembangan mikroorganisme kontaminan juga dapat menyebabkan eksplan mengalami *browning* terutama pada bahan tanaman yang relatif muda. Proses *browning* akan menghambat pertumbuhan eksplan dan menurunkan fungsi fisiologi dari eksplan hingga eksplan mengalami kematian (Gambar 5).



Gambar 3 Tingkat *browning* pada eksplan paulownia selama lima minggu setelah inokulasi



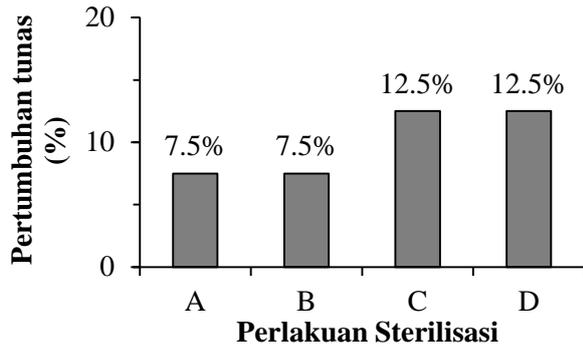
Gambar 4 Laju tingkat *browning* pada eksplan paulownia selama lima minggu setelah inokulasi



Gambar 5 Eksplan yang tumbuh normal (kiri) dan eksplan yang mati akibat proses *browning* (kanan)

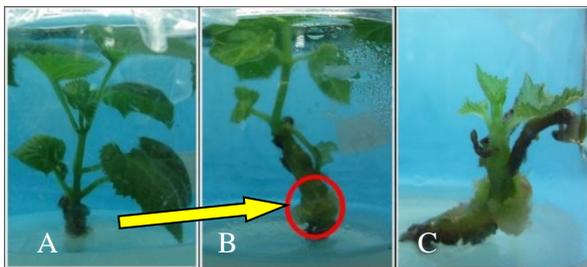
Persentase Pembentukan Tunas dan Multiplikasi Eksplan

Teknik sterilisasi dari keempat perlakuan juga memberikan pengaruh yang sama terhadap persentase pembentukan tunas. Dari analisis ragam dihasilkan nilai F hitung sebesar 0.235 dan Sig. 0.870 sehingga nilai $P > 0.05$ yang menunjukkan perlakuan yang diberikan tidak berbeda nyata terhadap persentase pembentukan pucuk.



Gambar 6 Persentase pertumbuhan tunas eksplan paulownia selama lima minggu setelah inokulasi

Persentase pembentukan tunas eksplan paulownia relatif kecil, hal ini sejalan dengan tingginya tingkat kontaminasi dan *browning* pada eksplan paulownia. Pola pertumbuhan eksplan paulownia sama pada semua perlakuan yaitu terbentuknya pucuk-pucuk aksilar pada eksplan yang bebas dari kontaminasi dan *browning*. Namun pada beberapa eksplan terdapat pertumbuhan tunas aksilar yang diikuti dengan pembentukan kalus pada bagian pangkal eksplan (Gambar 7).

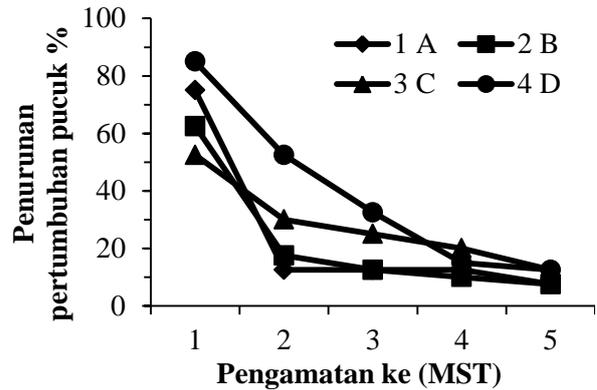


Gambar 7 Pertumbuhan tunas aksilar secara normal (A), pertumbuhan tunas yang diikuti dengan pertumbuhan kalus pada pangkal eksplan (B dan C)

