Menara Perkebunan, 2006, 74(2), 63-75.

Teknik sambung mikro *in vitro* kina *Cinchona succirubra* dengan *C. ledgeriana*

In vitro *micrografting technique of* Chincona succirubra *and* C. ledgeriana*.*

Nurita TORUAN-MATHIUS[1), LUKMAN [2) &
AGUS - PURWITO [3)

[1) SEAMEO BIOTROP, Bogor, Indonesia
[2) Fakultas Pertanian, Universitas Malikussaleh , Lhokseumawe, Banda Aceh, Indonesia
[3) Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia

Summary

In vitro *micrografting is a technique for grafting scions to rootstocks of plantlets from tissue culture.* In vitro *micrografting of* Cinchona *plant has never been carried out. The objective of this research was to obtain the best method of* in vitro *micrografting, medium for micrografted plantlets, and acclimatization for* Cinchona *plantlets from micrografting. The research consisted of (i) optimization of micrografting method, (ii) optimization of medium for growing plantlets, and (iii) acclimatization of micrografted plantlet. Plantlets of four-month-old of* C. ledgeriana *QRC clone were used as scions, while of* C. succirubra *as rootstocks. Each of experiment was arranged according to Completely Randomized Design, consisted of combination of scion and rootstock and type of micro-grafting with 10 replicates. Parameters measured were the percentage of survived plantlet, leaf number, and callus productions on union area, and percentage of survived plantlet. The results show that V type of micrografting was the best for Cinchona micrografting. MS medium with the addition of 3 mg/L IBA was the best medium for growing of micrografted plantlet. Husk charcoal mixed with top soil (1 : 1) was the best medium for acclimatization. Acclimatization consisted of two steps: preaclimatization in a culture room with 12- hour photoperiod at temperature 25 – 27^{o}C for two weeks, followed by aclimatization in a plastic house with 70% reduced light intensity for one month. Using this method, 90% of the seedlings were survived. It is concluded that* in vitro *micrografting can be used as a technique for clonal propagation of* Cinchona *sp.*

[*Keywords: Cinchona succirubra*, *C. ledgeriana, in vitro* micrografting, micrografting type, micrografting medium, acclimatization].

Ringkasan

Teknik sambung mikro (mikrografting) *in vitro* adalah teknik penyambungan potongan batang atas pada batang bawah dalam kultur jaringan. Pada tanaman kina teknik sambung mikro *in vitro* belum pernah dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah menetapkan tipe sambung mikro, medium terbaik untuk planlet hasil sambung mikro, dan perbanyakan tanaman kina dengan sambung mikro. Pelaksanaan percobaan meliputi (i) optimasi tipe sambung, (ii) optimasi medium, dan (iii) aklimatisasi planlet hasil sambung mikro. Bahan tanaman yang digunakan sebagai batang atas adalah planlet *Cinchona ledgeriana* klon QRC, sedang sebagai batang bawah digunakan planlet *C. succirubra*, berumur empat bulan. Masing-

[1) Penulis korespondensi e-mail: toruan@biotrop.org

masing percobaan disusun dengan Rancangan Acak Lengkap terdiri dari dua taraf yaitu kombinasi batang bawah dengan batang atas bentuk sambung tipe V dan L dilakukan dengan 10 ulangan. Peubah yang diukur meliputi persentase planlet yang bertahan hidup, jumlah daun, berkalus atau tidak berkalus pada daerah pertautan, dan persentase planlet yang bertahan hidup. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tipe V merupakan cara sambung mikro yang terbaik. Medium MS dengan penambahan 3 mg/L IBA adalah medium terbaik untuk pertumbuhan dan perakaran planlet hasil sambung mikro. Aklimatisasi planlet dilakukan dengan medium tumbuh arang sekam : top soil (1 : 1) yang disterilkan. Tahapan aklimatisasi adalah pre-aklimatisasi dalam ruang kultur suhu 25 - 27 ^{o}C dengan pencahayaan 12 jam per hari dan diikuti dengan aklimatisasi di rumah plastik bernaungan 70% paranet. Dengan metode aklimatisasi ini 90% dari bibit mampu bertahan hidup. Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan bahwa teknik sambung mikro dapat digunakan untuk perbanyakan klonal *Cinchona* sp.

Pendahuluan

Kina (*Cinchona succirubra* dan *C. ledgeriana*) merupakan tanaman industri penghasil senyawa alkaloid yang dapat digunakan dalam industri farmasi, kosmetik, industri makanan dan minuman serta agrokimia lainnya (Widayat, 2000). Empat jenis alkaloid utama tanaman kina adalah kinin, kinidin, sinkonin dan sinkonidin. Kinin digunakan sebagai bahan tonik perantara senyawa pembuat vitamin B dan obat anti malaria, sedangkan kinidin digunakan sebagai obat pengatur irama denyut jantung (Dayrit *et al*., 1994).

