

PENGARUH SUBKULTUR DAN LAMA PERIODE KULTUR PADA DAYA MULTIPLIKASI TUNAS LADA (*Piper nigrum* L.) ASAL BIJI VARIETAS PETALING I

NATALINI NOVA KRISTINA dan NURLIANI BERMAWIE

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

RINGKASAN

Penelitian untuk melihat daya multiplikasi tunas lada (*Piper nigrum* L.) varietas Petaling I mulai dari tanam sampai terjadinya perubahan daya multiplikasi serta lama frekuensi kultur lada budidaya Petaling I telah dilakukan di laboratorium Pemuliaan Balitro dari bulan Mei 1997 sampai dengan Juni 1998. Bahan tanaman adalah biji masak petik yang diambil dari IP Cimanggu, Bogor. Biji dikecambahkan pada media MS tanpa zat pengatur tumbuh, setelah berkecambah tunas dipindahkan pada media multiplikasi yakni MS + BA 0.3 mg/l + polypynyl pyrolidon 200 mg/l untuk perlakuan subkultur maupun periode kultur. Pada perlakuan subkultur, eksplan dipindahkan ke media baru setiap 3 bulan. Pada perlakuan periode kultur eksplan diamati sampai 4 bulan kemudian dipindahkan ke media baru. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dan setiap perlakuan terdiri atas 10 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan multiplikasi tunas tertinggi didapat setelah subkultur yang ke-3 dengan jumlah 9.2 dan frekuensi subkultur terbaik adalah 3 bulan dengan jumlah tunas 9.3. Tunas mulai mati memasuki umur 4 bulan karena adanya senyawa fenol sehingga pH media menjadi lebih tinggi (7.13) dibandingkan pH awal (5.8).

Kata kunci : *Piper nigrum* L., subkultur, periode kultur, multiplikasi tunas

ABSTRACT

Effect subculture and culture period on shoot multiplication in black pepper Petaling I

An experiment on shoot multiplication in black pepper Petaling I from planting to until shoot multiplication changes and the effect of culture period, was conducted in the Laboratory of Genetic Research and Breeding of Balitro, Bogor from May 1997 to June 1998. The seeds were germinated on MS medium without growth regulator. After sprouting the shoots were removed to MS multiplication medium + BA 0.3 mg/l + polypynyl pyrolidon 200 mg/l for subculture and culture period. In the subculture experiment, explant was removed after 3 months to new medium. In the culture period the explant was visible until 4 months after that, explant was removed to new medium. The results showed that the highest multiplication rate was found after 3rd subculture with 9.2 shoots and the best culture period was three months with 9.3 shoots. After 4th months the shoots died, due to fenolic activity which changed pH medium from acidic (5.8 to basic 7.13).

Key words : *Piper nigrum* L., subculture, culture period, shoot multiplication

PENDAHULUAN

Lada (*Piper nigrum* L.) merupakan salah satu komoditas ekspor yang memberikan perolehan devisa yang cukup tinggi. Produksi lada Indonesia tahun 1995 mencapai 59 000 ton atau 31.25% dari produksi total dunia. Ekspor lada pada tahun yang sama mencapai 56 100 ton dengan nilai 168 juta US\$ (YONG, 1996).

Saat ini terdapat ± 48 nomor koleksi lada budidaya, satu di antaranya adalah varietas Petaling I, yang merupakan varietas unggul lada yang telah dilepas dengan potensi hasil (4.48 ton/ha) dan mutu hasil yang tinggi. Akan tetapi varietas ini sangat peka terhadap serangan penyakit BPB yang disebabkan oleh *Phytophthora capsici* yang dapat menyebabkan kematian pada tanaman (HAMID *et al.*, 1988).

Sebagai salah satu sumber genetik yang sangat potensial, kelestarian tanaman ini perlu dijaga. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan konservasi secara *in vitro*. Sebelum dilakukan penyimpanan maka perlu diketahui daya multiplikasi tunas bila dikultur secara *in vitro*. Hal ini perlu dilakukan karena respon setiap varietas terhadap kultur *in vitro* cenderung berbeda, tergantung kepada kondisi genetik tanaman tersebut. Di samping itu untuk mendapatkan bahan tanaman lada dalam jumlah banyak dan dalam waktu singkat serta terbebas dari serangan penyakit, kultur *in vitro* merupakan salah satu teknik perbanyakan yang diharapkan memberikan jalan keluar yang tepat. MARISKA *et al.* (1998) dan PATRIAWATI (1992) telah menerapkan teknik ini pada lada varietas Lampung Daun Lebar. Hasil yang didapatkan menunjukkan media yang terbaik untuk multiplikasi tunas adalah Murashige Skoog (MS) + Benzil Adenin (BA) 5 mg/l + NAA 1 mg/l dengan jumlah 7 tunas selama 8 minggu, tetapi pada media terbentuk fenol yang berpengaruh tidak baik terhadap pertumbuhan eksplan.

