

KEBERHASILAN INISIASI EKSPLAN TUNAS DAN DAUN GMELINA (*Gmelina arborea* L.) DENGAN PENERAPAN BERBAGAI METODE STERILISASI

Successful Initiation of Gmelina (Gmelina Arborea L.) Shoots and Leaves Explant with the Application of Various Sterilization Methods

Arum Sekar Wulandari^{1*}, Edhi Sandra², Annisa Dian Kirani¹

(Diterima 24 Maret 2025 /Disetujui 7 Agustus 2025)

ABSTRACT

Gmelina is a fast growing species that has high sufficient economy value and useful as medicinal plant. Propagation of gmelina by tissue culture has not been widely applied in Indonesia. This study aimed to analyze the effect of explant types and sterilization methods on the success of gmelina initiation. Treatments used in this study were explant types (apical shoot and leaf) and four sterilization methods (B1-B4) using detergent, tween 80, fungicide, bactericide, NaOCl, and HgCl₂. All sterilization methods produced 6–19% sterile gmelina shoot culture, but did not succeed producing sterile gmelina leaf culture. Contamination by fungi and bacteria was the main cause of failed gmelina shoot and leaf culture initiation. In general, sterilization methods used in this study has succeeded in eliminating microbes on the explant's surface, but has not succeeded in eliminating microbes inside the explant.

Keywords: contamination, explant type, microbes, sterilant, tissue culture

ABSTRAK

Gmelina merupakan tanaman *fast growing* yang memiliki nilai ekonomi cukup tinggi dan bermanfaat sebagai tanaman obat. Perbanyakannya secara kultur jaringan belum banyak diterapkan di Indonesia. Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh jenis eksplan dan metode sterilisasi terhadap keberhasilan inisiasi gmelina. Perlakuan yang dicobakan dalam penelitian yaitu jenis eksplan (tunas apikal dan daun) dan empat macam metode sterilisasi (B1-B4) dengan menggunakan detergen, tween 80, fungisida, bakterisida, NaOCl, dan HgCl₂. Semua metode sterilisasi yang digunakan dalam penelitian ini dapat menghasilkan kultur tunas gmelina steril sebesar 6–19%, namun belum berhasil menghasilkan kultur daun gmelina steril. Kontaminasi fungi dan bakteri menjadi penyebab utama kegagalan inisiasi kultur tunas dan kultur daun gmelina. Secara umum, metode sterilisasi yang digunakan dalam penelitian ini sudah berhasil untuk mematikan mikroorganisme yang berada di permukaan eksplan, tetapi belum berhasil mematikan mikroorganisme yang berada di dalam eksplan.

Kata kunci: bahan sterilan, jenis eksplan, kontaminasi, kultur jaringan, mikro

¹ Departemen Silvikultur, FAHUTAN, IPB University

*Penulis korespondensi:

e-mail: ir_arum@apps.ipb.ac.id

² Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata, FAHUTAN, IPB University

PENDAHULUAN

Gmelina merupakan salah satu tanaman yang pertumbuhannya cepat (*fast growing*). Gmelina mudah ditanam pada berbagai ketinggian dan berbagai jenis tanah (Suárez *et al.* 2013). Jenis kayu gmelina memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi karena dapat dimanfaatkan sebagai bahan bangunan, bahan pembuatan kertas dan lainnya. Serat kayu gmelina sangat baik untuk pembuatan pulp dan kertas. Kayu gmelina tergolong dalam kelas awet menengah (IV – V), kelas kuat III, mudah dikerjakan, dan tahan terhadap cuaca (Hadijah 2013).

Perbanyakan gmelina dapat dilakukan secara generatif dan vegetatif. Perbanyakan tanaman gmelina secara vegetatif dapat dilakukan dengan cara stek batang (Adinugraha *et al.* 2020) dan kultur jaringan (Suárez *et al.* 2013). Kultur jaringan merupakan salah satu teknik perbanyakan tanaman dengan cara mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan, dan organ (daun, akar, batang, bunga). Bagian tanaman yang terisolasi kemudian ditumbuhkan dalam media buatan secara aseptik dalam wadah tertutup yang tembus cahaya, sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman lengkap. Perbanyakan secara kultur jaringan memiliki keuntungan yaitu tidak memerlukan lahan yang luas dan sebagai upaya perbanyakan tanaman secara massal dalam menyediakan bahan tanaman unggul bermutu tinggi, seragam, dan dalam waktu yang singkat.

Keberhasilan dalam teknik kultur jaringan sangat ditentukan oleh proses inisiasi. Inisiasi adalah upaya penumbuhan meristem atau bagian tanaman (mata tunas, ujung akar, ujung daun muda, keping biji, dan sebagainya) supaya tumbuh dalam botol bebas hama dan penyakit (dalam kondisi aseptik). Dalam pelaksanaan kultur jaringan, terutama untuk jenis tanaman kehutanan, sering kali ditemukan adanya masalah berupa kontaminasi terutama pada tahapan inisiasi. Menurut Andriani dan Heriansyah (2021), kontaminasi merupakan suatu faktor pembatas dalam kegiatan perbanyakan tanaman secara kultur jaringan. Kontaminasi dapat dicegah melalui tahapan sterilisasi eksplan. Metode sterilisasi yang tepat perlu diketahui untuk mendapatkan kultur yang steril dan untuk mengatasi kendala kontaminasi yang sering terjadi.

