

KEEFEKTIFAN BAHAN STERILISASI DALAM PENGENDALIAN KONTAMINASI PADA PERTUMBUHAN KULTUR ZYGOTIK SURIAN (*Toona sinensis* Roem)

(The Effectiveness Of Disinfectant In Controlling Contamination On Growth Of Zygotic Culture Of *Toona sinensis* Roem.

Oleh /By:
Yayat Hidayat

Abstract

*One of the major problems often occur on growth of zygotic culture is the contamination due to disinfectants. Therefore, it is important to use appropriate disinfectant to make zygotic culture. The purpose of this research was to study the effectiveness of disinfectant i.e. Clorox and HgCl₂, in controlling a contaminant on growth of zygotic culture of *Toona sinensis* Roem. This research consist of two stage i.e. firstly study on seed germination within in vitro technique, namely germination phase, and the secondary is study growth on subculture of zygotic culture, namely subculture phase. The result showed that disinfectant HgCl₂ 0,05% and Clorox 20%-30% produce highly germination value (63,3%) without contamination. Subculture technique increased callus from 33,3% at firstly subculture become to 100% at the secondary subculture. Also this technique reduced the percentage of contamination from 44,4% (firstly subculture) to 25% (secondary subculture).*

Keyword: *Toona sinensis*, zygotic culture, contamination

PENDAHULUAN

Surian (*Toona sinensis*) merupakan jenis pohon cepat tumbuh yang memiliki kilap dan warna kayu mirip dengan jati (*Tectona grandis*), sehingga jenis ini merupakan alternatif untuk substitusi kayu jati. Dibandingkan dengan jati, surian memiliki beberapa keunggulan antara lain: daunnya lebih pendek, kayunya lebih awet dan lebih ringan, sifat pengerjaannya lebih mudah dan berpotensi untuk biopestisida pencegah serangan boktor (Hidayat dan Kuvaini, 2005) serta bahan obat-obatan. Kayunya banyak digunakan untuk bahan bangunan, mebeulair, kotak cerutu, dan perkapalan. Kayu surian lebih tahan terhadap serangan penggerek batang dan juga cacing laut perusak kayu (*marine bor*), sehingga banyak digunakan untuk bahan pembuatan kapal laut.

Penyebaran surian sangat luas, antara lain meliputi negara China, Australia, Malaysia, Myanmar, Laos, Pakistan, Srilanka, Nepal dan Filipina. Tanaman ini diintroduksi dari Tionghoa (China) ke Indonesia yaitu ke daerah Padang (Sumatera Barat) dan Priangan (Jawa Barat), kemudian tersebar ke beberapa tempat antara lain: Pulau Sumatera, P. Jawa, Kalimantan Selatan, Kalimantan Timur dan Irian Jaya. Pohon surian dibawa dari Sumatera ke Jawa oleh Tesymann untuk ditanam oleh penduduk. Penanaman di Jawa pertamakali dilakukan pada tahun 1877 (Heyne, 1987). Menurut Wang *et al.* (2008) surian masuk ke daratan China dari arah timur perbatasan India dan Burma. Dengan demikian diduga jenis ini merupakan jenis asli India.

Teknik perbanyak surian dapat dikerjakan secara generatif ataupun vegetatif. Perbanyak secara generatif sangat mudah karena benihnya melimpah, berbuah setiap tahun serta daya kecambahnya tinggi. Kendala yang dihadapi adalah bahwa benih surian ini termasuk kedalam tipe benih semi recalsitran, sehingga tidak bisa disimpan dalam waktu yang cukup lama. Sedangkan perbanyak dengan vegetatif terutama pada stek batang, menemui kesulitan dalam penumbuhan akarnya. Namun demikian, berdasarkan penelitian Wiguna, (2005), stek surian yang berasal dari pemangkasan batang bibit umur 3 bulan, memiliki pertumbuhan akar lebih bagus dibandingkan dengan stek yang berasal dari cabang pohon tua.

