

STERILISASI EKSPLAN DAN SUB KULTUR ANGGREK, SIRIH MERAH DAN KRISAN PADA PERBANYAKAN TANAMAN SECARA *IN VITRO*

Eksplant Sterilization and Sub-Culture for Orchid, Red Betel Vine and Krisan on Perbanyakan Tanaman Secara *In Vitro*

Elfiani dan Jakoni

Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Riau/ Jln. Kaharudin Nasution No. 346, Km 10. Pekanbaru.

. 0761-674206. Email: riau.bptp@yahoo.com

[Diterima Maret 2015, Disetujui Juli 2015]

ABSTRACT

Subculture is one of stages to produce plant through tissue culture. Basically, subculture is to cut, cleave, and replant explant that grows for increasing number of plants. The purpose of this research is to sterilization a part of plant from field which will be used as explant and to make sub-culture on a part of plant to produce *in vitro*. Generally, the explant sterilization of orchid fruit and Red Betel Vine produces under satisfaction because of up to 90% of explant experiences contamination by fungus, bacteria and browning. Sub-culture krisan on callus media shows that a small number of culture succeeded to form callus, while other ones experiences contamination. On krisan sub-culture in bud media is obtained a good result and differ significantly with others under a high level of contamination. All of those are likely caused by unskill in creating a sterile condition in the explant sterilization practices as well as at time in making sub-culture.

Kata Kunci: *Eksplan, Sub-kultur, In Vitro*

ABSTRAK

Subkultur merupakan salah satu tahap dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. Pada dasarnya subkultur adalah memotong, membelah dan menanam kembali eksplan yang telah tumbuh sehingga jumlah tanaman akan bertambah banyak. Tujuan penelitian ini adalah sterilisasi bagian tanaman dari lapang yang akan digunakan sebagai eksplan dan melakukan subkultur bagian tanaman untuk perbanyakan secara *in vitro*. Secara umum sterilisasi eksplan buah anggrek dan sirih merah mendapatkan hasil yang kurang bagus karena di atas 90 persen eksplan mengalami kontaminasi baik oleh cendawan dan bakteri serta mengalami pencoklatan (browning). Subkultur krisan pada media pengkalusan menunjukkan bahwa hanya sebagian kecil kultur yang berhasil membentuk kalus, sedangkan yang lainnya mengalami kontaminasi. Pada subkultur krisan di media pertunasan, menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan yang lainnya, dimana tingkat kontaminasi masih tinggi. Kesemuanya itu, kemungkinan disebabkan oleh kurang terampil dalam menciptakan kondisi yang steril baik pada praktikum sterilisasi eksplan maupun pada saat melakukan subkultur.

Kata Kunci: *Eksplan, Sub-kultur, In Vitro*

PENDAHULUAN

Kultur jaringan, inisiasi kultur yang bebas dari kontaminan merupakan langkah yang sangat penting. Eksplan dari lapangan mengandung debu, berbagai kotoran dan kontaminan hidup pada permukaannya. Kontaminan hidup dapat berupa cendawan, bakteri, serangga dan telurinya, tungau serta spora-spora. Bila kontaminan ini tidak dihilangkan maka pada media yang mengandung gula, vitamin dan

mineral, kontaminan terutama cendawan dan bakteri akan tumbuh dengan cepat. Dalam beberapa hari, kontaminan akan tumbuh dan memenuhi seluruh botol kultur. Eksplan yang tertutup kontaminan akhirnya mati baik sebagai akibat dari persaingan hara dan pengrusakan dari bakteri atau cendawan maupun akibat senyawa toksik yang dihasilkan oleh cendawan atau bakteri (Gunawan, 1984).

Salah satu faktor pembatas dalam keberhasilan kultur jaringan adalah kontaminasi yang dapat terjadi pada setiap saat dalam masa kultur. Kontaminasi dapat berasal dari: (1) Eksplan, baik eksternal maupun internal; (2) Mikroorganisme yang masuk ke dalam media; (3) Botol tanam atau alat-alat tanam yang kurang steril; (4) Lingkungan kerja dan ruang kultur yang kotor; dan (5) Kecerobohan dalam pelaksanaan.