Tanaman gmelina memiliki potensi yang besar untuk diperbanyak dengan teknik kultur jaringan, namun penelitian mengenai optimalisasi tahapan inisiasi kultur jaringan pada gmelina masih terbatas. Beberapa studi telah membahas teknik perbanyakan gmelina secara umum (Rajbahak *et al.* 2016; Ahmad 2020; Madke *et al.* 2021), namun kajian yang secara spesifik mengkaji pengaruh jenis eksplan dan metode sterilisasi terhadap keberhasilan inisiasi gmelina belum dilakukan. Padahal, tahapan inisiasi merupakan fase kritis yang sangat menentukan keberhasilan keseluruhan proses kultur jaringan. Selain itu, tingginya tingkat kontaminasi pada kultur jaringan tanaman kehutanan (Chornobrov dan Tkachova 2021; Permadi *et al.* 2023; Darwesh *et al.* 2024) menunjukkan bahwa belum ada pendekatan teknik

sterilisasi yang benar-benar efektif dan sesuai, khususnya untuk jenis eksplan dari gmelina. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh jenis eksplan dan metode sterilisasi terhadap keberhasilan inisiasi kultur jaringan gmelina.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian berlangsung pada bulan Desember 2021 sampai Februari 2022. Lokasi penelitian bertempat di Rumah Kaca Departemen Silvikultur, Fakultas Kehutanan dan Lingkungan IPB; dan Laboratorium Kultur Jaringan Esha Flora, Bogor.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah pinset, cawan petri, *scalpel*, mata pisau bedah, sendok pengaduk, pipet, gelas ukur, penggaris, timbangan digital, rak inkubasi, *sprayer*, aerator, alat tulis, botol selai (250 mL dan 330 mL), botol kultur, autoklaf, kompor, panci, pH meter, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), dan bunsen. Bahan yang digunakan adalah bibit gmelina, media Murashige Skoog (MS), Sodium hipoklorit (NaOCl) 5,25%, larutan HgCl₂ (1 g/L), fungisida (bahan aktif mankozeb), fungisida (bahan aktif propineb), bakterisida (bahan aktif streptomisin sulfat), larutan streptomisin (1 g/L) alkohol 70%, spiritus, air steril, plastik, karet, label, tisu, *aluminium foil*, *plastic wrap*, masker, detergen, Tween 80, dan korek api. Pengolahan data dilakukan menggunakan aplikasi *Microsoft Office Excel 2019*, *Microsoft Office Word 2019*, *IBM Statistics SPSS 22*, dan *Minitab 19*.

Prosedur Penelitian

1. Sterilisasi Alat

Botol kultur direndam menggunakan detergen dan NaOCl 5,25% selama 30 menit, dicuci dengan spons pencuci alat, dibilas kemudian dimasukkan ke dalam dandang. Alat-alat penanaman seperti cawan petri, *scalpel*, dan pinset dicuci bersih menggunakan sabun lalu dikeringkan menggunakan tisu. Alat yang sudah kering selanjutnya disemprot alkohol lalu dibungkus dengan koran atau kertas lalu dimasukkan ke dalam dandang. Botol dan alat dalam dandang selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 1 jam. Selanjutnya botol disimpan ke dalam plastik yang telah disemprot alkohol 70%. Sterilisasi LAFC dilakukan dengan cara menyemprotkan alkohol 70% ke permukaan LAFC, lalu dikeringkan dengan tisu. LAFC kemudian disterilisasi dengan sinar UV selama minimal 60 menit sebelum penanaman dilakukan. Selama sterilisasi LAFC juga dapat dilakukan persiapan alat penanaman dan media kultur yang akan digunakan. Seluruh alat penanaman dan media kultur disemprot dengan alkohol 70% sebelum dimasukkan ke dalam LAFC.

2. Pembuatan Media

Bahan-bahan media MS terdiri dari larutan A hingga larutan F, vitamin, asam amino, agar-agar, gula, dan air

steril. Metode pembuatan media MS mengacu pada Helena *et al.* (2022). Seluruh bahan dicampur sesuai takaran masing-masing. Sebelum ditambahkan agar-agar, pH larutan diukur sampai mencapai 5,8. Apabila larutan terlalu masam ditambahkan NaOH dan jika terlalu basa ditambahkan HCl. Larutan yang sudah menunjukkan pH optimal selanjutnya diberi bubuk agar sebanyak 6 g/L lalu dipanaskan hingga mendidih. Larutan media selanjutnya dituang ke dalam botol kultur yang sudah disterilisasi dengan takaran ± 20 mL/botol. Setelah botol terisi larutan media, mulut botol ditutup menggunakan plastik dan karet, dan disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 30 menit. Setelah botol dingin, dilakukan pengencangan karet pada mulut botol lalu disimpan ke dalam plastik yang sebelumnya telah disemprot alkohol 70%. Media yang sudah dingin disimpan di dalam ruangan penyimpanan media sebelum digunakan, untuk mencegah kontaminasi.

3. Persiapan Tanaman Indukan dan Pengambilan Eksplan

Benih gmelina disemaikan di rumah kaca Fakultas Kehutanan dan Lingkungan IPB. Pemeliharaan selama kegiatan penyemaian di rumah kaca dilakukan dengan penyiraman setiap hari pada pagi dan sore hari. Setelah satu bulan, benih disapah ke dalam polybag berisi media tanam berupa tanah dan kompos dengan perbandingan 3:1. Selanjutnya, benih dipindahkan ke persemaian. Pemeliharaan bibit dilakukan dengan penyiraman setiap hari di pagi dan sore selama 2 bulan, lalu dipindahkan ke rumah kaca Esha Flora. Pemeliharaan di rumah kaca Esha Flora dengan melakukan penyiraman setiap pagi dan sore hari. Tanaman indukan yang digunakan untuk kegiatan inisiasi adalah gmelina yang berusia 4 bulan. Bagian tanaman yang digunakan adalah tunas apikal dan daun yang masih muda (tangkai masih hijau). Eksplan yang digunakan juga harus bebas dari hama dan penyakit. Eksplan dinyatakan bebas dari hama dan penyakit, jika di permukaan eksplan tidak ditemukan adanya gejala dan tanda dari serangan hama dan patogen. Eksplan yang sudah diambil kemudian disterilisasi sesuai dengan metode perlakuan.

4. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi dilakukan sebanyak 2 kali, yaitu di luar laminar dan di dalam laminar. Wadah yang digunakan untuk sterilisasi eksplan adalah botol. Air yang digunakan dalam proses sterilisasi adalah air steril. Eksplan dipotong menggunakan *scalpel* untuk memudahkan proses pengocokan dalam botol. Ukuran eksplan sebelum sterilisasi, yaitu 3-4 cm dan daun 5 cm x 2 cm. Ukuran yang besar ditujukan apabila terjadi lisis selama kegiatan sterilisasi, masih ada bagian tanaman yang dapat digunakan. Setelah eksplan dipotong, dilanjutkan dengan sterilisasi sesuai perlakuan. Protokol penggunaan agen sterilan, konsentrasi yang digunakan dan lamanya perendaman eksplan dilakukan berdasarkan penelitian Gu *et al.* (2022). Sterilisasi permukaan eksplan dapat dilakukan dengan berbagai macam agen sterilan seperti NaOCl, bakerisida dan fungisida, serta HgCl₂. Konsentrasi agen sterilan dan lama perendamannya bergantung pada jenis eksplan yang digunakan. Setelah

diberi perlakuan sterilisasi permukaan, eksplan dibilas dengan menggunakan air steril.

Sterilisasi luar metode B1 dilakukan dengan mencuci eksplan menggunakan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya eksplan direndam dan dikocok dalam air steril selama 5 menit dan dibilas 3 kali. Eksplan kemudian direndam dan dikocok perlahan dalam larutan Tween 80 (20 tetes/L) selama 20 menit, lalu dibilas hingga bersih. Setelah itu, eksplan direndam dan dikocok dengan larutan fungisida A 2 g/L selama 1 jam, lalu dibilas hingga bersih. Eksplan selanjutnya direndam dan dikocok secara perlahan dalam larutan bakterisida 2 g/L selama 1 jam, lalu dibilas hingga bersih. Tahap sterilisasi selanjutnya dilakukan di dalam LAFC (sterilisasi dalam). Langkah pertama yaitu memindahkan eksplan ke dalam botol steril baru. Selanjutnya eksplan dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali dengan waktu masing-masing 5 menit. Eksplan kemudian direndam dan dikocok perlahan dalam larutan NaOCl 10% selama 15 menit lalu dibilas 3 kali dengan waktu masing-masing 5 menit. Setelah itu, eksplan direndam kembali dan dikocok perlahan dalam larutan NaOCl 5% selama 10 menit, kemudian dibilas 3 kali dengan waktu masing-masing 5 menit. Selanjutnya eksplan ditiriskan dan dipindahkan ke dalam cawan petri untuk selanjutnya memasuki tahap penanaman.

Sterilisasi luar metode B2 dilakukan dengan membersihkan permukaan eksplan menggunakan alkohol 70%, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 15 menit. Selanjutnya, eksplan direndam dan dikocok dalam larutan detergen 10 g/L selama 10 menit, lalu dibilas dengan air steril hingga bersih. Setelah itu, eksplan direndam dan dikocok dalam larutan campuran bakterisida 2 g/L dan fungisida B 2 g/L selama 1 jam, lalu dibilas hingga bersih. Selanjutnya eksplan dipindahkan ke dalam botol steril baru. Eksplan kemudian direndam dan dikocok dalam larutan streptomisin 10% selama 1 jam. Selanjutnya, dilakukan sterilisasi dalam seperti pada perlakuan B1.

Sterilisasi luar metode B3 dilakukan seperti pada metode B1. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam. Eksplan dibilas menggunakan air steril sebanyak 2 kali dengan waktu masing-masing 3 menit. Eksplan kemudian direndam dan dikocok dalam larutan HgCl₂ 10% selama 7 menit, lalu dibilas 2 kali dengan waktu masing-masing 5 menit. Setelah itu, eksplan direndam dan dikocok dalam larutan NaOCl 10% selama 7 menit, lalu direndam dan dikocok kembali dalam larutan NaOCl 5% selama 7 menit. Eksplan kemudian dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali dengan waktu masing-masing 5 menit. Selanjutnya eksplan ditiriskan dan dipindahkan ke dalam cawan petri untuk selanjutnya memasuki tahapan penanaman.

Metode sterilisasi B4 merupakan kombinasi dari metode sterilisasi B2 dan B3. Sterilisasi luar metode B4 dilakukan seperti pada metode B2, sedangkan sterilisasi dalam dilakukan seperti pada metode B3.

5. Penanaman Eksplan

Eksplan yang telah disterilkan diletakkan dalam cawan petri yang sebelumnya telah disterilkan menggunakan air steril yang dicampurkan dengan betadine. Air dikocok merata mengenai seluruh

permukaan bagian dalam cawan petri, lalu dibuang dan bagian dalam cawan petri dikeringkan dengan cara dibakar di atas api bunsen. Bagian eksplan yang putih (jaringan mati) dipotong untuk mencegah kontaminasi akibat jaringan yang mati.

Eksplan yang sudah bersih dibilas dengan air steril dengan cara dikocok dalam botol selai selama 5 menit. Selanjutnya eksplan kembali diletakkan ke dalam cawan petri yang sebelumnya sudah diberi tisu steril, kemudian bagian atas eksplan juga dikeringkan dengan tisu steril. Eksplan yang sudah kering dapat segera ditanam ke dalam botol kultur. Penanaman dilakukan dengan hati-hati dan untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Tahapan penanaman diawali dengan membuka penutup botol media, lalu mulut botol dibakar di atas bunsen. Selanjutnya eksplan diambil menggunakan pinset dengan cara membuka tutup cawan petri lalu ditanam ke dalam botol media. Setelah eksplan ditanam mulut botol media dibakar kembali, kemudian ditutup kembali menggunakan penutup botol media.

6. Pengamatan dan Pengambilan Data

Tunas dan daun gmelina yang sudah ditanam secara aseptik, diamati selama 30 hari. Peubah yang diamati adalah: waktu pertama kali terjadinya kontaminasi, persentase kultur steril, persentase kultur terkontaminasi fungi, persentase kultur terkontaminasi bakteri, dan persentase kultur terkontaminasi fungi dan bakteri. Rumus penghitungan dari peubah yang diukur mengikuti Sudiyanti *et al.* (2017). Pengukuran persentase kultur steril diperoleh dari hasil perbandingan kultur yang steril dengan kultur yang ditanam seperti rumus berikut:

$$Kultursteril = \frac{kulturyangsteril}{kulturyangditanam} \times 100\%.$$

Pengukuran persentase kultur yang terkontaminasi fungi diperoleh dari hasil perbandingan kultur yang terkontaminasi fungi dengan kultur yang ditanam seperti rumus berikut: $KulturTerkontaminasiFungi = \frac{Kulturterkontaminasifungi}{kulturyangditanam} \times 100\%$.