Indonesia merupakan penghasil alkaloid kina berupa garam kina. Akan tetapi sampai saat ini hasil tersebut masih belum mencukupi kebutuhan karena penanaman masih terbatas. Usaha untuk pemenuhan kebutuhan garam kina adalah melalui perluasan areal dan peremajaan tanaman. PTPN VIII merencanakan untuk melakukan perluasan areal hingga tahun 2008 mencapai 10.000 Ha (Santoso & Wibowo, 2000). Sehubungan dengan hal itu diperlukan penyediaan bibit yang berkualitas dengan kandungan kinin tinggi dan tahan terhadap penyakit akar dalam jumlah yang banyak. Sampai saat ini penyediaan bahan tanaman kina dilakukan dengan teknik semai sambung dan setek sambung.

Semai sambung dan setek sambung adalah penyambungan yang dilakukan di lapang dimana sebagai batang bawah digunakan *C. succirubra* berumur 15 bulan, sedangkan batang atas digunakan *C. ledgeriana* berumur 8-12 bulan. Kedua teknik tersebut banyak kelemahannya antara lain tingginya tingkat inkompatibilitas, rendahnya persentase tanaman yang berhasil hidup dengan baik, sulit mendapatkan bahan sambung dalam jumlah yang banyak, dan persiapan bahan tanaman membutuhkan waktu yang lama. Bibit siap dipindah ke lapang setelah berumur 2,5 tahun (Santoso & Wibowo, 2000).

Salah satu cara untuk mengatasi masalah di atas adalah dengan menggunakan teknologi sambung mikro *in vitro,* yang selanjutnya disebut sambung mikro. Sambung mikro adalah perbanyakan vegetatif yang dilakukan dalam kondisi aseptik dengan menggunakan teknik kultur *in vitro* yang bertujuan untuk menggabungkan keunggulan sifat batang bawah dan batang atas. Keunggulan penggunaan sambung mikro adalah dapat mempersingkat waktu penyediaan bibit sambung, menghasilkan tanaman bebas penyakit, tanaman lebih seragam, dan dapat diproduksi dalam jumlah yang banyak serta rendahnya inkompatibilitas (Mariska, 1985; Pasquale *et al*., 1999; Estrada-Luna *et al.,* 2002; Turnbull *et al*., 2002; Kala *et al*., 2002). Di samping itu dapat mengetahui secara dini hasil sambung mikro yang kompatibel atau yang tidak kompatibel (Errea *et al*., 2001).

Raghothama (1999) menyatakan bahwa pada sambung mikro *Arabidopsis* yang kompatibel hubungan timbal balik antara batang bawah dan batang atas terjadi secara normal. Holbrook *et al.* (2002) juga menyatakan hubungan antara batang bawah dan batang atas mempengaruhi keragaman dalam pola distribusi hara, kemampuan hara untuk bergerak melintasi bagian penyatuan sambungan, dan regulasi transpor hormon.

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan sambung mikro adalah tipe penyambungan batang bawah dan batang atas yang digunakan. Metode sambung umumnya tergantung pada spesies tanaman yang disambung. Beberapa tipe penyambungan yang umum digunakan adalah *tounge approach grafting,* penyambungan dengan penyisipan, penyambungan dengan pemotongan, penyambungan dengan pemotongan miring, horizontal, dan penyambungan dengan bantuan selang plastik. Di samping itu ada juga penyambungan berbentuk V dan L (Oda, 1995; Lee *et al*.,1998; Suzuki *et al.,* 1998). Lukman *et al*. (2005) menyatakan bahwa keberhasilan sambung mikro antara manggis dan mundo tipe V mencapai 76 %, dan bentuk sambung tipe V lebih baik dari yang lainnya. Estrada-Luna *et al*. (2002) berhasil melakukan sambung mikro tipe V dan mendatar pada kaktus.

Kala *et al*. (2002) menyatakan bahwa medium merupakan faktor utama dalam penentuan keberhasilan perakaran sambung mikro. Induksi perakaran pada planlet sambung mikro perlu dirangsang dengan menggunakan IBA. Sebanyak IBA 10 µM IBA merupakan konsentrasi terbaik untuk perakaran jambu mente (Bogetti *et al*., 2001), dan 2 mg/L untuk planlet kina (Santoso *et al*., 2004). Yunita (2002) melaporkan bahwa perendaman planlet melinjo dalam 500 mg/L IBA sebelum diaklimatisasi dapat merangsang perakaran pada tahap aklimatisasi. Pertumbuhan akar yang baik pada saat pengkulturan planlet sangat penting untuk mempertahankan kemampuan hidup yang tinggi pada aklimatisasi dan pasca aklimatisasi.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui (i) tipe sambung sambung mikro yang terbaik, (ii) medium yang terbaik untuk planlet hasil sambung mikro, dan (iii) teknik aklimatisasi planlet hasil sambung mikro.

Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Biomolekuler Tanaman, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI), Bogor. Penelitian ini terdiri atas tiga percobaan yaitu (a) optimasi tipe sambung antara batang bawah dan batang atas, (b) optimasi medium, dan c) aklimatisasi planlet hasil sambung *in vitro* mikro.