Bakteri tidak saja berada pada eksplan bagian permukaan tetapi terkadang ada pada bagian dalam eksplan. Biasanya bila ada di permukaan, respon kontaminasinya sangat cepat yaitu dalam tempo dua kali 24 jam sudah tampak. Tetapi bila bersifat internal, responnya muncul setelah beberapa hari bahkan terkadang baru tampak dalam hitungan bulan, di mana sudah terjadi induksi kalus atau mulai terbentuk organogenesis (Santoso dan Nursandi, 2000).

Keberhasilan teknik kultur jaringan terutama dalam perbanyak tanaman juga ditentukan oleh perlakuan subkultur. Subkultur adalah usaha untuk menggantikan media dalam kultur jaringan dengan media yang baru, sehingga kebutuhan nutrisi untuk pertumbuhan kalus dapat terpenuhi. Subkultur merupakan salah satu tahap dalam perbanyak tanaman melalui kultur jaringan. Pada dasarnya subkultur adalah memotong, membelah dan menanam kembali eksplan yang telah tumbuh sehingga jumlah tanaman akan bertambah banyak.

Waktu pelaksanaan subkultur tergantung pada beberapa hal, misalnya eksplan yang ada dalam botol sudah tumbuh setinggi botol, atau eksplan tersebut sudah berada lama di dalam botol sehingga pertumbuhannya sudah mulai berkurang akibat mulai kekurangan hara. Pada media dalam botol sendiri kelihatan mulai menipis, berwarna kecoklatan atau hitam sebagai hasil reaksi pertumbuhan tanaman, bekas bagian tanaman yang mati dan lain-lain. Bisa saja tanaman baru 4-6 minggu di dalam botol namun pertumbuhannya sudah setinggi botol maka segera dilakukan subkultur. Bisa juga tanaman belum setinggi botol namun sudah berada lebih dari empat bulan sehingga perlu disubkultur. Tujuan penelitian ini adalah sterilisasi bagian tanaman dari lapang yang akan digunakan sebagai eksplan dan melakukan subkultur bagian tanaman untuk perbanyak secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Institut Pertanian Bogor pada bulan Juni - Agustus 2010. Bahan yang diperlukan dalam sterilisasi eksplan meliputi : buah anggrek (jenis *rinchostilis* dan *spathogathis*), tanaman sirih (sirih merah), deterjen, Benlate, Agrep 2%, alkohol 96%, cloroks dan air steril. Sedangkan alat yang digunakan adalah shaker, laminar air flow, bunsen, pinset, pisau dan gunting.

Bahan yang digunakan pada kegiatan subkultur krisan adalah: kultur krisan *in vitro*, alkohol 96%, cloroks dan air steril serta media yang terdiri dari media pengkalusan dan media pertunasan. Adapun alat yang digunakan adalah laminar air flow, bunsen, pinset, pisau dan gunting.

Prosedur Kerja

Sterilisasi Buah Anggrek: cuci buah anggrek dengan menggunakan deterjen, lalu bilas bersih dan rendam dalam larutan Benlate+ Agrep 2% selama lebih kurang satu jam sambil di shaker. Bilas dengan air steril, pekerjaan lalu dilanjutkan di dalam Laminar Air Flow dengan merendam buah anggrek di dalam alkohol 96% untuk sterilisasi eksplan. Selanjutnya buah anggrek dibakar beberapa saat dengan menggunakan munsen. Buka buah dengan cara memotong kedua ujungnya lalu belah bagian tengah buah dengan menggunakan gunting atau pisau. Ambil bijinya lalu ditanam di media MS 0.