Pengukuran persentase kultur yang terkontaminasi bakteri diperoleh dari hasil perbandingan kultur yang terkontaminasi bakteri dengan kultur yang ditanam seperti rumus berikut:

$$KulturTerkontaminasiBakteri = \frac{Kulturterkontaminasibakteri}{kulturyangditanam} \times 100\%.$$

Pengukuran persentase kultur yang terkontaminasi fungi dan bakteri diperoleh dari hasil perbandingan kultur yang terkontaminasi fungi dan bakteri dengan kultur yang ditanam seperti rumus berikut:

$$KulturTerkontaminasiFungidanBakteri = \frac{Kulturterkontaminasifungidanbakteri}{kulturyangditanam} \times 100\%$$

7. Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial 2 faktor. Faktor pertama adalah jenis eksplan yang terdiri atas 2 taraf, yaitu (A1) tunas gmelina, dan (A2) daun gmelina. Faktor kedua adalah metode sterilisasi yang terdiri atas 4 taraf. Taraf dalam metode sterilisasi, yaitu B1, B2, B3, dan B4. Rincian masing-

masing metode sterilisasi dapat dilihat dalam subbab Sterilisasi Eksplan. Masing-masing perlakuan terdiri atas 4 ulangan. Satu ulangan terdiri atas 4 unit botol yang masing-masing berisi 1 eksplan gmelina. Jumlah unit amatan keseluruhan adalah 128 botol. Model statistik rancangan yang digunakan adalah (Montgomery 2020):

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

Keterangan:

Y_{ijk} = Nilai pengamatan unit percobaan pada taraf jenis eksplan ke- i , metode sterilisasi ke- j , dan ulangan ke- k

μ = Rataan umum

α_i = Pengaruh utama faktor jenis eksplan

β_j = Pengaruh utama faktor metode sterilisasi

$\alpha\beta_{ij}$ = Pengaruh interaksi jenis eksplan ke- i dan metode sterilisasi ke- j

ε_{ijk} = Pengaruh acak jenis eksplan ke- i , metode sterilisasi ke- j , dan ulangan ke- k

I = Taraf jenis eksplan (A1, A2)

j = Taraf metode sterilisasi (B1, B2, B3, B4)

k = Ulangan (1,2,3,4)

Hipotesis yang diajukan dalam percobaan ini adalah:

Faktor metode sterilisasi

H_0 : Metode sterilisasi yang digunakan tidak berpengaruh terhadap tingkat hasil inisiasi gmelina.

H_1 : Metode sterilisasi yang digunakan berpengaruh terhadap tingkat hasil inisiasi gmelina.

Faktor jenis eksplan

H_0 : Jenis eksplan yang digunakan tidak berpengaruh terhadap hasil inisiasi gmelina.

H_1 : Jenis eksplan yang digunakan berpengaruh terhadap hasil inisiasi gmelina.

Pengambilan keputusan dilakukan berdasarkan nilai P-value yaitu: tolak H_0 dan terima H_1 jika P-value $< 0,05$, dan terima H_0 dan tolak H_1 jika P-value $> 0,05$, pada taraf kesalahan 5%. Interaksi antar perlakuan yang terdapat dalam percobaan ini belum dapat diketahui karena pengolahan data dilakukan menggunakan uji nonparametrik.

8. Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil pengamatan dihitung dan dianalisis secara: (1) statistik menggunakan uji Kruskal Wallis dengan bantuan aplikasi Minitab, dan (2) deskriptif. Analisis secara statistik digunakan untuk menganalisis persentase kultur steril, dan persentase kultur terkontaminasi. Analisis deskriptif digunakan untuk menganalisis faktor keberhasilan inisiasi gmelina. Pengambilan keputusan dilakukan berdasarkan nilai P-value yaitu: tolak H_0 dan terima H_1 jika P-value $< 0,05$, dan terima H_0 dan tolak H_1 jika P-value $> 0,05$, pada taraf kesalahan 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Perbedaan perlakuan metode sterilisasi (B1-B4) tidak berpengaruh terhadap keberhasilan inisiasi gmelina, sehingga hipotesis pertama ditolak. Jenis eksplan (tunas

dan daun gmelina) yang digunakan berpengaruh terhadap keberhasilan inisiasi, sehingga hipotesis kedua diterima.

Seluruh perlakuan sterilisasi berhasil menghasilkan kultur tunas gmelina steril sebesar 6–19%, sedangkan pada kultur daun seluruh metode sterilisasi tidak menghasilkan (0%) kultur daun gmelina steril. Hasil penelitian menunjukkan tidak ada perbedaan nyata pengaruh metode sterilisasi terhadap hasil kultur gmelina steril, namun terdapat perbedaan pengaruh jenis eksplan terhadap hasil kultur gmelina steril.

Tabel 1 Pengaruh metode sterilisasi terhadap keberhasilan inisiasi eksplan tunas dan daun gmelina

Perlakuan sterilisasi	Kultur steril (%)	
	Tunas gmelina	Daun gmelina
B1	6	0
B2	12	0
B3	19	0
B4	12	0

B1: tween 80, fungisida A, bakterisida, NaOCl 10%, NaOCl 5%, B2: alkohol 70%, detergen, fungisida B dan bakterisida, streptomisin 10%, NaOCl 10%, NaOCl 5%, B3: tween 80, fungisida A, bakterisida, HgCl₂ 10%, NaOCl 10%, NaOCl 5%, B4: alkohol 70%, detergen, fungisida B dan bakterisida, streptomisin 10%, HgCl₂ 10%, NaOCl 10%, NaOCl 5%.