Perbanyak secara vegetatif diperlukan apabila ingin memperoleh kondisi generasi baru (anakan) yang memiliki karakter yang sama seperti induknya, atau bermaksud menduplikasi pohon induk. Teknik vegetatif ini sangat cocok untuk tujuan konservasi plasma nutfah antara lain dalam rangka menduplikasi material genetik pohon induk yang telah diketahui memiliki karakter yang unggul (Zobel and Talbert, 1984). Teknik vegetatif yang bisa dikembangkan berkaitan dengan duplikasi material genetik adalah okulasi, stek dan kultur jaringan. Teknik kultur jaringan untuk tujuan perbanyak bibit surian hanya diperlukan apabila menginginkan kondisi bibit yang seragam dalam waktu yang cepat dan eksplananya berasal dari pohon elit (superior). Kultur jaringan surian bisa dilakukan antara lain melalui pendekatan kultur somatik atau kultur zigotik. Teknik kultur jaringan somatik telah banyak dilakukan antara lain pada tanaman manggis (*Garcia mangostana*) (Normah *et al.* 1990), *Prunus cerasus* (Tang and Krezal, 2000), alpukat (Witjaksono and Litz R, 1999) dan *Tectona grandis* (Arisyono, 2005).

Kultur jaringan merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian tanaman seperti sel, jaringan dan organ serta menumbuhkannya menjadi tanaman utuh dalam kondisi lingkungan yang aseptik (in vitro). Keberhasilannya sangat dipengaruhi oleh media yang digunakan, sumber eksplan, pemberian zat pengatur tumbuh, unsur hara makro dan mikro, bahan organik, karbohidrat, asam amino, vitamin, bahan pematid media dan kondisi bahan, peralatan dan ruangan yang steril (aseptik). Respon pertumbuhan planlet pada kultur jaringan juga tergantung pada jenis tanaman yang dikulturkannya. (George and Sherington, 1984; Struik 1991; Narayawamy, 1994)

Proses sterilisasi bahan eksplan merupakan kegiatan penting dalam kultur jaringan. Sterilisasi tersebut tidak hanya dilakukan terhadap bahan eksplan tetapi juga terhadap bahan dan peralatan, serta ruangan yang digunakan. Kegiatan sterilisasi bertujuan untuk mengeliminasi patogen atau cendawan yang mungkin terbawa saat pengambilan eksplan, yang dapat menimbulkan kontaminasi sehingga menghambat pertumbuhan eksplan menjadi tanaman utuh. Banyak bahan deinfektan yang dapat digunakan untuk sterilisasi media dalam kultur jaringan, diantaranya adalah HgCl₂ dan Clorox (Gunawan, 1992; Sugiyama, 1999).

Pemanfaatan teknik kultur jaringan dalam rangka menunjang program pemuliaan pohon surian, khususnya dalam upaya menduplikasi materi genetik dan rekaya genetik secara in vitro, diperlukan suatu penelitian kultur jaringan jenis surian. Sebagai tahap awal adalah penelitian mengenai teknik sterilisasi bahan eksplan kultur jaringan, menggunakan desinfektan HgCl₂ dan Clorox. Adapun bahan eksplan yang digunakan adalah benih surian.

Tujuan penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mencari bahan sterilisasi (desinfektan) yang cocok untuk mensterilisasi bahan eksplan (benih) pada fase perkecambahan dalam kultur zigotik surian, serta mengetahui pertumbuhan pada fase subkulturnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih surian yang diunduh dari tegekan benih terseleksi di KPHTI Unwim, dan media MS. Peralatan yang digunakan dalam pembuatan larutan media tanam adalah gelas piala, *hot plate magnetic stirrer*, kertas pH, timbangan elektrik, pipet ukuran 1-5 ml, gelas ukur 1000 ml, autoklaf gas, panci,

botol gelas ukuran 200 ml, plastik bahan dan karet gelang. Sedangkan peralatan yang digunakan dalam penanaman eksplan adalah; *laminar air flow*, *dissecting kit*, api bunsen, handsprayer dan karet masker.