Sterilisasi Sirih: bahan eksplan sirih yang terdiri dari batang dan daun dicuci bersih dengan menggunakan deterjen, lalu bilas hingga bersih. Rendam eksplan sirih dalam larutan Benlate+Agrep 2% selama lebih kurang satu jam. Bilas dengan air steril. Pisahkan eksplan atas daun, pucuk, buku dan batang, selanjutnya pekerjaan dilakukan di dalam Laminar Air Flow. Rendam eksplan dalam larutan Cloroks 20% selama 10 menit, selanjutnya rendam eksplan dalam larutan Cloroks 10% selama 10 menit. Bilas eksplan dengan menggunakan air steril hingga tiga kali. Potong eksplan (daun, pucuk, buku dan batang) dalam air steril yang telah diberi betadine (lebih kurang dua tetes), lalu tanam eksplan. Pucuk dan buku ditanam dalam media MS + Sitokinin 10', daun dan batang ditanam dalam media MS+Picloram 5'

Subkultur Krisan: Kultur krisan *in vitro* yang telah disiapkan, dipotong dengan gunting pada buku-buku yang ada. Potongan kultur tersebut dipindahkan atau ditanam pada media pengkalusan dan media pertunasan. Semua kegiatan dilakukan di dalam laminar air flow agar tercipta kondisi steril. Pengamatan dilakukan selama 4 minggu dengan melihat respon pembentukan kalus dan respon pertumbuhan tunas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sterilisasi Eksplan

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap semua eksplan yang dilakukan selama 6 MST, diperoleh data yang disajikan pada Tabel 1. Pada Tabel 1, dari lima ulangan untuk setiap perlakuan eksplan buah anggrek dan tanaman sirih sebagian besar (lebih dari 90%) mengalami kontaminasi sejak minggu pertama pengamatan (1 MST). Untuk eksplan buah anggrek bahkan 99% mengalami kontaminasi dan sedikit mengalami browning (pencoklatan), sedangkan pada eksplan sirih, masih terdapat eksplan yang hijau hingga akhir pengamatan walaupun jumlahnya sangat sedikit sekali. Sebagian besar eksplan mati karena terkontaminasi oleh cendawan dan bakteri.

Kontaminasi yang disebabkan oleh cendawan terlihat jelas pada media. Media dan eksplan diselubungi oleh spora berbentuk kapas atau meselium yang berwarna putih dan hijau. Sedangkan kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri, pada eksplan terlihat lendir berwarna kuning sebagian lagi melekat pada media membentuk gumpalan yang basah. Cendawan yang mengkontaminasi media dan eksplan adalah cendawan yang biasa ada di laboratorium seperti *Aspergillus* sp, *Monilla* sp dan *Penicillium* sp. Sedangkan bakteri yang muncul dan berasal dari laboratorium adalah bakteri gram positif (Setiyoko, 1995).

Kontaminasi yang disebabkan oleh adanya proses *browning* (pencoklatan) pada eksplan dalam praktikum ini karena pada media yang digunakan tidak ditambahkan senyawa yang dapat mengabsorpsi asam fenolik seperti polyvinylpyrrolidone (PVP) (Santoso dan Nursandi, 2001), arang aktif atau nicotinic acid (Gunawan, 1987). Kontaminasi merupakan gangguan yang sangat umum terjadi dalam kegiatan kultur jaringan. Munculnya gangguan

ini adalah merupakan sesuatu yang wajar sebagai konsekuensi penggunaan media yang diperkaya (seperti media MS). Fenomena kontaminasi menunjukkan bahwa semakin diperkayanya suatu media maka tingkat kontaminasinya juga semakin rendah. Demikian pula sebaliknya, semakin sederhana komponen media maka akan semakin rendah kemungkinan terjadinya kontaminasi (Santoso dan Nursandi, 2001). Munculnya kontaminan cendawan dan bakteri diduga disebabkan oleh prosedur sterilisasi yang belum memadai untuk mensterilkan eksplan dari kontaminan cendawan dan bakteri yang berasal dari eksplan itu sendiri.