Kultur tunas gmelina yang steril terlihat berwarna hijau dan muncul tunas baru pada hari ke-24. Seluruh kultur daun gmelina mengalami kontaminasi, namun terdapat kultur yang tidak mengalami kematian. Kultur daun gmelina terkontaminasi yang masih hidup memiliki warna daun hijau dan terdapat lapisan lendir berwarna merah muda di sekitar kultur. Kondisi media pada kedua kultur yang masih hidup terlihat tetap steril.

Kontaminasi pada kultur tunas dan kultur daun gmelina pertama kali muncul pada 3–5 hari setelah inisiasi (Tabel 2). Rata-rata waktu muncul kontaminasi pada kultur tunas gmelina yaitu 4,6 hari. Rata-rata waktu muncul kontaminasi pada kultur daun gmelina yaitu 3,5 hari.

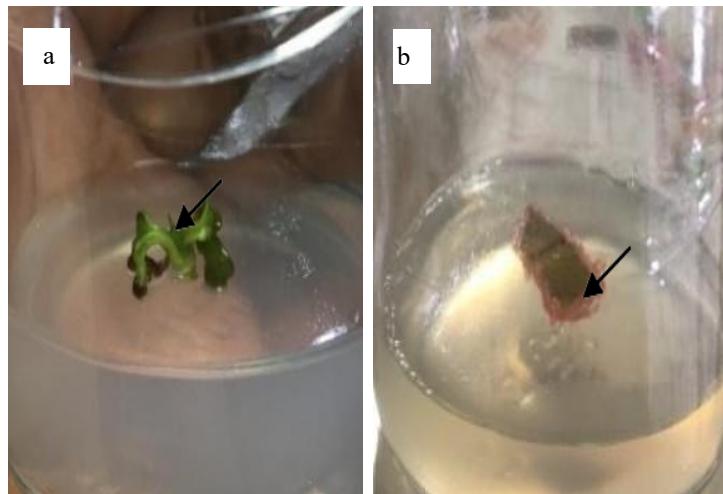
Tabel 2 Waktu pertama kali terjadinya kontaminasi pada kultur tunas dan daun gmelina

Perlakuan	Waktu munculnya kontaminasi (hari setelah inisiasi)	
	Kultur tunas gmelina	Kultur daun gmelina
B1	4,5	4,3
B2	3,9	3,3
B3	5,0	3,0
B4	5,1	3,2

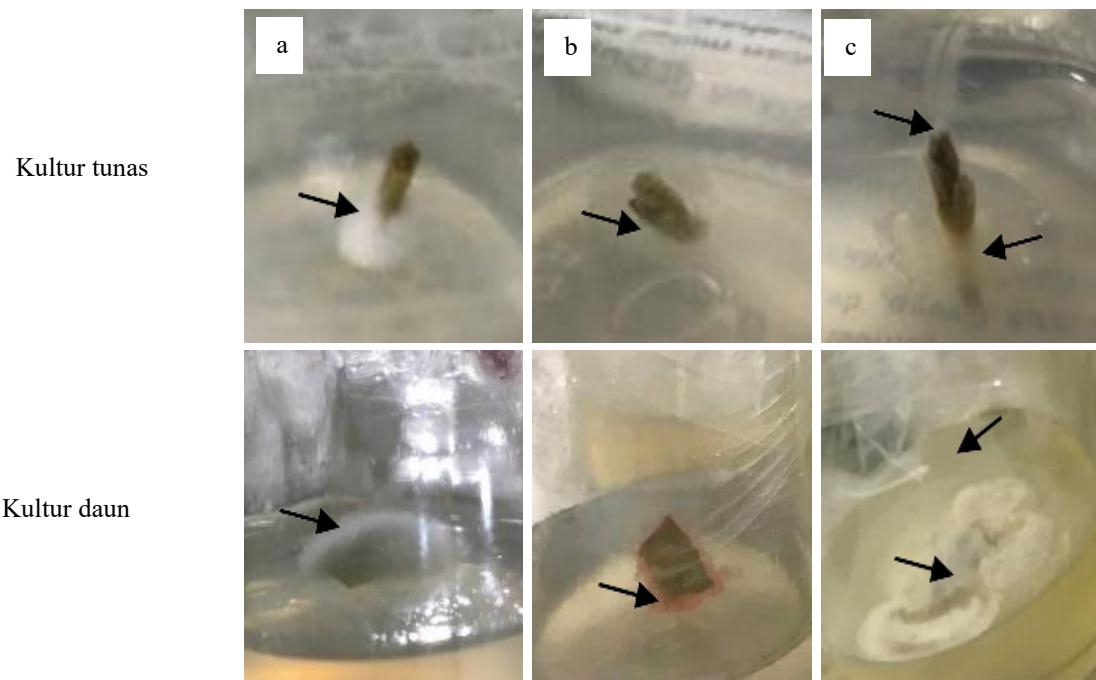
B1: tween 80, fungisida A, bakterisida, NaOCl 10%, NaOCl 5%, B2: alkohol 70%, detergen, fungisida B dan bakterisida, streptomisin 10%, NaOCl 10%, NaOCl 5%, B3: tween 80, fungisida A, bakterisida, HgCl₂ 10%, NaOCl 10%, NaOCl 5%, B4: alkohol 70%, detergen, fungisida B dan bakterisida, streptomisin 10%, HgCl₂ 10%, NaOCl 10%, NaOCl 5%

Rata-rata kultur tunas gmelina terkontaminasi pada hari ke-3 hingga ke-10. Kontaminasi tidak ditemukan pada hari ke-10 hingga ke-15. Namun, pada hari ke-16 kontaminasi kembali muncul pada perlakuan metode sterilisasi B1 dan tidak ditemukan kembali hingga hari ke-27. Selanjutnya, pada hari ke-28, kontaminasi kembali muncul pada perlakuan metode sterilisasi B4.

Rata-rata kultur daun gmelina terkontaminasi pada hari ke-3 hingga ke-10 dan terjadi secara serentak. Kontaminasi tidak ditemukan kembali pada hari ke-5 sampai ke-9. Namun, kontaminasi kembali muncul pada hari ke-10 dan ke-12 pada perlakuan metode sterilisasi B1.



Gambar 1 Pengaruh berbagai metode sterilisasi terhadap inisiasi tunas dan daun gmelina: (a) kultur tunas steril, (b) kultur daun terkontaminasi hidup (tanda panah).