HUSNI *et al.* (1994) menyatakan untuk multiplikasi tunas lada budidaya varietas Lampung Daun Lebar lebih baik menggunakan media MS+BA 0.3 mg/l + polypynyl pyrolidon 200 mg/l. Penambahan polypynyl pyrolidon bertujuan untuk mengatasi masalah fenol.

Menurut MARISKA *et al.* (1994) media yang mengandung komposisi sama dapat digunakan pada tanaman dari satu genus pada tanaman *Pelargonium graveolens* dan *Pelargonium tomentosum*. Penggunaan media MS dengan penambahan BA 2 mg/l + NAA 0.5 mg/l yang masing-masing memberi jumlah tunas 6/bulan dan 10/2 bulan. Pada tanaman dari satu keluarga seperti jahe dan temu putri dapat digunakan media MS + BA 5 mg/l dan masing-masing memberikan jumlah tunas 9-10/2 bulan dan 3.75/bulan. Tampaknya media MS merupakan media yang cocok untuk multiplikasi tunas pada berbagai jenis tanaman. KRISTIANSSEN (1992) juga menggunakan media yang sama yakni MS + 8.9 μ M BA pada 8 klon *Ficus benyamina*.

Pada beberapa tanaman, dengan media multiplikasi yang sama, perlakuan subkultur terus menerus tidak mengurangi daya multiplikasi tunas, seperti pada nilam,

mentha, dan pulepandak (SESWITA, komunikasi pribadi), inggu serta lada liar (*Piper colibrinum* pink) (KRISTINA, tidak dipublikasikan). Tetapi pada tanaman-tanaman tertentu subkultur terus-menerus dapat menurunkan daya regenerasi tunas seperti yang dinyatakan oleh LAUZER *et al.* (1992), yang mencoba pada tanaman *Dioscorea abyssinica* dan *D. mangelotiana* serta PIUS *et al.* (1993) pada tanaman pearl millet (*Pennisetum americanum*). Penelitian ini bertujuan melihat daya multiplikasi tunas asal biji mulai dari tanam sampai terjadinya perubahan daya multiplikasi dan pengaruh lama subkultur pada tanaman lada budidaya varietas Petaling I dengan menggunakan media MS.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Pemuliaan dan Plasma Nutfah Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor mulai bulan Mei 1997 sampai Juni 1998. Bahan yang digunakan adalah biji lada varietas Petaling I yang telah masak, dan berasal dari pohon induk di IP Cimanggu-Bogor, yang dilakukan secara bertahap.

Pengaruh Subkultur

Bahan tanaman disediakan dengan cara mengecambahkan biji untuk multiplikasi tunas, Biji dicuci, kulit biji dibuang lalu disabun, kemudian dibilas dengan air mengalir. Sebelum diberi alkohol, biji direndam dalam larutan Dithane M-45 selama 1 jam. Sterilisasi dilanjutkan berturut-turut dengan menggunakan alkohol 70% selama 5 menit, HgCl₂ selama 5 menit, cloroks 30% selama 15 menit, cloroks 20% selama 10 menit dan betadine selama 30 menit. Selanjutnya biji dikecambahkan pada media dasar Murashige dan Skoog tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Botol disimpan dalam rak kultur dalam suasana gelap (tidak mendapat cahaya).

Perlakuan Subkultur

Tunas baru muncul setelah dikecambahkan selama 1 bulan, tunas dibiarkan sampai tumbuh sempurna (menjadi tinggi dan bermultiplikasi). Setelah jumlah tunas mencukupi dilakukan penelitian subkultur. Subkultur ke I dilakukan dengan cara memotong tunas-tunas tersebut dan dipindahkan pada media MS + BA 0.3 mg/l + Polypynyl pyrolidon 200 mg/l. Setelah 3 bulan dicatat perkembangan tunas dan penampilannya. Kemudian dilakukan subkultur ke-2 dengan cara memotong dan memindahkan tunas-tunas tersebut kembali pada media baru. Diamati jumlah tunas dan kemungkinan-kemungkinan yang terjadi. Hal yang sama dilakukan pada perlakuan subkultur ke-3 dan ke-4.