Proses subkultur pada tanaman krisan adalah bertujuan untuk melakukan proses multiplikasi secara *in vitro* agar diperoleh bibit tanaman krisan secara cepat dalam jumlah yang banyak. Berdasarkan hasil praktikum subkultur tanaman krisan yang dilakukan pada dua media subkultur, yaitu media pengkalusan dan media pertunasan, diperoleh hasil seperti disajikan pada Tabel 2.

Pada Tabel 2 di atas terlihat bahwa secara umum dari lima ulangan subkultur krisan pada media pengkalusan, masih banyak terjadi kontaminasi yang seluruhnya disebabkan oleh cendawan. Namun, terdapat beberapa subkultur yang berhasil membentuk kalus bahkan mulai dari minggu pertama setelah tanam walaupun hanya sedikit dan mulai minggu ke-2, jumlah subkultur yang mulai membentuk kalus cukup banyak, bahkan ada yang mencapai 100 persen dari 5 kultur yang ditanam pada media subkultur.

Keberhasilan membentuk kalus tersebut dipengaruhi oleh media pengkalusan yang digunakan, dalam hal ini dapat dikatakan bahwa komposisi media yang digunakan sudah tepat, walaupun proses terbentuknya kalus masih terkesan lambat, terutama pada media pengkalusan X16 yang proses terbentuknya kalus lebih lambat dari media X18. Dapat dipastikan bahwa diantara kedua media tersebut memiliki komposisi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) dengan konsentrasi yang berbeda, sehingga hal tersebut berpengaruh terhadap pembentukan kalus.

Tabel 1. Pengamatan Terhadap Botol Steril Selama 6 MST

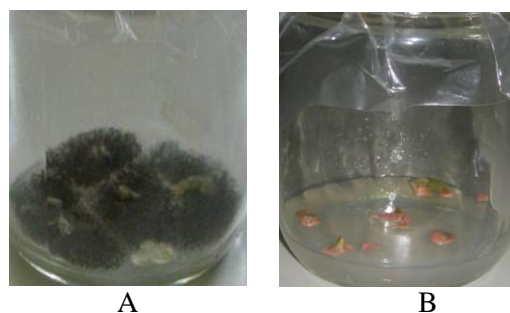
Kel.	Jenis Eksplan	Jumlah Eksplan yang Tetap Hijau Pada Minggu Ke-						Keterangan
		1	2	3	4	5	6	
1	Pucuk sirih ul. 1	4	4	3	3	2	1	Tidak kontam sampai minggu ke 7
	Pucuk sirih ul. 2	3	3	2	2	2	2	Tidak kontam sampai minggu ke 7
	Daun sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	Kontam sejak 1 MST
	Daun sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	Kontam sejak 1 MST
	Buku sirih ul. 1	2	2	0	0	0	0	Kontam sejak 2 mst
	Buku sirih ul. 2	3	2	1	0	0	0	Kontam sejak 3 mst
	Batang sirih ul. 1	4	4	4	4	4	0	Tidak kontam sampai minggu ke 7
	Batang sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	Kontam sejak 1 MST
	Buntut musang Spathogathis Anggrek Rinchostilis	0	0	0	0	0	0	Tidak kontam sampai minggu ke 7
2	Pucuk sirih ul. 1	4	4	4	4	4	4	
	Pucuk sirih ul. 2	5	5	5	5	4	4	
	Daun sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Daun sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Buku sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Buku sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Batang sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Batang sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Buntut musang Spathogathis Anggrek Rinchostilis	0	0	0	0	0	0	
3	Pucuk sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 1 MST
	Pucuk sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 1 MST
	Daun sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	Kontam cend.+ browning sejak 1 MST
	Daun sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	Kontam cend.+ browning sejak 1 MST
	Buku sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 1 MST
	Buku sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 1 MST
	Batang sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	Kontam cend.+ browning sejak 1 MST
	Batang sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	Browning sejak 1 MST
	Buntut musang Spathogathis Anggrek Rinchostilis	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 1 MST Browning sejak 1 MST
4	Pucuk sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Pucuk sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Daun sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Daun sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Buku sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Buku sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Batang sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Batang sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	kontam semua
	Buntut musang Spathogathis Anggrek Rinchostilis	0	0	0	0	0	0	kontam semua
5	Pucuk sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 2 MST
	Pucuk sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 2 MST
	Daun sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 1 MST
	Daun sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 1 MST
	Buku sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 1 MST
	Buku sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 1 MST
	Batang sirih ul. 1	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 2 MST
	Batang sirih ul. 2	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 2 MST
	Buntut musang Spathogathis Anggrek Rinchostilis	0	0	0	0	0	0	Kontam cendawan sejak 1 MST Browning sejak 2 MST