Metode

Penelitian ini terdiri dari dua tahapan, yaitu (1) penelitian pengaruh teknik sterilisasi media terhadap pertumbuhan perkecambahan benih surian yang ditumbuhkan dalam media MS₀ secara invitro (kultur zigotik), dalam hal ini selanjutnya disebut **fase perkecambahan**, (2) penelitian pertumbuhan subkultur pertama dan kedua, dari planlet yang tumbuh sehat (hasil pertumbuhan kultur zigotik, pada tahap 1), yang selanjutnya disebut **fase pertumbuhan subkultur**. Pada pengamatan fase subkultur tidak ada hubungan langsung antara perlakuan sterilisasi eksplan dengan pertumbuhan subkulturnya, karena bahan/materi eksplan subkultur diambil dari organ tanaman (planlet) yang tumbuh sehat dari semua perlakuan teknik sterilisasi yang tercampur secara acak, dengan kata lain eksplan yang dipakai subkultur tidak diketahui lagi tipe perlakuan sterilisasinya. Adapun metode untuk masing-masing fase penelitian diuraikan sebagai berikut;

Metodologi Fase Perkecambahan

Penyiapan dan Seleksi benih

Benih diperoleh dari hasil pengunduhan (pemanenan) dari Tegakan Benih Terseleksi Surian di KPHTI Fakultas Kehutanan Unwim. Seleksi benih dilakukan secara visual yaitu dengan memilih benih yang berwarna coklat, padat, sehat dan tidak rusak. Benih tersebut dipisahkan dari bagian sayapnya, sebelum disemai.

Sterilisasi benih

Benih dicuci dengan *teepol* dan air, lalu diguncang (*shaker*) selama 10 menit. Selanjutnya benih ditiriskan dan disterilisasi menurut perlakuan, yang terdiri dari : (1) Kontrol (air steril), (2) Clorox 10%, (3) HgCl₂ 0,05%, (4) HgCl₂ 0,05%, Clorox 20%, Clorox 30%, (5) HgCl₂ 0,1%, Clorox 20%, Clorox 30% , (6) HgCl₂ 0,15%, Clorox 20%, Clorox 30%. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan, sterilisasi dengan Clorox 10% dan Clorox 20% tidak menunjukkan hasil yang berbeda, maka dalam penelitian ini, konsentrasi Clorox diambil yang 10%. Sterilisasi dengan HgCl₂ dilakukan dengan cara merendam benih selama 5 menit dan dilanjutkan dengan merendam dalam Clorox 20% selama 6 menit, kemudian merendam kembali dalam Clorox 30% selama 6 menit. Setelah selesai melakukan perendaman, benih dibilas dengan air steril (air keran). Selanjutnya barulah benih siap ditanam pada media tumbuh dalam botol kultur tipe 9, ukuran diameter ± 5 cm, tinggi 10 cm. Pada setiap botol ditanam 10 butir benih (*seed*) surian. Masing-masing perlakuan teknik sterilisasi diulang sebanyak 3 botol kultur. Alasan pemakaian HgCl₂ sebagai desinfektan, merujuk pada sterilisasi eksplan pada kultur jaringan jati yang menggunakan HgCl₂ 0,15% (Arisyono, 2005).

Sterilisasi peralatan

Alat-alat logam dan gelas disterilkan dengan otoklaf, sedangkan alat-alat tanam seperti pinset, gunting, skapel, disterilkan setiap akan dipakai dengan dicelupkan pada alkohol, pembakaran di atas bunsen, dan dicelupkan pada air steril. Alat-alat yang akan disterilkan dengan otoklaf dibungkus dengan aluminium foil, lalu disterilisasi pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 15 menit. *Laminar air flow cabinet* disterilisasi dengan cara menyalakan

lampu ultraviolet selama 30 menit, dan permukaan meja kerjanya disterilkan dengan alkohol 70%. Alat-alat yang akan dipakai kerja seperti sarung tangan, gunting dan pinset juga dibersihkan dengan alkohol 70%.

Media tanam eksplan surian

Media tanam yang dipakai adalah media MS (Murashige dan Skoog, 1965). *Micro* dan *Nafe Edta* dicampur satu per satu hingga tercampur dengan menggunakan *magnetic stirrer*, ditambah *Myo inosit*, thiamin 1 mg/ml, Cap 40 mg/ml, Ba 10 mg/ml, kinentin 10 mg/ml dan gula 30 gram serta air aquadest. Kondisi larutan dipertahankan mencapai pH 5,7 sampai 5,8. Apabila larutan tersebut terlalu asam, makaditambahkan KOH dan jika terlalu basa, maka ditambahkan HCL. Selanjutnya larutan tersebut ditambah 7 gram agar, lalu dimasak hingga mendidih. Larutan media kemudian dimasukkan ke dalam botol ditutup dengan plastik transparan. Sebelum media MS tersebut ditanami benih surian, terlebih dahulu diotoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 psi, selama 20 menit. Setelah dingin baru ditanami benih surian yang telah disterilisasi sebelumnya. Sebanyak 18 botol yang berisi eksplan benih surian, disimpan dalam ruang kultur dengan cahaya sekitar 2000 lux pada suhu ruangan 25°C – 26°C.