Semua botol yang telah berisi eksplan tersebut disimpan dalam rak kultur yang mendapat intensitas cahaya 1 000 lux selama 16 jam sehari. Penelitian disusun dalam rancangan acak lengkap, diulang 10 kali.

Pengaruh Lama Waktu Kultur

Tunas terbaik dari biji yang telah berkecambah ditanam pada media MS + BA 0.3 mg/l Polypynyl pyrolidon 200 mg/l. Botol yang telah berisi eksplan ini disimpan dalam rak kultur yang diberi cahaya dengan intensitas 1 000 lux selama 16 jam per hari. Selanjutnya dilihat daya multiplikasi tunas setelah masa kultur 1, 2, 3 sampai 4 bulan. Dengan cara mendiarkan tunas pada media perlakuan selama periode waktu tersebut.

Untuk pengukuran pH dilakukan dengan memindahkan tunas ke media baru, dan media yang lama diukur pHnya.

Perlakuan ini disusun dalam rancangan acak lengkap dan diulang 10 kali, dengan parameter pengamatan jumlah tunas dan perubahan-perubahan yang terjadi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Subkultur

Tunas yang dikulturkan pada subkultur ke-1 (tiga bulan pertama), daya multiplikasi tunas masih rendah, pada saat ini zat pengatur tumbuh baru diserap oleh tunas dan pada subkultur ke-2 mulai terjadi penambahan jumlah tunas. Daya multiplikasi tertinggi ditemukan pada subkultur ke-3 sebanyak 9.2 tunas (Tabel 1). HUSNI *et al.* (1994) melaporkan pada lada budidaya varietas Lampung Daun

Tabel 1. Rata-rata jumlah tunas pada subkultur sampai subkultur keempat
Table 1. The Average number of shoots up to 4th subculture

Kondisi eksplan Explant condition	Jumlah tunas* Shoot number
Subkultur 1	3.6 b
Subculture 2	3.9 ab
3	9.2 a
4	6.3 ab
KK CV (%)	32.62

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% uji DMRT

* Data transformasi $\sqrt{x} + 0.5$

Note : Numbers followed by the same letters are not significantly different at 5% level DMRT

* Data transformed $\sqrt{x} + 0.5$

Lebar rata-rata jumlah tunas pada media MS + BA 0.3 mg/l + Polypynyl pyrolidon 200 mg/l adalah sebesar 2.75. Perbedaan daya multiplikasi antara varietas LDL dan Petaling 1 kemungkinan karena adanya perbedaan respon tanaman terhadap media yang disebabkan oleh perbedaan genetik. Hal ini didukung oleh hasil penelitian pola pita pada isozim MDH (Malat dehidrogenase), SKDH (Shikimik dehidrogenase) dan EST (Esterase) di mana Petaling 1 memiliki pola pita yang berbeda dengan LDL padahal Petaling 1 berasal dari LDL nomor 4 (BERMAWIE *et al.*, 1998).

Pada subkultur ke-4, daya multiplikasi mulai turun, tetapi jumlah tunas masih lebih tinggi dari subkultur ke-1 dan ke-2 walaupun tidak berbeda nyata secara statistik. Menurunnya jumlah tunas ini, diduga karena tanaman telah jenuh akan zat pengatur tumbuh sehingga perlu dicari media yang tepat. Analisis koefisien keragaman menunjukkan angka yang cukup tinggi diduga karena adanya keragaman bahan tanaman yang berasal dari biji.

Pada tanaman jahe sampai dengan subkultur ke-7 jumlah tunas yang dihasilkan tetap tinggi yaitu 9.7, di mana vigor tanaman tetap normal (MARISKA *et al.*, 1998). Penurunan daya tumbuh eksplan jahe terjadi setelah memasuki periode kultur ke-9 dengan rata-rata jumlah tunas 8.5 (HERWINIA, 1993). KRISTIENSEN (1992) menyatakan pada 8 klon *Ficus benyamina* laju proliferasi tunas pada subkultur ke-8 sekitar 3.16-3.76.