Optimasi tipe sambung mikro

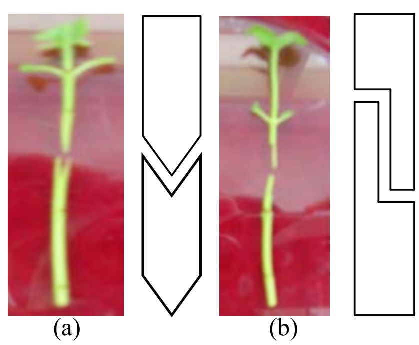
Eksplan yang digunakan adalah *C. succirubra* dan sebagai batang atas *C. ledgeriana* klon QRC205 hasil kultur *in vitro* berumur tiga bulan (Santoso *et al*., 2004). Tipe sambung yang diuji adalah tipe V dan tipe L (Gambar 1). Bagian planlet yang digunakan untuk batang bawah dipotong sepanjang dua buku dari pangkal batang bawah, sedangkan sebagai batang atas dipotong dua buku dari tajuk. Batang bawah yang dipersiapkan harus seragam yaitu memiliki diameter yang sama atau sedikit lebih besar dari batang atas. Bagian tajuk batang bawah dipangkas kemudian dibuat sayatan sesuai perlakuan yaitu tipe V dan tipe L sepanjang 1 cm dengan menggunakan pisau skalpel. Sayatan batang atas dibuat sesuai dengan sayatan batang bawah, baik bentuk maupun ukurannya. Selanjutnya batang atas ditancapkan pada batang bawah yang sudah disayat. Untuk memperkokoh sambungan eksplan diikat dengan menggunakan alumunium foil yang sudah disterilkan, kemudian dikulturkan pada medium sambung mikro. Selanjutnya kultur diinkubasi di ruang inkubasi pada suhu 25-27 ^{o}C dengan pencahayaan 12 jam per hari.

Percobaan dilaksanakan menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktor tunggal (RAL) dengan dua taraf yaitu kombinasi batang bawah dengan batang atas tipe V dan kombinasi batang bawah dengan batang atas tipe L dengan 10 ulangan, setiap ulangan terdiri dari satu botol dan setiap botol terdiri dari tiga planlet. Peubah yang diukur meliputi persentase planlet yang bertahan hidup, jumlah eksplan yang berkalus, jumlah daun. Pengamatan dilakukan sampai minggu kedelapan dengan selang pengamatan satu minggu setelah sambung mikro.

Untuk menetapkan pengaruh perlakuan tipe sambung akibat sambung mikro antara batang bawah dan batang atas, maka data hasil pengamatan ditransformasi dengan $\sqrt{X+0,5}$. Data hasil transformasi dianalisis sidik ragam dan uji beda Duncan dengan menggunakan program *Statistical Analysis System* (SAS) versi 6,12.

Medium sambung mikro

Medium yang digunakan adalah Murashige & Skoog (1962) dengan penambahan 1, 2, 3, dan 4 mg/L IBA. Percobaan disusun dengan Rancangan Acak Lengkap faktor tunggal (RAL)



Gambar 1. Tipe sambung mikro batang atas *C. ledgeriana* dengan batang bawah *C. succirubra* (a) tipe V dan (b) tipe L.

Figure 1. Type of micrografting scion C. ledgeriana *and rootstock* C. succirubra *(a) V and (b) L types.*

dengan empat taraf konsentrasi IBA masing-masing percobaan diulang 10 kali, setiap ulangan terdiri dari satu botol dan berisi tiga planlet. Eksplan yang digunakan adalah planlet *C. succirubra* sebagai batang bawah dan planlet *C. legderiana* sebagai batang atas, berumur empat bulan sesudah dikulturkan dengan tipe sambung yang terbaik pada percobaan sebelumnya. Planlet hasil sambung mikro selanjutnya dikulturkan pada medium perakaran dan diinkubasi di ruang inkubasi, serta peubah yang diukur dan analisis data dilakukan dengan menggunakan metode seperti pada percobaan sebelumnya.

Aklimatisasi

Medium yang digunakan adalah medium yang terbaik berdasarkan metode Santoso *et al*. (2004) yaitu arang sekam : top soil (1 : 1). Aklimatisasi dilakukan dalam dua tahap, yaitu (1) aklimatisasi di ruang kultur ber AC pada suhu 25-27 ^{o}C dengan pencahayaan 12 jam per hari, dan (2) aklimatisasi di rumah plastik bernaungan paranet 70%.

Medium aklimatisasi dimasukkan ke dalam gelas Aqua setinggi 9 cm. Dalam setiap gelas yang berisi medium ditanam satu planlet dan diberi sungkup plastik transparan. Selanjutnya planlet ditempatkan di ruang kultur, setelah satu minggu sungkup dibuka satu jam per hari, dan setelah minggu kedua dan ketiga sungkup dibuka selama dua jam per hari. Setelah minggu keempat planlet dipindah ke rumah plastik bernaungan paranet 70%. Medium yang digunakan pada aklimatisasi di lapang sama dengan medium pada aklimatisasi dalam ruang kultur. Untuk menjaga kelembaban dilakukan penyungkupan secara kolektif. Pada umur tiga minggu sungkup dibuka secara bertahap mulai 30 menit perhari, satu jam per hari hingga sungkup dapat dibuka seluruhnya. Percobaan ini dilakukan selama dua bulan. Peubah yang diukur adalah persentase planlet yang dapat bertahan hidup dengan baik.