Parameter yang diamati

Pada fase perkecambahan, pengamatan dilakukan selama satu bulan. Adapun variabel yang diamatai pada tahap perkecambahan benih meliputi: (1) Persentase kecambah, (2) Persentase kontaminasi; dan (3) Persentase benih dorman. Persentase kecambah menunjukkan jumlah benih (eksplan) yang tumbuh (berkecambah), persentase kontaminasi menunjukkan benih (eksplan) yang terserang kontaminan (cendawan atau bakteri) sehingga eksplan tidak tumbuh (benih tidak berkecambah atau busuk) atau sempat berkecambah tetapi kemudian mati karena terserang cendawan atau bakteri, sedangkan persentase dorman menunjukkan benih yang tetap utuh (bernas) namun tidak mampu berkecambah sampai akhir pengamatan (selama 1 bulan). Rumus yang dipakai untuk menghitung variabel tersebut adalah sebagai berikut:

$$(1) \text{ Persentase kecambah (\%)} = \frac{\text{Jumlah eksplan (benih) tumbuh}}{\text{Jumlah eksplan (benih) yang ditanam}} \times 100\%$$

$$(2) \text{ Persentase kontaminasi (\%)} = \frac{\text{Jumlah eksplan (benih) terkontaminasi}}{\text{Jumlah eksplan (benih) yang ditanam}} \times 100\%$$

$$(3) \text{ Persentase benih dorman (\%)} = \frac{\text{Jumlah eksplan (benih) sehat tak berkecambah}}{\text{Jumlah eksplan (benih) yang ditanam}} \times 100\%$$

Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana dengan 6 perlakuan dan 3 ulangan. Model linear rancangan percobaan adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Dimana:

Y_{ijk} = nilai pengamatan pada satuan percobaan yang memperoleh teknik sterilisasi ke-i, ulangan ke-j

μ = nilai rata-rata umum

α_i = pengaruh perlakuan teknik sterilisasi ke-i

ε_{ij} = galat percobaan dari teknik sterilisasi ke-i, pada ulangan ke-j

i = 1,2,3,4,5,6

j = 1,2,3

Nilai hasil pengamatan (pengukuran) masing-masing variabel di buatkan sidik ragamnya (ANOVA) kemudian dianalisis dengan *software* statistik MINITAB versi 13.0. Karena nilai pengamatan dalam satuan persen, sebelum dianalisis sidik ragamnya, data tersebut ditransformasi ke Arc. Sin.

Metode Fase Pertumbuhan Subkultur

Penyiapan eksplan

Bahan eksplan yang dipakai untuk subkultur (perbanyak/multiplikasi) adalah berupa planlet (kecambah) yang tumbuh sehat, dari hasil percobaan fase perkecambahan, setelah berumur satu bulan (4 minggu). Kecambah yang sehat, telah memiliki batang lebih dari 2 ruas, berdaun dan berakar sehat diseleksi lalu dimasukkan ke dalam *laminar air flow*. Botol-botol tersebut dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70% pada bagian luarnya kemudian dimasukkan ke dalam *laminar air flow*.

Penyiapan media kultur

Media kultur yang dipakai untuk media tumbuh subkultur adalah media MS yang baru. Cara pembuatan media MS ini sama seperti pada Fase Perkecambahan (telah dijelaskan pada uraian sebelumnya). Media ini disiapkan di dalam botol kultur ukuran yang sama seperti sebelumnya dan diletakkan di dalam *laminar air flow*.

Sterilisasi peralatan

Sterilisasi peralatan terutama alat-alat yang akan dipakai untuk memotong planlet (pisau), pinset dan sarung tangan. Teknik sterilisasi alat sama seperti yang dilakukan pada fase perkecambahan (telah diuraikan sebelumnya). Alat-alat yang steril ini disiapkan di dalam *laminar air flow*.