Pada beberapa tanaman, walaupun telah berkali-kali disubkultur tidak terjadi penurunan daya tumbuh atau perubahan karakteristik bila dilihat secara nyata. Oleh sebab itu WETHERELL (*dalam* SANTOSO, 1995) menganjurkan periode subkultur sebaiknya paling banyak 3-6 kali. Periode subkultur yang tinggi, di satu pihak dapat menghemat tenaga, biaya, dan waktu, tetapi di lain pihak dikhawatirkan dapat terjadi perubahan genetik pada tanaman.

Pengaruh Lama Subkultur

Pada periode kultur 2 bulan dengan menggunakan media MS + BA 0.3 mg/l + Thidiazuron 2 mg/l MARISKA *et al.* (1994) mendapatkan 4-5 tunas lada lampung Daun

Tabel 2. Rata-rata jumlah tunas setelah 1-4 bulan kultur
Table 2. The Average number of shoot after 1 to 4 months culture

Periode kultur (bulan) Culture period (month)	Jumlah tunas * Shoot number
1	3.7 bc
2	5.8 b
3	9.3 a
4	3.9 c
KK CV (%)	25.32

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% uji DMRT

* Data transformasi $\sqrt{x} + 0.5$

Note : Numbers followed by same letters are not significantly different at 5% level DMRT

* Data transformed $\sqrt{x} + 0.5$

Tabel 3. Pengaruh lama subkultur terhadap eksudasi/sekresi fenol
Table 3. Effect of subculture period to exudation

Lama kultur (bulan) Culture period (month)	% media mengandung fenol % media containing phenol
1	0
2	0
3	10
4	60

Lebar. Pada Petaling 1 frekuensi subkultur yang terbaik adalah setelah 3 bulan, di mana jumlah tunas mencapai 9.3 (Tabel 2).

Periode yang sama juga terjadi pada tanaman jahe di mana frekuensi subkultur terbaik adalah 3 bulan (MARISKA *et al.*, 1994).

Walaupun pada media telah ditambahkan Polypynyl pyrolidon yang berfungsi untuk menghambat pembentukan fenol, tetapi pada saat kultur 3 bulan, fenol mulai keluar yang terlihat dari perubahan warna media dari putih menjadi cokelat (Tabel 3).

Menurut HARBORNE (1987) reaksi pembentukan warna cokelat disebabkan karena enzim fenolase yang dibebaskan bereaksi dengan fenol membentuk kuinon dengan adanya oksigen sehingga menghambat pertumbuhan tunas. Lada termasuk tanaman yang menghasilkan fenol yang tinggi, sehingga berpengaruh terhadap pertumbuhan *in vitro*. Pengamatan menunjukkan bahwa lada budidaya mengeluarkan fenol yang lebih tinggi dari lada liar. WINATA (1987) menyatakan, selain Polypynyl pyrolidon, masalah pencokelatan dapat diatasi dengan menggunakan vitamin C dan charcoal. SURYOWINOTO (1996) menyatakan masalah senyawa fenolik ini dapat diatasi dengan penambahan larutan sistein ke dalam medium tumbuh.

Bila kultur dидiamkan selama 4 bulan berpengaruh tidak baik pada eksplan, di mana sebagian kultur medianya menjadi cokelat yang dapat menyebabkan kematian tunas. Kematian tunas terjadi kemungkinan karena terjadinya perubahan pH media dari asam ke basa. Hal ini didukung oleh GAMBORG dan SHYLUK (*dalam* WINATA, 1987), bahwa sel-sel tanaman membutuhkan pH yang sedikit asam berkisar antara 5.5-5.8. SURYOWINOTO (1996) menyatakan pH medium budidaya *in vitro* kebanyakan memakai derajat kemasaman berkisar 4.8-5.6. Hasil pengujian yang dilakukan menunjukkan tunas dapat tumbuh pada pH 4.43 sampai 5.8. Bila pH media lebih tinggi kemampuan tumbuh tunas menjadi menurun. Pada tanaman lada ini, penurunan daya tumbuh terjadi karena adanya eksudat fenol yang merubah pH media menjadi lebih tinggi dari pH awal (Tabel 4).