Hasil dan Pembahasan

Tipe sambung mikro

Hasil percobaan pengaruh tipe sambung mikro dengan batang bawah *C. succirubra* (CS) dan batang atas *C. ledgeriana* (CL) terhadap kecepatan pertumbuhan planlet kina, menunjukkan bahwa pertumbuhan planlet dari hasil sambung tipe L baru terjadi pada minggu kedua setelah mikrografting, dan meningkat pada minggu ketiga, pertumbuhan planlet mulai serempak mencapai 100% pada minggu keempat. Pada bentuk sambung tipe V planlet mulai tumbuh pada minggu kedua dan pertumbuhan planlet mulai serempak (100%) pada minggu ketiga (Tabel 1). Dapat disimpulkan bahwa kecepatan pertumbuhan planlet dari hasil sambung tipe V lebih cepat satu minggu dibandingkan dengan pertumbuhan planlet dengan sambung tipe L. Pengaruh bentuk sambung tipe L dan tipe V terhadap jumlah daun planlet pada minggu pertama hingga minggu kedelapan menunjukkan terjadi perbedaan yang nyata dimana bentuk sambung tipe V lebih baik dari bentuk sambung tipe L kecuali pada minggu pertama (Tabel 2). Perbedaan pertumbuhan planlet yang tidak nyata pada minggu pertama diduga disebabkan planlet sedang dalam tahap inisiasi kalus untuk penyembuhan luka akibat perlakuan sambung mikro. Keadaan ini akan berakhir setelah terjadinya pertautan antara jaringan kambium batang

Tabel 1. Pengaruh kombinasi batang atas/batang bawah dan tipe sambung terhadap persentase planlet yang hidup umur 1 sampai 5 minggu.

Table 1. The effect of stock-scion combination on percentage of survived plantlets at 1 to 5 week old.

Kombinasi batang bawah/ batang atas dan tipe sambungan *Rootstock/scion combination and micrografting type*	Planlet yang bertahan hidup pada minggu ke *Plantlet survival in weeks* (%)				
	1	2	3	4	5
CS/CL-L	0	2	56	100	100
CS/CS-L	0	16	60	100	100
CL/CL-L	0	0	52	100	100
Rata-rata (*Average)*	0	6	56	100	100
CS/CS-V	0	64	100	100	100
CS/CL-V	0	76	100	100	100
CL/CL-V	0	50	100	100	100
Rata-rata (*Average)*	0	63	100	100	100

bawah dan batang atas dengan sempurna.

Menurut Hartmann *et al.* (1997) dalam proses penyembuhan pada planlet yang terluka masing-masing sel baik planlet batang bawah dan batang atas membentuk jaringan kalus berupa sel-sel parenkim. Sel-sel parenkim dari batang bawah dan batang atas saling kontak, menyatu dan membaur, sel-sel parenkima yang terbentuk dan terdiferensiasi membentuk kambium sebagai lanjutan dari lapisan kambium batang bawah dan batang atas yang lama. Dari lapisan kambium akan terbentuk jaringan pembuluh sehingga proses translokasi hara dari batang bawah ke batang atas atau sebaliknya hasil fotosintesis dari batang atas ke batang bawah berlangsung sebagaimana mestinya.

Kala *et al*. (2002) melaporkan bahwa sambung mikro pada planlet karet mulai tumbuh dengan baik pada berumur tiga minggu setelah perlakuan. Proses penyembuhan luka pada planlet akibat sambung berbeda-beda tergantung dari jenis dan karakter dari planlet yang diuji. Rifa'i-Faiz (2003) melaporkan bahwa pada tanaman duku perkembangan kalus masih terjadi hingga planlet sampai berumur tiga bulan setelah sambung.

Pada percobaan ini bentuk sambung tipe V menghasilkan pertumbuhan planlet lebih cepat satu minggu dan lebih serempak dibandingkan dengan bentuk sambung tipe L. Hal ini disebabkan pada sambungan tipe V posisi kambium antara batang bawah dan batang atas berada pada posisi pertautan yang tepat dan kokoh. Kondisi tersebut menyebabkan eksplan tidak mudah bergeser dan jaringan ikatan pembuluh xilem serta floem dan kambium antar kedua planlet dengan sangat mudah akan menyatu. Pada perlakuan sambung mikro tipe L diduga posisi pertautan jaringan sel kambium batang bawah dan batang atas kurang tepat atau bergeser pada saat perlakuan, sehingga perlu waktu lebih lama untuk menyembuhkan luka akibat perlakuan.

Dari kedua tipe sambung mikro yang dalam metode sambung mikro planlet kina. Estrada-Luna *et al.* (2002) me-

Tabel 2. Pengaruh kombinasi batang atas dan bawah serta tipe sambung terhadap jumlah daun planlet kina umur 1 sampai 8 minggu.

Table 2. Effect of stocks-scions combination and micrografting type on leaves number of 1 to 8 weeks old chincona plantlet.