Pembuatan subkultur I

Proses pembuatan subkultur I (pertama) dilakukan di dalam *laminar air flow*. Botol yang berisi planlet yang sehat dibuka tutupnya secara hati-hati, kemudian potong bagian radikulanya dengan pisau yang steril. Bagian batang (*shoot*) diambil kemudian dipotong sepanjang dua ruas (dua buku/node) dengan pisau steril lalu dipindahkan dan ditanam ke media MS baru dalam botol yang telah disiapkan sebelumnya. Botol tersebut kemudian ditutup kembali rapat-rapat lalu disimpan dalam ruang kultur dengan cahaya sekitar 2000 lux pada suhu ruangan 25°C – 26°C. Hasil subkultur pertama terdapat sebanyak 9 botol eksplan baru, tiap botol berisi satu eksplan.

Pembuatan subkultur II

Proses pembuatan subkultur II (kedua) sama seperti yang dilakukan pada subkultur pertama. Bahan eksplan subkultur kedua berasal dari planlet hasil subkultur pertama yang tumbuh sehat. Bagian batang (*shoot*) planlet dipotong sebanyak dua ruas dengan menggunakan alat yang steril, lalu ditanam pada media MS yang baru dalam botol. Botol yang digunakan berukuran sama seperti sebelumnya. Hasil subkultur kedua diperoleh sebanyak 20 botol eksplan baru, satu botol berisi satu eksplan. Botol tersebut kemudian disimpan dalam ruang kultur dengan cahaya sekitar 2000 lux pada suhu ruangan 25°C – 26°C.

Variabel yang diamati

Pengamatan variabel pada fase subkultur pertama dilakukan selama satu bulan (4 minggu), demikian pula untuk subkultur kedua, dilakukan selama satu bulan. Variabel yang diamati (diukur) adalah: (1) pertambahan tinggi tunas, (2) pembentukan kallus, (3) pertumbuhan akar, (4) jumlah ruas, dan (5) kejadian kontaminasi. Pertambahan tinggi tunas dihitung dari ujung atas pemotongan eksplan sampai pada ujung pertumbuhan kuncup yang baru tumbuh

dalam satuan cm. Pembentukan kallus ditentukan dengan melihat apakah telah terjadi pembentukan kallus pada eksplan tersebut. Pertumbuhan akar ditentukan dengan pengamatan munculnya akar pada setiap eksplan. Jumlah ruas ditentukan dari jumlah ruas (buku) yang muncul dari setiap eksplan. Kejadian kontaminasi dilakukan dengan mengamati terjadinya kontaminasi pada setiap eksplan.

Analisis Data

Berbeda dengan fase perkecambahan, pada fase pertumbuhan subkultur ini tidak menggunakan rancangan percobaan. Perlakuan subkultur (multiplikasi) sama pada setiap amatan (tidak ada ragam perlakuan). Oleh karena itu analisis data dilakukan secara deskriptif dengan cara membuat tabulasi data, menghitung nilai rata-rata dan mencari kecenderungannya dari setiap variabel yang diamati (diukur). Dengan demikian tidak ada hubungan langsung antara perlakuan teknik sterilisasi pada fase perkecambahan dengan variabel respon pada fase pertumbuhan subkultur. Pengamatan variabel pada fase subkultur lebih ditekankan untuk mengetahui bagaimana pertumbuhan pada proses multiplikasi (perbanyak) kultur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fase Perkecambahan Benih

Dari hasil pengamatan perkecambahan benih surian yang sebelumnya telah disterilisasi dengan 6 macam perlakuan sterilisasi, diperoleh data seperti pada **Tabel 1**. Dari hasil analisis keragaman (ANOVA) diketahui bahwa perlakuan sterilisasi berpengaruh sangat nyata terhadap prosentase kecambah benih surian, prosentase kontaminasi dan prosentase benih dorman. Secara umum data hasil pengamatan menunjukkan bahwa sterilisasi benih tanpa bahan kimia (perlakuan kontrol /A1) menghasilkan prosentase kontaminasi benih yang sangat tinggi hingga mencapai 100%, sedangkan dengan menggunakan HgCl₂ dan Clorox bertingkat (20%-30%) dapat menekan kontaminasi. Yang dimaksud Clorox bertingkat 20%-30% disini adalah perendaman dalam clorox 20% selama 6 menit, kemudian dilanjutkan dengan perendaman kembali dalam clorox 30% selama 6 menit pula. Meskipun secara statistik tidak signifikan, perlakuan HgCl₂ 0.05% dan Clorox bertingkat (20%-30%) menghasilkan prosentase kecambah paling tinggi (63,3%) serta tidak menimbulkan kontaminasi. Tidak adanya kontaminasi sangat penting dalam pertumbuhan kultur invitro, karena bahan dapat terus dimultiplikasi (diperbanyak) pada proses subkultur selanjutnya. Adanya kontaminasi akan menjadi faktor pemicu *browning* dan kematian pada eksplan atau planlet.