Gambar 2 Pengaruh berbagai metode sterilisasi terhadap terjadinya kontaminasi pada kultur tunas gmelina dan daun gmelina: (a) kontaminasi fungi, (b) kontaminasi bakteri, (c) kontaminasi gabungan fungi dan bakteri.

Kegagalan inisiasi gmelina disebabkan oleh kontaminasi fungi, bakteri, serta gabungan fungi dan bakteri. Kontaminasi fungi ditandai dengan munculnya benang-benang hifa berwarna putih pada permukaan kultur tunas dan daun gmelina. Kontaminasi bakteri ditandai dengan munculnya lapisan lendir berwarna keruh pada media kultur tunas dan daun gmelina. Kontaminasi gabungan fungi dan bakteri ditandai dengan munculnya lapisan lendir berwarna putih keruh pada media kultur serta benang-benang hifa berwarna putih pada permukaan kultur tunas dan daun gmelina.

Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya perbedaan nyata pengaruh perlakuan metode sterilisasi terhadap kontaminasi kultur. Kontaminasi oleh fungi ditemukan pada semua perlakuan metode sterilisasi dengan jenis eksplan tunas, yaitu sebesar 15,63%; dan pada perlakuan metode sterilisasi B1 dan B4 dengan jenis eksplan daun, yaitu sebesar 6,25%. Kontaminasi oleh bakteri hanya ditemui pada perlakuan metode sterilisasi B1 dengan jenis eksplan daun, yaitu sebesar 6,25%. Kontaminasi oleh gabungan fungi dan bakteri terjadi pada seluruh perlakuan metode sterilisasi dengan jenis

eksplan tunas, yaitu sebesar 71,88%; dan dengan jenis eksplan daun sebesar 92,19%. Pada beberapa kultur tunas dan daun gmelina, kontaminasi fungi dan bakteri tidak muncul secara bersamaan. Pada kultur tunas gmelina, kebanyakan kontaminasi bakteri muncul terlebih dahulu, beberapa hari kemudian muncul kontaminasi fungi, sedangkan pada kultur daun gmelina kontaminasi fungi muncul lebih dahulu.

Semua metode sterilisasi yang digunakan berhasil menghasilkan kultur tunas gmelina steril sebesar 12,5%, sedangkan kontaminasi yang terjadi pada kultur tunas gmelina adalah sebesar 87,5%. Pada kultur daun gmelina tidak dihasilkan kultur daun steril (0%), sedangkan kontaminasi yang terjadi pada kultur daun gmelina adalah sebesar 100%. Kontaminasi menjadi penyebab kematian pada kultur tunas gmelina dan kultur daun gmelina. Pada kultur tunas gmelina yang tidak terkontaminasi, tidak terjadi kematian. Kematian akibat kontaminasi pada kultur tunas gmelina terjadi sebesar 100%, sedangkan pada kultur daun gmelina terjadi sebesar 98,44%.

Tabel 3 Pengaruh berbagai metode sterilisasi dan jenis eksplan terhadap tingkat kontaminasi kultur gmelina

Perlakuan sterilisasi	Kontaminasi fungi (%)		Kontaminasi bakteri (%)		Kontaminasi gabungan (%)	
	Tunas	Daun	Tunas	Daun	Tunas	Daun
B1	25,0	17,5	0,0	6,0	70	75
B2	12,5	0,0	0,0	0,0	75	100
B3	12,5	0,0	0,0	0,0	70	100
B4	12,5	6,25	0,0	0,0	75	95

B1: tween 80, fungisida A, bakterisida, NaOCl 10%, NaOCl 5%, B2: alkohol 70%, detergen, fungisida B dan bakterisida, streptomisin 10%, NaOCl 10%, NaOCl 5%, B3: tween 80, fungisida A, bakterisida, HgCl₂ 10%, NaOCl 10%, NaOCl 5%, B4: alkohol 70%, detergen, fungisida B dan bakterisida, streptomisin 10%, HgCl₂ 10%, NaOCl 10%, NaOCl 5%.

Pembahasan

Keberhasilan inisiasi ditandai dengan dihasilkannya kultur steril. Kultur tunas gmelina steril yang dihasilkan dari penelitian ini sebesar 12,5%, sedangkan pada jenis eksplan daun belum dihasilkan kultur steril. Faktor yang memengaruhi keberhasilan inisiasi yaitu: metode sterilisasi, pemilihan bahan eksplan, dan faktor lingkungan (pH, cahaya, temperatur, dan kandungan zat pengatur tumbuh dalam media kultur) (Pangestika 2015). Belum dihasilkannya kultur daun gmelina steril disebabkan daun memiliki jaringan yang telah terdiferensiasi sehingga banyak terdapat jaringan yang sudah tua. Menurut Hilarino *et al.* (2011) kandungan biomassa pada daun tua lebih tinggi, sehingga dapat menyediakan sumber daya yang lebih banyak untuk pertumbuhan mikrob endofit (mikrob internal) yang ada di dalam jaringan tanaman, dan merupakan sumber kontaminan.

Kultur steril dalam penelitian ini ditemukan pada kultur tunas gmelina yang dihasilkan pada seluruh perlakuan metode sterilisasi yang digunakan dalam penelitian ini. Metode sterilisasi yang digunakan dalam penelitian ini ditujukan untuk mematikan mikrob yang berada di permukaan eksplan (mikrob eksternal). Penggunaan kombinasi fungisida, bakterisida, NaOCl dan HgCl₂ diduga dapat menekan atau menghilangkan kontaminan yang berada di permukaan eksplan. Penggunaan fungisida dan bakterisida bertujuan menghilangkan kontaminan berupa fungi dan bakteri. Penggunaan NaOCl sebagai bahan sterilan ditujukan menekan pertumbuhan mikrob dengan bertindak sebagai biosida beracun yang dapat mengoksidasi dan menstimulasi inaktivasi enzim serta degradasi asam lemak dan lipid bakteri (Pais *et al.* 2016). Pemilihan penggunaan HgCl₂ sebagai bahan sterilan adalah karena HgCl₂ memiliki sifat sangat larut dalam air sehingga mudah diabsorbsi. Ion Hg²⁺ memiliki daya toksitas yang tinggi karena dapat menyebabkan gangguan pertukaran ion intraseluler pada fungi dan bakteri (Alfian 2006).