Kombinasi dan tipe sambung *Combination and type of micrograft*	Umur planlet (minggu) *Plantlet age (weeks)*							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CS/CL –V	0,00 a	0,4a	1,56a	2,28a	3,00a	3,88a	4,56a	5,08a
CS/CL-L	0,00a	0,00b	1,12b	2,00b	2,52b	3,38b	4,08b	4,52b
CS/CS-V	0,00a	1,28a	2,24a	3,00a	3,84a	4,08a	4,92a	5,48a
CS/CS-L	0,00a	0,32b	1,20b	2,08b	2,84b	3,52b	4,2b	4,84b
CL/CL-V	0,00a	1,00a	2,00a	2,60a	3,52a	4,00a	4,68a	5,32a
CL/CL-L	0,00a	0,00b	1,04b	2,00b	2,40b	3,24b	4b,00	4,48b

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut uji jarak Duncan P < 0,05

Explanation : Means in the same column followed by the same letters are not significantly different at P < 0.05 according to Duncan's multiple range test.

nyatakan posisi jaringan planlet batang bawah yang dengan tepat mengenai jaringan batang atas dapat mempercepat proses penyembuhan akibat sambung mikro. Lukman *et al*. (2005) melaporkan bahwa sambung mikro pada dua spesies yang berbeda (mundo dan manggis) dengan model sambung tipe V tingkat keberhasilannya mencapai 76%. Oda (1995) menyebutkan bahwa pada penyambungan dengan menggunakan bentuk sambung tipe V pertautan antara batang bawah dengan batang atas dapat terjadi dengan cepat dan kokoh, sedangkan penyambungan yang dilakukan dengan menggunakan bentuk sambung tipe L dan tipe datar menyebabkan pertumbuhan lebih lambat.

Kala *et al*. (2002) melaporkan bahwa tipe penyambungan pada sambungan mikro *in vitro* tanaman *Hevea brasiliensis* yang terbaik adalah berbentuk pelana (/). Sebagai batang bawah digunakan kecambah yang dikulturkan secara *in vitro* dalam medium Murashige dan Skoog (1962) dengan penambahan 2,0 mg/L BA dan 1,0 mg/L thidiazuron. Tanaman yang diperoleh dapat tumbuh baik setelah diaklimatisasi.

Tirtawinata (2003) menjelaskan posisi kambium batang bawah dengan batang atas sangat menentukan perkembangan planlet selanjutnya. Kontak kambium yang tidak tepat atau sebagian dapat mengakibatkan pertautan jaringan pembuluh antara batang bawah dengan batang atas tidak sempurna, dan selanjutnya berakibat pada translokasi senyawa-senyawa penting untuk metabolisme pertumbuhan planlet seperti translokasi nutrisi dan air dapat berlangsung secara lancar dari bawah ke atas atau translokasi hasil fotosintesis dari batang atas ke seluruh bagian planlet. Dengan demikian semua aspek dalam penyambungan baik fisik, mekanis maupun fisiologis perlu diusahakan dalam kondisi seoptimal mungkin sehingga keberhasilan lebih terjamin.

Medium sambung mikro planlet kina

Penambahan IBA pada medium MS sangat berpengaruh terhadap perakaran sambung mikro planlet kina. Pada perlakuan kontrol yang tidak diberikan IBA terlihat bahwa tidak satupun planlet berakar, akan tetapi pada penambahan IBA yang bertingkat (1, 2, 3 dan 4 mg/L) pertumbuhan akar semakin banyak (Tabel 3).

Penambahan IBA terhadap perakaran sambung mikro planlet kina tidak berpengaruh nyata, akan tetapi penambahan IBA seperti perlakuan pertumbuhan akar cenderung meningkat. Jumlah akar yang paling banyak diperoleh dari konsentrasi 3 dan 4 mg/L IBA (Tabel 4). Dapat disimpulkan bahwa penambahan 3 mg/L IBA pada medium MS adalah yang terbaik untuk sambung mikro planlet kina. Kala *et al*. (2002) menyatakan bahwa medium merupakan faktor utama dalam penentuan keberhasilan sambung mikro. Oda (1995), Bogetti *et al.* (2001) dan De-Klerk *et al.* (2001) menyatakan bahwa IBA berpengaruh terhadap pertumbuhan akar pada kultur *in vitro*.

Bogetti *et al.* (2001) menemukan bahwa 10 mg/L IBA meningkatkan pertumbuhan akar planlet *Anacardium occidentale*. Sedangkan Agustiansyah (2002) melaporkan bahwa pemberian 5 mg/L IBA meningkatkan jumlah akar planlet strowberi.

Aklimatisasi

Rata-rata planlet yang dapat bertahan hidup setelah dilakukan aklimatisasi secara bertahap sebagai berikut : aklimatisasi dalam ruangan pada suhu 25 ^{o}C dengan medium arang sekam yang dicampur dengan tanah top soil steril dengan perbandingan (1 : 1) dilakukan selama satu bulan, seluruh planlet dapat bertahan hidup dengan baik (100%). Sebanyak 90% planlet dapat bertahan hidup setelah planlet dipindah ke rumah plastik bernaungan dengan komposisi medium tumbuh yang sama (Tabel 5). Vigor tanaman sangat baik, dengan

Tabel 3. Pengaruh konsentrasi IBA dalam medium MS terhadap persentase planlet kina berakar umur delapan minggu setelah penyambungan.