Tabel 4. Pengaruh lama subkultur terhadap pH media
Table 4. Effect of subculture period to pH medium

Kondisi media Medium condition	pH pH
pH awal <i>pH beginning</i>	5.8
1 bulan setelah kultur <i>1 month after culture</i>	4.45 - 5.13
2 bulan setelah kultur <i>2 months after culture</i>	4.43 - 5.52
3 bulan setelah kultur <i>3 months after culture</i>	± 5.6
4 bulan setelah kultur <i>4 months after culture</i>	± 7.13

Tabel 5. Penampilan tunas setelah 4 bulan kultur
Table 5. Shoot performance after 4 months culture

Penampilan tunas Shoot performance	Tinggi Height	Jumlah daun Number of leaves
Normal <i>Normal</i>	4.22 a	17.8 a
Setelah 4 bulan <i>After 4 months</i>	2.08 b	5.3 b

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap kolom tidak berbeda nyata pada taraf 5% uji DMRT
Note : Numbers followed by same letters in each column are not significantly different at 5% level DMRT

Di samping itu periode kultur yang panjang (4 bulan) berpengaruh terhadap penampilan tunas. Pertumbuhan agak terhambat, batang menjadi gemuk pendek, daunnya pucat dan kurus panjang, berbeda dengan tunas hasil periode kultur 3 bulan (Tabel 5). Perubahan seperti ini terlihat juga pada LDL yang telah mengalami periode kultur selama 5 tahun (HUSNI *et al.*, 1994).

Menurut WETHERELL (dalam SANTOSO, 1995) secara teori ada tiga masalah yang dapat menyebabkan kerusakan kultur-kultur tersebut, yaitu terjadinya perubahan genetik kekurangan nutrisi, dan penyakit. Dalam penelitian ini cenderung diduga terjadinya perubahan fisiologis, di mana tunas mengalami kekurangan nutrisi. Hal ini didukung oleh pernyataan MARISKA *et al.* (1994) periode subkultur sebaiknya dilakukan setiap tiga bulan, agar tidak terjadi perubahan fisiologis.

KESIMPULAN

Media dasar Murashige dan Skoog + BA 0.3 mg/l + Polypynyl pyrolidon 200 mg/l dapat digunakan sebagai media multiplikasi tunas lada varietas Petaling 1. Pada tahap subkultur ke-3 merupakan jumlah tunas tertinggi dengan rata-rata jumlah tunas 9.2. Subkultur sebaiknya

dilakukan setiap 3 bulan sekali. Untuk menghindari kematian tunas yang disebabkan oleh adanya senyawa fenol pada media.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan pada saudara Dedi Surachman dan Siti Aisyah yang telah membantu dari awal hingga selesainya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- BERMAWIE, N. SYAFARUDDIN, dan N.N. KRISTINA. 1998 Karakterisasi dan evaluasi plasma nutfah tanaman lada. Laporan Tahunan 1997/1998. Balittro 12p (belum dipublikasikan)
- HAMID, A. Y. NURYANI, R. KASIM, D. SITEPU, P. LAKSMANA-HARDJA, dan P. WAHID 1988. Pelepasan varietas lada unggul. Medikom Puslitbangtri (2) :15-19.
- HARBORNE, J. B. 1987. Metode fitokimia (Phyto-chemical Methods). Penuntun Era Modern Menganalisa Tumbuhan. 2nd. ED. ITB Bandung, Terjemahan PADMAWINATA, K. dan SOEDIRO. 1.310p.
- HERWINIA, M. 1993. Pengaruh padat dan cair serta penambahan kombinasi benzyl adenin (BA) dengan adenin sulfat, air kelapa dan arang aktif terhadap organogenesis jaringan tanaman jahe (*Zingiber officinale* Rosc.). FMIPA-UNPAD. Bandung. 64p.
- HUSNI, A., N.N. KRISTINA, dan MARISKA. 1994. Pelestarian in vitro dengan cara penyimpanan dalam keadaan tumbuh pada beberapa tanaman industri. Makalah penunjang pada Simposium Hasil-hasil Penelitian Tanaman Industri, Cipayung 21-23 November. 14p. Belum diterbitkan.
- KRISTIANSEN, K. 1992. Micropropagation of *Ficus benay-mina* clones. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 28 (1) :53-58.
- LAUZER, D.G. LAUBLIN, G. VINCENT and M. CAPPADOCIA. 1992. In vitro propagation and cytology of wild Yams, *Dioscorea abyssinia* Hoch and *D. mangenotiana* Miede. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28 (2):215-223.
- MARISKA, I. HOBIR dan D. SUKMADJAYA 1994. Perkembangan penelitian bioteknologi tanaman industri. Makalah pada Prosiding Simposium II Hasil Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri. Cipayung-Bogor, 21-23 November 1994. 9p.