Kematian kultur dalam penelitian ini disebabkan oleh kontaminasi mikrob (fungi, bakteri, dan gabungan fungi dan bakteri). Orilkowska *et al.* (2017) menyatakan bahwa pertumbuhan mikrob yang mendominasi kultur dapat menimbulkan persaingan nutrisi pada media, mengisolasi eksplan dari oksigen, dan dapat menyebabkan kematian pada kultur. Kontaminasi dapat disebabkan oleh faktor eksternal dan faktor internal (Darwesh *et al.* 2024). Faktor eksternal yaitu berasal dari lingkungan kerja dan kontaminan yang terbawa oleh eksplan yang kurang steril, sedangkan kontaminasi internal berasal dari kontaminan yang terdapat dalam jaringan tanaman.

Kontaminasi yang terjadi pada penelitian ini termasuk tinggi, hal ini disebabkan oleh sumber eksplan yang membawa kontaminan. Eksplan diambil dari tanaman induk berupa bibit gmelina berumur 4 bulan yang tidak dikarantina (diberi praperlakuan sebelum proses inisiasi), sehingga seluruh metode sterilisasi yang digunakan belum berhasil secara maksimal menekan

jumlah kontaminasi. Menurut Ardiansyah (2014) perlakuan karantina dilakukan dengan tujuan menjaga sumber eksplan dari hama dan penyakit, sehingga dengan terjaganya kesehatan tanaman induk, mikrob endofit yang terdapat dalam jaringan tanaman dapat dikurangi maupun dihilangkan.

Berdasarkan hasil penelitian, kebanyakan kontaminan fungi pada kultur tunas dan daun gmelina berasal dari dalam jaringan eksplan (endofit). Kemunculan kontaminan fungi menyebabkan kematian pada seluruh kultur gmelina yang terkontaminasi. Pertumbuhan fungi endofit dalam kultur dapat menyebabkan kematian karena pertumbuhan fungi yang lebih cepat daripada pertumbuhan eksplan akan menutupi eksplan dan akhirnya akan menyebabkan eksplan busuk dan mati (Habibah 2013).

Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri terjadi pada kultur daun gmelina dan disebabkan oleh kontaminan yang berada di dalam jaringan eksplan (endofit). Menurut Shofiyani dan Hajoeningtias (2010), kontaminasi bakteri umumnya merupakan kontaminasi internal yang sulit diatasi karena sterilisasi permukaan saja tidak mampu menghilangkan kontaminan bakteri yang berada di dalam jaringan tanaman.

Kontaminasi gabungan fungi dan bakteri juga ditemukan dalam penelitian ini pada seluruh perlakuan dan termasuk ke dalam kontaminasi internal karena disebabkan oleh kontaminan yang berada di dalam jaringan eksplan (endofit). Pada beberapa kultur tunas gmelina terkontaminasi, kontaminan bakteri muncul lebih dahulu dibandingkan dengan kontaminan fungi. Kontaminan fungi kemudian tumbuh lebih cepat dibandingkan dengan kontaminan bakteri, sehingga setelah beberapa hari kontaminan bakteri tertutupi oleh kontaminan fungi hingga tidak terlihat pada permukaan eksplan.

Kontaminasi internal dapat dicegah dengan kegiatan pra-perlakuan sebelum dilakukannya kegiatan inisiasi, yaitu berupa karantina tanaman induk sebagai sumber eksplan (Permadi *et al.* 2023). Karantina dapat dilakukan dengan memberi perlakuan fungisida dan bakterisida sistemik pada tanaman induk dalam jangka waktu tertentu. Menurut Mng'omba *et al.* (2007) pemberian fungisida sistemik melalui penyiraman secara teratur selama satu bulan sebelum inisiasi dapat mengeliminasi mikrob endofit yang terdapat dalam tanaman.

Secara umum, metode sterilisasi B1-B4 yang digunakan dalam penelitian sudah berhasil mematikan mikrob yang berada di permukaan eksplan, tetapi belum berhasil mematikan mikrob yang berada di dalam eksplan. Jumlah bahan sterilan yang digunakan dalam metode sterilisasi B1-B4 adalah 4–7 macam. Metode sterilisasi B3 dan B4 menggunakan HgCl₂ yang kurang ramah terhadap lingkungan, sehingga metode sterilisasi B1 dan B2 direkomendasikan untuk inisiasi gmelina dengan eksplan tunas apikal. Kultur tunas gmelina steril yang dihasilkan dari penelitian ini masih rendah, walaupun demikian kultur steril tersebut dapat diperbanyak melalui tahapan multiplikasi. Dalam penelitian ini, belum dihasilkan kultur daun gmelina

steril. Hal ini menunjukkan bahwa mikrob endofit lebih banyak terdapat pada daun gmelina dibandingkan dengan tunas gmelina.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Semua metode sterilisasi yang digunakan dalam penelitian ini berpengaruh sama terhadap keberhasilan inisiasi eksplan tunas dan daun gmelina. Jenis eksplan memengaruhi keberhasilan inisiasi. Keberhasilan inisiasi kultur tunas gmelina adalah sebesar 12,5%, sedangkan keberhasilan kultur daun gmelina sebesar 0%.