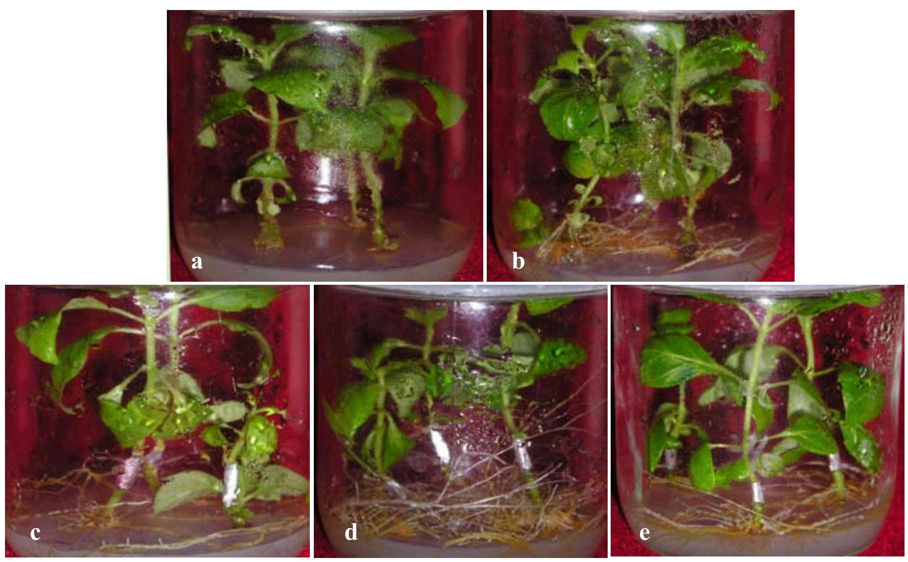
Table 3. The effect of IBA concentrations in MS medium on rooting of eight-weeks old Chincona plantlet after micrografting.

Kombinasi dan tipe sambung *Combination and type of micrograft*	Konsentrasi IBA *IBA concentration* mg/L				
	0	1	2	3	4
CS/CL-V	0	60	80	80	80
CS/CS-V	0	60	70	80	80
CL/CL-V	0	50	70	80	80
Rata-rata (*Average)*	0	56,7	73,3	80	80
CS/CL-L	0	60	00	80	80
CS/CS-L	0	60	80	80	80
CL/CL-L	0	50	70	80	80
Rata-rata (*Average)*	0	56,7	73,3	80	80

Tabel 4. Pengaruh IBA pada perakaran planlet dengan berbagai kombinasi batang bawah dan batang atas pada umur delapan minggu.

Table 4. The effect of IBA on root growth of eight-week-old plantlet with several combinations of root stock and scion.

Kombinasi *Combination*	Konsentrasi IBA *IBA Concentration* (mg/L)				
	0	1	2	3	4
CS/CL	0	2	3,10	4	4
CS/CS	0	2	2,81	3	3
CL/CL	0	2	2,50	3	3



Gambar 2. Pengaruh IBA terhadap perakaran planlet kina hasil sambung mikro umur delapan minggu setelah dikultur. (a) kontrol, (b) dengan konsentrasi 1 mg/L , (c) 2 mg/L , (d) 3 mg/L , dan (e) 4 mg/L IBA.

Figure 2. The effect of IBA on root growth of plantlet from micrografting, eight-week-old after cultured. (a) control, (b) with the concentration 1 mg/L , (c) 2 mg/L , (d) 3 mg/L , and (e) 4 mg/L IBA.

pertumbuhan relatif cepat sehingga pada umur tiga bulan setelah diakliamatisasi tinggi tanaman sudah mencapai 40-50 cm (Gambar 3).

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penyesuaian planlet terhadap suhu luar perlu dilakukan secara bertahap, yaitu melalui pre-aklimatisasi dalam ruang kultur (suhu 25- 27 ^{o}C) pencahayaan 12 jam per hari diikuti dengan aklimatisasi di bawah naungan paranet 70%. Diduga bahwa pada pre-aklimatisasi sudah terjadi penebalan lapisan lilin pada daun, akar sudah berfungsi dengan baik dan fotosintesis juga sudah berjalan dengan baik.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa planlet kina hasil mikrografting yang ditumbuhkan pada kondisi heterotrof dapat ditanam pada kondisi yang autotrof setelah mendapat perlakuan adaptasi pada suhu rendah. Hal ini dilakukan karena persyaratan hidup planlet kina membutuhkan suhu 13,5-21,1^{o}C, pH berkisar antara 4,5-6,5, ketinggian 900-3000 m di atas permukaan laut, curah hujan antara 2000-3500 mm/tahun sepanjang tahun dan kelembaban udara antara 69-97% (PPTK ,1995).