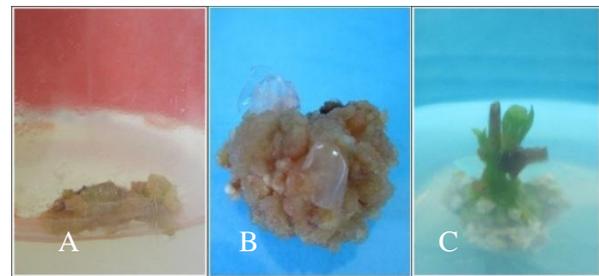
Terjadinya pembentukan kalus pada eksplan paulownia yang menggunakan media MS₀ atau tanpa penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) diduga karena eksplan paulownia memiliki kandungan hormon endogen yang tinggi dan cukup dominan ke arah pembentukan kalus, sehingga tanpa penambahan zat pengatur tumbuh eksplan mampu membentuk kalus. Eksplan paulownia telah membentuk tunas pada minggu pertama setelah inokulasi. Sekitar 68.75% eksplan paulownia mulai membentuk tunas pada minggu pertama dan jumlah eksplan yang hidup menurun pada minggu berikutnya akibat adanya kontaminasi dan *browning* pada eksplan (Gambar 8).

Pada tahap multiplikasi eksplan paulownia pemberian zat pengatur tumbuh NAA dan BA

mengarahkan ekspresi pertumbuhan eksplan kepada pembentukan kalus (Gambar 9).



Gambar 8 Laju penurunan persentase hidup eksplan paulownia selama lima minggu setelah inokulasi



Gambar 9 Kalus yang terbentuk dari eksplan potongan batang tanpa nodus (A), kalus yang mulai mengalami pencoklatan (B), kalus yang berpotensi untuk berorganogenesis (C)

Pada akhir pengamatan (4 MSI) ditemukan 100% eksplan membentuk kalus dari semua sumber eksplan baik ujung pucuk, potongan batang satu nodus, dan potongan batang tanpa nodus. Hal ini menunjukkan tingginya hormon endogen yang terdapat pada eksplan paulownia dan lebih dominan dalam pembelahan sel (pembentukan kalus).

KESIMPULAN

Semua perlakuan sterilisasi yang diterapkan menunjukkan pengaruh yang sama terhadap peubah yang diamati yaitu kontaminasi, *browning*, dan pertumbuhan pucuk aksilar. Kontaminasi yang terjadi didominasi oleh bakteri sebanyak 93.96% dan 11.5% disebabkan oleh fungi. Penggunaan bahan sterilan selain menghilangkan sumber kontaminan juga memberikan dampak terhadap terjadinya proses *browning* pada eksplan paulownia. Tingginya hormon endogen pada eksplan mendorong terbentuknya kalus pada tahap inisiasi pertama dan multiplikasi eksplan paulownia.

SARAN

Penelitian ini merupakan penelitian awal, sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menambahkan asam askorbat dan *polivinilpirolidon* (PVP) sebagai perlakuan untuk mengatasi masalah *browning*. Dalam tahap multiplikasi dapat ditambahkan ZPT dari golongan sitokinin tanpa penambahan auksin untuk menghindari terjadinya pembentukan kalus.

DAFTAR PUSTAKA

- El-Showk S, El-Showk N. 2003. The paulownia tree an alternative for sustainable forestry. The Farm [internet]. [diunduh 2012 September 5]. Tersedia pada: <http://www.cropdevelopment.org/docs/PaulowniaBooklet.pdf>.
- Gunawan I. 2007. Perlakuan sterilisasi eksplan anggrek kuping gajah (*Bulbophyllum beccarii* Rchb.f) [skripsi]. Bogor: Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor.
- Nuhaimi-Haris, Sumaryono, Carron MP. 2009. Pengaruh bahan pra-sterilan, tutup tabung kultur, dan musim terhadap tingkat kontaminasi eksplan pada kultur *microcutting* karet. *Menara Perkebunan* 77(2):89-99.
- Nurhaimi-Haris, NS Ayuningtias, IH Suparto. 2011. Pengaruh ventilasi terhadap morfologi, stomata, dan kadar klorofil tunas karet yang diperbanyak melalui *microcutting*. *Menara Perkebunan* 79(2):57-63.
- Zulkarnain. 2009. *Teknik Kultur Jaringan Solusi Perbanyakan Tanaman Budidaya*. Jakarta: PT Bumi Aksara.