Saran

Semua metode sterilisasi yang digunakan dalam penelitian ini dapat menghasilkan kultur tunas gmelina steril, namun belum dapat menghasilkan kultur daun gmelina steril. Metode sterilisasi B1 dan B2 direkomendasikan untuk inisiasi gmelina dengan eksplan tunas apikal. Untuk meningkatkan persentase keberhasilan inisiasi, perlu diujicobakan praperlakuan (karantina) sebelum kegiatan inisiasi tunas atau daun gmelina.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinugraha HA, Setiadi D, Naibini A, Nyuwito. 2020. Pertumbuhan stek batang *Gmelina arborea* hasil koleksi dari lima populasi sebaran di Indonesia. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*. 14(2):85-93. doi: <http://dx.doi.org/10.20886/jpth.2020.14.2.83-91>.
- Ahmad S. 2020. Micropropagation study on *Gmelina arborea* Roxb. under salinity stress. *The Biobrio* 7(1&2):495-502.
- Alfian. 2006. Merkuri: *Antara Manfaat dan Efek Penggunaannya bagi Kesehatan Manusia dan Lingkungan*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Andriani D, Heriansyah P. 2021. Identifikasi jamur kontaminan pada berbagai eksplan kultur jaringan anggrek alam (*Bromheadia finlaysoniana* (Lind.) Miq. Agro Bali: *Agricultural Journal*. 4(2):192-199. doi: 10.37637/ab.v4i2.723.
- Ardiansyah R, Supriyanto, Wulandari AS, Subandy B, Fitriani Y. 2014. Teknik sterilisasi eksplan dan induksi tunas dalam mikropropagasi tembesu (*Fragrea fragrans* Roxb.). *Jurnal Silvikultur Tropika* 5(3):167-173. <https://journal.ipb.ac.id/index.php/jsilvik/article/download/9257/7265/>.
- Chornobrov O, Tkachova O. 2021. Optimisation of the protocol for sterilising explants of some deciduous woody plants in culture in vitro. *Ukrainian Journal of Forest and Wood Science* 12(3):80-83. DOI: 10.31548/forest2021.03.007.
- Darwesh OM, Zaied NS, Hassan SAM. 2024. Control of microbial contamination during the micropropagation process of some fruit trees. *Egypt. J. Agron.* 46(1):179-190. DOI: 10.21608/agro.2024.300442.1457.
- Gu M, Li Y, Jiang H, Zhang S, Que Q, Chen X, Zhou W. Efficient in vitro sterilization and propagation from stem segment explants of *Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst, a multipurpose woody plant.
- Plants 11:1-17. <https://doi.org/10.3390/plants11151937>
- Habibah NA, Sumadi, Ambar S. 2013. Optimasi sterilisasi permukaan daun dan eliminasi endofit pada burahol. *Biosaintifika*. 5(2):94-99. 10.15294/biosaintifika.v5i2.2748.
- Hadijah MH. 2013. Pengaruh perbedaan suhu awal air rendaman dan lama perendaman terhadap perkecambahan benih gmelina (*Gmelina arborea* Roxb.). *Jurnal Ilmiah agribisnis dan Perikanan*. 6(1):64-72. doi: <https://doi.org/10.29239/j.agrikan.6.1.64-72>.
- Helena A, Restiani R, Adityarini D. 2022. Optimasi antioksidan sebagai penghambat browning pada tahap inisiasi kultur in vitro bambu petung (*Dendrocalamus asper*). *Biota* 7(2):86-93. DOI: 10.24002/biota.v7i2.4715.
- Hilarino MPA, Silveira FAO, Oki Y, Rodrigues L, Santos JC, Junior AC, Fernandel GW, Rosa CA. 2011. Distribution of the endophytic fungi community in leaves of *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). *Acta Botanica Brasiliensis*. 25(4):1-5. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062011000400008>.
- Madke SS, Cherian KJ, Badere RS. 2021. Salicylic acid stimulates the biosynthesis of lignans in the cell suspension culture of *Gmelina arborea* Roxb. *J Indian Bot Soc.* 101(1&2):40-48. DOI:10.5958/2455-7218.2021.00005 X.
- Mng'omba SA, du Toit ES, dan Akinnifesi FK, Venter HM. 2007. Effective preconditioning methods for in vitro propagation of *Uapaca kirkiana* Muell Arg. tree species. *African Journal of Biotechnology*. [diakses 2022 Apr 21] 6(14):1670-1676. <https://academicjournals.org/AJB>.
- Montgomery DC. 2020. *Design and Analysis of Experiments*. Edisi ke-10. Hoboken, New Jersey, United States: John Wiley & Sons, Inc.
- Orlikowska T, Nowak K, Reed B. 2017. Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128(3):487–508. doi:10.1007/s11240-016-1144-9.
- Pais AK, da Silva AP, de Souza JC, Teixeira SL, Ribeiro JM, Peixotol AR, da Paz CD. 2016. Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of Gerbera hybrida cv. Essandre. *African Journal of Biotechnology*. 15(36):1995-1998. doi: 10.5897/AJB2016.15405.
- Pangestika D, Samanhudi, Triharyanto. 2015. Kajian pemberian IAA dan paclobutrazol terhadap pertumbuhan eksplan bawang putih. JKB. [diakses 2022 Apr 19]; 16(9):34-47. <https://jurnal.uns.ac.id/kewirausahaan-danbisnis/article/view/5082/4488>.
- Permadi N, Nurzaman M, Alhasnawi AN, Doni F, Julaeha E. 2023. Managing lethal browning and microbial contamination in *Musa* spp. tissue culture: synthesis and perspectives. *Horticulturae* 9:1-16. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9040453>.
- Rajbahak S, Rajkarnikar KM, Basnet P. 2016. Clonal propagation of *Gmelina arborea* Roxb. by nodal culture. *Bul. Dept. Pl. Res.* 38:102-105.

- Shofiyani A, Hajoeningtijas OD. 2010. Pengaruh sterilan dan waktu perendaman pada eksplan daun kencur (*Kaemfaria galanga* L.) untuk meningkatkan keberhasilan kultur kalus. 12(1):11-29. 10.30595/agritech. v12i1. 984.
- Suárez IE, Acosta CC, Gatti KC. 2013. In vitro multiplication of *Gmelina arborea* adult trees. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica.* 16(1):97-102. <https://doi.org/10.31910/RUDCA.V16.N1.2013.863>.
- Sudiyanti S, Rusbana TB, Susiyanti. 2017. Inisiasi tunas kokoleceran (*Vatica bantamensis*) pada berbagai jenis media tanam dan konsentrasi BAP (benzyl amino purine) secara in vitro. *Jurnal Agro* 4(1):1-14.