Gunawan (1992) dan Posposilova *et al.* (1996) menyatakan bahwa sifat-sifat planlet hasil kultur *in vitro* yang kurang menguntungkan antara lain lapisan lilin/ kutikula tidak berkembang dengan baik, lignifikasi batang kurang, sel-sel palisade daun sedikit, jaringan pembuluh dari akar ke pucuk kurang berkembang, dan stomata sering tidak berfungsi (tidak menutup pada penguapan tinggi) sehingga pucuk sangat peka terhadap evapotranspirasi, serangan cendawan dan bakteri tanah, dan cahaya dengan intensitas tinggi. Oleh sebab itu diperlukan aklimatisasi sebelum memindahkan planlet ke lapang.

Onay *et al*. (2003) melakukan sambung mikro *in vivo* dan *in vitro* tanaman *Pistacia vera,* dengan tipe penyambungan bentuk V. Diperoleh bahwa keberhasilan sambung mikro dipengaruhi oleh umur batang atas yang digunakan, dan terbaik adalah yang berasal dari tanaman berumur satu tahun. Setelah dilakukan aklimatisasi hanya 50% tanaman hasil *in vitro* sambung mikro

Tabel 5. Persentase planlet hasil sambung mikro yang mampu bertahan hidup dalam aklimatisasi setelah satu bulan dalam ruang kultur dan dua bulan di rumah plastik.

Table 5. Percentage of survived plantlet after acclimatization one month in room temperature and two months in plastic house.

Kombinasi dan tipe sambung *Combination and type of grafting*	Dalam ruangan pada suhu 25 ^{o}C *In a room temperature 25 ^{o}C*	Di rumah plastik *In plastic house*
CS/CL-V	100 (30/30)*	93 (28/30)
CS/CS-V	100 (30/30)	90 (27/30)
CL/CL-V	100 (30/30)	90 (27/30)
CS/CL-L	100 (30/30)	90 (27/30)
CS/CS-L	100 (30/30)	86 (26/30)
CL/CL-L	100 (30/30)	90 (27/30)
Rata-rata (*Average*)	100	90

Keterangan : *. Angka dalam kurung adalah perbandingan planlet yang hidup.
*Explanation : * Means in brackets is a comparison of survived plantlet.*

a **b** **c**

Gambar 3. Tanaman kina hasil mikrografting (a) aklimatisasi dalam ruang kultur bercahaya; (b) satu bulan setelah diaklimatisasi di bawah paranet, (c) tiga bulan setelah aklimatisasi.

Figure 3. Cinchona plants from micrografting (a) acclimatization in a light culture room, (b) one month after acclimatization under paranet, (c) three months after acclimatization.

yang mampu bertahan hidup, sedang *in vivo* mikrografting mencapai 100% pada medium tanah.

Nas & Read (2004) melakukan sambung mikor *vitro American chesnut, hazelnut* hibrid dan anggur dikulturkan secara *in vitro* dalam medium Nas dan Read. Akar diinduksi dengan mencelupkan batang bawah ke dalam larutan 1000 mg/L IBA. Setelah dua bulan aklimatisasi dalam Jiffi pot *American chesnut, hazelnut* hibrid dan anggur yang berhasil tumbuh masing-masing 80%, 70% dan 50%.

Kesimpulan

Dari hasil percobaan yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa :

1. Bentuk tipe V adalah penyambungan yang terbaik untuk sambung mikro *in vitro* tanaman kina.
2. Medium MS dengan penambahan IBA 3 mg/L merupakan medium yang terbaik untuk pertumbuhan dan perakaran planlet kina hasil sambung mikro *in vitro*.
3. Aklimatisasi planlet hasil sambung mikro *in vitro* dilakukan secara bertahap, yaitu dalam ruang kultur pada suhu 25–27 ^{o}C diikuti dengan di rumah plastik bernaungan paranet 70%. Teknik ini menghasilkan lebih dari 90% planlet yang mampu bertahan hidup. Teknik sambung mikro *in vitro* dapat digunakan untuk memperbanyak tanaman kina secara klonal.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor atas fasilitas penelitian yang diberikan. Terima kasih juga diucapkan kepada Direktur Pusat Penelitian Teh dan Kina atas bantuan dan izin pengadaan benih *C. succirubra* dan *C. ledgeriana* yang digunakan dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

Agustiansyah (2002). Studi perbanyakan tanaman Strowberi (*Fragaria ananassa* Duch) secara i*n vitro*. *Tesis.* Bogor, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Bogetti, B., K. Jasik & S. H. Mantell (2001). *In vitro* root formation in *Anacardium occidentale* microshoots. *Biol. Plant.,* **44** (2), 175-179.

Dayrit, F.M., A.Guldotea, M.L.Generalao & C. Serna (1994). Determination of the quinine content in the bark of the Cinchona tree grown in Mt. Kitangland, Bukindon. *Philippine J. Sci.,* **123,** (3), 52-57.

De-Klerk, G.J., J. Hanecakova & J. Jasik (2001). The Role of cytokinins in rooting of stem slices cut from apple microcuttings. *Plant Biosystem*., **135** (1), 79-84.

Errea, P., L. Garay & A.J.Marin (2001). Early detection of graft incompatibility in Apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. *Physiol. Plant.,* **112,** 135-141.