Tabel 2. Pengamatan Sub-kultur Krisan Pada Media Pengkalusan Selama 4 MST.

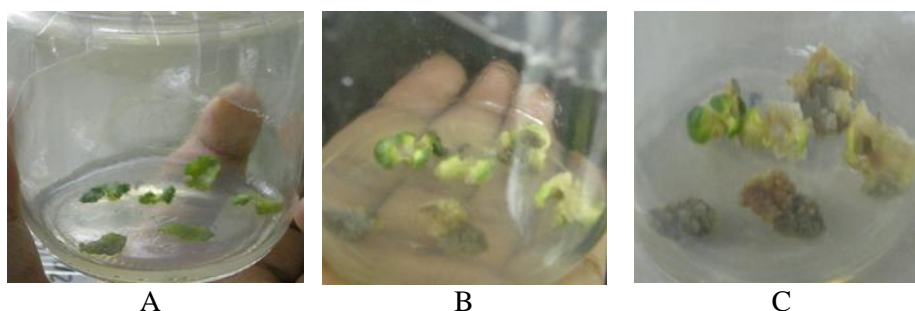
Kel	Kode Media	Minggu				Tingkat Kontaminasi
		I % kalus	II % kalus	III % kalus	IV % kalus	
Media Pengkalusan (X18)						
1	X18 Ul. 1 (I1)	0	10	25	25	
	X18 Ul. 2 (I2)	0	30	35	50	
	X18 Ul. 3 (I3)	0	30	35	35	
	X18 Ul. 4 (I4)	0	60	60	75	
	X18 Ul. 5 (I5)	10	60	60	50	
	Rata-rata	20	100	100	100	
2	Xn Ul. 1	0	15	30	30	
	Xn Ul. 2	0	15	30	30	
	Xn Ul. 3	0	10	30	30	
	Xn Ul. 4	0	10	30	30	
	Xn Ul. 5	0	10	30	30	
	Rata-rata	0	100	100	100	
Media Pengkalusan (X16)						
3	X16 Ul. 1	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-2
	X16 Ul. 2	0	10	30	60	
	X16 Ul. 3	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	X16 Ul. 4	0	10	30	70	
	X16 Ul. 5	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	Rata-rata	0	40	40	40	
4	Xn Ul. 1	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	Xn Ul. 2	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	Xn Ul. 3	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	Xn Ul. 4	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	Xn Ul. 5	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	Rata-rata	0	0	0	0	
5	Xn Ul. 1	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	Xn Ul. 2	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	Xn Ul. 3	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	Xn Ul. 4	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	Xn Ul. 5	0	0	0	0	Kontam cendawan di minggu ke-1
	Rata-rata	0	0	0	0	