Tabel 1. Prosentase kecambah, kontaminasi dan benih dorman pada berbagai media sterilisasi

Perlakuan	Prosentase kecambah	Prosentase kontaminasi	Prosentase Benih dorman
	----- %-----		
Kontrol (A1)	0,0b	100,0a	0,0c
Clorox 10% (A2)	53,3a	36,6b	10,0bc
HgCl ₂ 0.05% (A3)	50,0a	6,7c	43,3a
HgCl ₂ 0.05% dan Clorox 20-30% (A4)	63,3a	0,0c	36,7a
HgCl ₂ 0.1% dan Clorox 20-30% (A5)	63,3a	6,7c	30,0a
HgCl ₂ 0.15% dan Clorox 20-30% (A6)	50,0a	3,3c	46,7a

Keterangan: nilai yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan bahwa perlakuan tersebut tidak berbeda nyata pada selang kepercayaan 95%

Kehadiran HgCl₂ diduga dapat meningkatkan prosentase benih dorman, sedangkan Clorox tidak begitu berpengaruh terhadap dormansi benih. Yang dimaksud benih dorman disini adalah benih utuh (bernas) yang tidak berkecambah sampai akhir pengamatan perkecambahan (4 minggu pengamatan). Benih yang terkontaminasi terlihat diselimuti cendawan berwarna putih kemudian membusuk. Air raksa (Hg) dalam dosis tinggi, merupakan unsur yang dapat menghambat pertumbuhan tanaman karena unsur ini sangat beracun (*toxic*). Pada hasil pengamatan kehadiran HgCl₂ dalam konsentrasi tinggi dapat menghambat perkecambahan benih, dengan semakin tingginya prosentase benih dorman. Benih surian memiliki kulit benih yang tipis, oleh karena itu bahan kimia dari HgCl₂ mudah menembus ke kulit biji, yang akhirnya merusak jaringan embrio benih. Sebaliknya, kehadiran Clorox dapat menetralkan pengaruh HgCl₂ dan mengurangi pengaruh bahan tersebut yang menempel pada kulit benih surian. Pencucian dengan clorox bertingkat (20%-30%) terbukti sangat mengurangi prosentase kontaminasi, sedangkan pemakaian clorox 10% maupun 20% hanya sekali rendam kurang mengurangi prosentase kontaminasi.

Dari hasil pengamatan, kecambah mulai tumbuh pada hari keempat, setelah inisiasi (ditanam di media MS). Eksplan (kecambah) mulai mengalami perubahan setelah berumur lewat dari satu minggu. Setelah itu kecambah mulai mengalami kontaminasi. Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri awalnya ditandai dengan pembentukan selaput bening yang membayang pada media dan berubah menjadi putih kekuningan. Kondisi ini diduga karena kandungan kontaminasi pada bahan eksplan (benih) itu sendiri atau mungkin juga dari penggunaan alat yang kurang steril. Kontaminasi cendawan umumnya berasal dari media dan bahan tanaman dari lapangan. Pada minggu pertama kontaminasi cendawan sangat tinggi pada perlakuan kontrol (tanpa sterilisasi). Cendawan yang terlihat awalnya berupa kumpulan spora berwarna coklat pada media/eksplan yang kemudian menyebar ke sekeliling media dan menutupi seluruh permukaan eksplan, hingga akhirnya eksplan tersebut mati.