Estrada-Luna, A.A., C. Lopez-Peralpa & E. Cardenas-Soriano (2002). *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prikly pear cactus (*Opuntia* spp.). *Sci. Hort.,* **92,** 317-327.

Gunawan, L.W. (1992). *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Bogor, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.

Hartmann, H.T. & D.E. Kester, F.T.Davies (1997). *Plant Propagation, Principles and Practice*. Sixth Edition. New Jersey*,* Practice Hall International, Inc. 770p.

Holbrook, N.M., V.R. Shashidhar, R.A. James & R. Munns (2002). Stomatal control in tomato with ABA-deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *J. Exp. Bot.,* **53,** 1503-1514.

Kala, R.G., M.P. Asokan, K.P. Jayasree, S. Sobha, R. Jayasree, K. Rekha & Thulaseedharan (2002). Optimization of conditions for *in vitro* micrografting in rubber (*Hevea brasiliensis*). *Indian J. Nat. Rub. Res.,* **15**(2), 165-171.

Lee, Yung-Myung, Hae-Jeen, Bang & Hyun-Sook, Ham (1998). Grafting vegetables *J. Japan. Soc. Hort. Sci*., **67**(6),1098-1104.

Lukman, R., L. W. Gunawan, A. S. Abidin, R. Megia & T.N. Praptosuwiryo (2005). *Interspecific Micrografting Between Garcinia mangostana and Garcinia dulcis: Biology and Physiology Point of View*. Bogor, Seameo Biotrop, (*in press*).

Mariska, I. (1985). Mikrografting pada tanaman jeruk. *Dalam*. *Simposium Kultur Jaringan - Jakarta 26 September, 1985*. Bogor, Balitro.

Murashige, T. & F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*., **15**, 473-497.

Nas, M.N. & P.E. Read (2004). Simultaneous micrografting, rooting and acclimatization of micropropagated American chestnut, grapevine and hybrid hazelnut. *European J. Hort. Science*. **6**,1-2.

Oda, M. (1995). New grafting methods for fruit-bearing vegetables in Japan. *JARQ,* **29,** 187-194.

Onay, A., V. Pirinc, F. Adiyaman, C. Isikalan, E. Tilkat., & D. Basaran (2003). *In vivo* and *in vitro* micrografting of Pistachio, *Pistacia vera* L.cv."Siirt". *Turk J. Biol*., **27**,95-100.

Pasquale, F.D., S.Guiffrida & F. Carimi (1999). Minigrafting of shoot, roots, inverted roots, and somatic embryos for rescue of *in vitro Citrus r*egenerant. *J. Amer. Soc.Hort. Sci.*, **124** (2),152-157.

Posposilova, J., J. Catsky & Sestak (1997). Photosynthesis in plant cultivated *in vitro*. *In:* Pessarakli, M. (ed.): *Handbook of Photosynthesis*. New York, Marcel Deker, 1997. p. 525-540.

Pusat Penelitian Teh dan Kina (1995). *Petunjuk Kultur Teknis Tanaman Kina*. Bandung, Asosiasi Penelitian dan Pengembangan Perkinaan Indonesia.

Raghothama, K.G. (1999). Phosphate acquisition. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.,* **50,** 665-693.

Rifa'i-Faiz (2003). Pengaruh batang bawah dan jenis bibit serta studi anatomi bidang penyambungan pada bibit grafting duku (*Lansium* domesticum Corr). *Skrips*i Bogor, Jurusan Budidaya Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Santoso, J., N. Toruan-Mathius, U. Sastra-prawira, G. Suryatmana & D. Saodah (2004). Perbanyakan tanaman kina *Cinchona ledgeriana* Meons, dan *C, succirubra* Pavon melalui penggandaan tunas aksilar. *Menara Perkebunan,* **72 (**1),11-27.

Santoso, J. & S. Wibowo (2000). *Usaha Memperpendek Umur Bibit Semai Sambung Kina di Pembibitan.* Gambung, Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung.

Suzuki, M., S. Sasaya & Kobayashi (1998). Present status of vegetable grafting system. *JARQ,* **32**, 105-112.

Tirtawinata, M.R. (2003). Kajian anatomi dan fisiologi sambung bibit manggis dengan beberapa anggota kerabat Clusiaceae. *Disertasi.* Bogor, Fakultas Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Turnbull, C. G. N., J. P. Booker & H.M.O. Leyser (2002). Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis. The Plant J.,* **32,** 255-262.

Widayat, W. (2000). Peluang pasar dan perkembangan kina Indonesia. *Dalam Seminar Sehari Pengembangan Kina Nasional*. 3 Agustus 2000. Bandung, Pusat Penelitian Teh dan Kina.

Yagishita, N., N. Hirata, H. Mizukami, H. Ohashi & K. Yamashita (1990) Genetic nature of low capsicum in the variant strains induced by grafting in *Capsicum annum L. Euphytica,* **46,** 249-252.

Yunita, R. (2002). Perbanyakan dan trans-formasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L) dengan teknik kultur jaringan. *Tesis.* Bogor, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.