Secara umum prosentase kecambah surian dari kultur zigotik tersebut lebih rendah jika dibandingkan dengan perkecambahan secara *invivo*, dari hasil pengamatan perkecambahan tertinggi hanya mencapai 63,3%. Hasil pengamatan persemaian benih surian di bak kecambah dengan media pasir (secara *invivo*) menunjukkan bahwa prosentase kecabahnya rata-rata mencapai 80-100%, dalam waktu 2 minggu pengamatan. Laju perkecambahan surian pada kondisi *in vivo*, ternyata lebih cepat dibandingkan pada kondisi *in vitro*. Dalam waktu dua minggu, secara *invivo* kecambah surian mampu mencapai ketinggian rata-rata 6-12 cm, sedangkan pada kondisi *invitro* ketinggian tersebut dicapai dalam waktu lebih dari empat minggu (Hidayat, 2005).

Fase Pertumbuhan Subkultur

Setelah kecambah berumur 4 minggu, radikulanya dipotong lalu ditanam pada media MS yang baru. Subkultur pertama dari kecambah ini kemudian diamati pertumbuhannya selama satu bulan dan diperoleh data seperti pada **Tabel 2**. Dari Tabel tersebut diperoleh data tinggi (panjang) tunas antara 1 – 2,5 cm, prosentase pembentukan kallus sebesar 33,3%, prosentase pembentukan akar 77,8%, jumlah ruas (inter node) 2 – 3 ruas dan persen terkontaminasi sebesar 44,4%.

Tabel 2. Hasil subkultur pertama eksplan surian

No	Tinggi tunas (cm)	Pembentukan Kallus	Pertumbuhan akar	Jumlah ruas	Kontaminasi
1	1,5	+	-	3	-

2	2	-	+	2	-
3	1	-	+	2	-
4	2	+	+	3	-
5	2	-	+	2	-
6	2,5	+	-	4	+
7	2	-	+	3	+
8	2	-	+	3	+
9	2	-	+	3	+
Rerata	1,8	33,3 %	77,8 %	2,5	44,4%

Keterangan: (+) ada, (-) tidak ada

Dari hasil pembuatan subkultur kedua diperoleh sebanyak 20 eksplan baru dengan prosesntase tumbuh 80% dan tingkat kontaminasi 20%. Tinggi tanaman setelah 4 minggu pengamatan mencapai rata-rata 1 cm dan ruas eksplan 2-3. Pembentukan kallus pada subkultur kedua mencapai 100% dan pembentukan akar mencapai 25% , data hasil pengamatan secara lengkap dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil Subkultur kedua eksplan surian

No	Tinggi tunas (cm)	Pembentukan kallus	Pertumbuhan akar	Jumlah ruas	Kontaminasi
1	1	+	-	3	-
2	1	+	-	3	-
3	1	+	-	2	-
4	1	+	+	2	-
5	1	+	+	4	-
6	1,5	+	+	3	-
7	1,5	+	-	3	-
8	1	+	-	4	-
9	1	+	+	2	-
10	1	+	+	3	-
11	1	+	-	4	-
12	1	+	-	3	-
13	1	+	-	2	-
14	1	+	-	2	-
15	1	+	-	3	-
16	1	+	-	2	-
17	1	+	-	2	+
18	1	+	-	2	+
19	1	+	-	2	+
20	1	+	-	2	+
Rerata	1,1	100%	25%	2,5	20%

Keterangan: (+) ada, (-) tidak ada

Dari hasil pengamatan pertumbuhan subkultur pertama dan kedua, terlihat bahwa pertumbuhan tinggi eksplan dalam periode empat minggu hanya mampu mencapai 1-1,5 cm dengan rata-rata 2- 3 ruas. Fenomena pembentukan kallus cenderung meningkat pada subkultur kedua, (meningkat dari 33,3% pada subkultur menjadi 100% pada subkultur kedua). Namun sebaliknya, persentase akar menurun dari 77,8% pada subkultur pertama

menjadi 25% pada subkultur kedua. Hal ini mengindikasikan bahwa untuk tujuan perbanyakkan planlet dari kallus akan lebih baik jika dilakukan pada subkultur kedua, sedangkan untuk induksi akar akan lebih baik pada subkultur pertama.

Fenomena lain terlihat pada prosentase kontaminasi, yaitu semakin menurun dari 44,4% pada subkultur pertama menjadi 25% pada subkultur kedua. Fenomena ini diduga berkaitan dengan tingkat sterilisasi bahan media dan eksplan yang dipergunakan. Media tumbuh eksplan (MS) pada fase perkecambahan diganti dengan media MS baru yang steril pada fase subkultur, maka kontaminan yang kemungkinan ada diduga berasal dari bahan eksplan itu sendiri yang terbawa sejak benih dikecambahkan. Kemudian pada subkultur kedua, bahan eksplannya diseleksi kembali, dipilih yang betul-betul sehat dan ditanamkan ke media MS yang baru lagi (steril), dengan demikian kontaminan yang mungkin terbawa dari eksplan sangat berkurang, sehingga prosen kontaminasi pada subkultur kedua menjadi rendah (25%). Dapat dikatakan bahwa dari peristiwa proses subkultur ternyata memberikan pengaruh terhadap derajat kontaminasi eksplan.

KESIMPULAN

1. Sterilisasi dengan HgCl_2 0,05% dan Clorok bertingkat 20%-30% menghasilkan prosentase kecambah tertinggi yaitu 63,3%, serta tanpa adanya kontaminasi. Dengan demikian penggunaan sterilisasi HgCl_2 0,05% dan Clorok bertingkat 20%-30% merupakan bahan sterilisasi yang baik untuk kultur zygotik surian. Bahan sterilisasi Clorox masih belum efektif karena masih terdapat kontaminasi sebesar 36,7%, namun sangat dibutuhkan untuk menetralkan HgCl_2 .
2. Hasil subkultur kedua menunjukkan adanya peningkatan dalam pembentukan kallus (dari 33,3% pada subkultur pertama menjadi 100% pada subkultur kedua; dan penurunan prosentase kontaminasi dari 44,4 % pada subkultur pertama menjadi 25% pada subkultur kedua).

DAFTAR PUSTAKA

- Arisyono. 2005. Teknik dan Manajemen Pembiakan Vegetatif Melalui Kultur Jaringan Jati (*Tectona grandis* Linn.f) di PT Dafa Teknoagro Mandiri. Laporan Magang Departemen Silviculture Fakultas Kehutanan IPB. *Tidak dipublikasikan*.
- George, E.F and P.D Sherington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture hand Book and Directory of Commercial Laboratorius. Exegenetics Ltd. England. 709.p
- Gunawan, L.W. 1992. Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi IPB Bogor. 165 hal.
- Narayaswamy, S. 1994. Plant Cell and Tissue Culture. Tata Mc Graw Hill Publishing Company Limited. New Delhi.
- Heyne. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid IV. Pusat Penelitian dan Pengembangan Departmen Kehutanan. Jakarta.
- Hidayat Y. 2005. Tree improvement Strategy of Surian (*Toona sinensis*) Preliminary Result. Jurnal Wanamukti forestry 16 (2): 303-136
- Hidayat Y. dan Kuvaini A . 2005. Keefektifan Ekstrak daun Surian (*Toona sinensis*) dalam Pengendalian Larva Bektor (*Xystrocera festiva*) Jurnal Agrikultura 16 (2): 303-136

- Normah MN, Rosnah H, Noor Azza AB. 1990. Multiple shoot and callus formation from seeds of mangosteen (*Garcia mangostana*) cultured in vitro Acta Horticultureae 292.
- Sugiyama M. 1999. Organogenesis in vitro. Opinion on Plant Biology (1999) 2: 61-64
- Struik, P.C. 1991. Plant tissue culture. In Biotol (Ed). Biotechnological Innovations in Crop Improvement. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford.
- Tang H.,and Krezal G.Z.R. 2000. Somatic embryogenesis and organogenesis from immature embryo cotyledon of three chery cultivar (*Prunus cerasus* L). Scientia Holticulture 83 (2000): 109-126
- Wang.C., Cao. J., Tien.S., Wang, Y, Chen. Z., Chan, M., and Gong, G. 2008. Germplasm resources research of *Toona sinensis* with RAPD and isoenzyme analysis. Biologia Journal 63(3): 320-326
- Wiguna, O. 2006. Studi pertumbuhan Stek Batang bibit Surian (*Toona siensis* Roem). Skripsi. Jurusan Manajemen Hutan Fakultas Kehutanan Universitas Winaya Mukti Bandung. *Tidak dipublikasikan*
- Witjaksono, and Litz R.E. 1999. Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58: 141-148
- Zobel B. and Talbert J. 1984. Applied Forest Tree Improvement. John Wiley & Sons. New York.