Subkultur Krisan

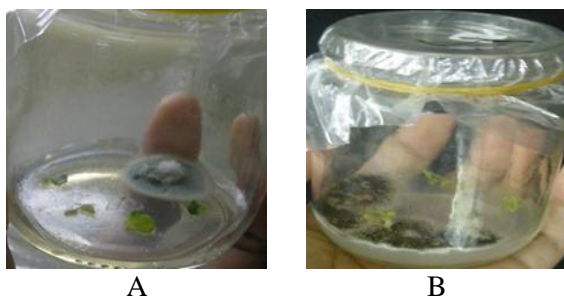
Pada Gambar 3 menunjukkan bahwa kontaminasi juga terjadi pada proses subkultur yang dilakukan, dan seluruh kontaminasi tersebut disebabkan oleh cendawan, hal ini terlihat dari media dan kultur yang ditumbuhi oleh spora berbentuk kapas atau meselium yang berwarna putih dan hijau. Seperti halnya pada kegiatan sterilisasi eksplan, cendawan yang mengkontaminasi media dan eksplan adalah cendawan yang biasa ada di laboratorium seperti *Aspergillus* sp, *Monilla* sp dan *Penicillium* sp. (Setiyoko, 1995). Kontaminasi ini dapat terjadi karena kurang hati-hatinya dalam melakukan subkultur terutama dalam menciptakan kondisi steril bagi media sub-kultur.



Gambar 1. Eksplan yang Terkontaminasi oleh (A): Cendawan dan (B): Bakteri



Gambar 2. Sub-kultur Krisan di Media Pengkalusan Pada 2 MST (A); 3 MST (B); dan 4 MST (C)



Gambar 3. Subkultur Krisan yang Terkontaminasi Oleh Cendawan

Pada subkultur krisan di media pertunasan, diperoleh hasil seperti terlihat pada Gambar 4, dimana sebagian besar media mengalami kontaminasi dan hanya sedikit sekali yang berhasil membentuk tunas. Pembentukan tunas diawali pada minggu kedua setelah tanam dengan persentase yang sangat kecil. Dari persentase tunas yang terbentuk, jumlah buku yang terbentuk pun sangat kecil. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh komposisi media yang belum tepat.

KESIMPULAN

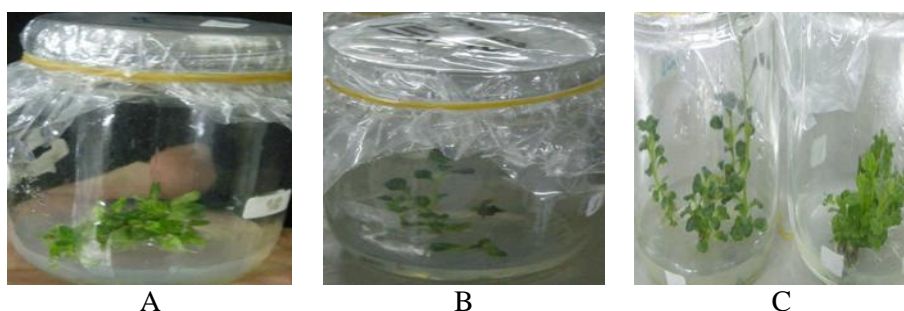
Hasil sterilisasi eksplan dan subkultur tanaman krisan diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Secara umum sterilisasi eksplan buah anggrek dan sirih merah mengalami kegagalan karena di atas 90% eksplan mengalami kontaminasi baik oleh cendawan dan bakteri serta mengalami pencoklatan (browning).
2. Subkultur krisan pada media pengkalusan menunjukkan bahwa hanya sebagian kecil kultur yang berhasil membentuk kalus, sedangkan yang lainnya mengalami kontaminasi.
3. Pada subkultur krisan di media pertunasan, menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan yang lainnya, dimana tingkat kontaminasi masih tinggi. Kesemuanya itu, kemungkinan disebabkan oleh kurang terampil dalam menciptakan kondisi yang steril baik pada pelaksanaan sterilisasi eksplan maupun pada saat melakukan subkultur.

DAFTAR PUSTAKA

Gunawan, L. W. 1988. Tehnik Kultur Jaringan Tumbuhan. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Hendaryono, D. P. S. dan A. Wijayani. 1994. Teknik Kultur Jaringan. Yayasan Kani-



Gambar 4. Sub-kultur Krisan di Media Pertunasan Pada 2 MST (A); 3 MST (B); dan 4 MST (C)

- sus, Yogyakarta.
- Priyono, D. Suhandi dan Matsaleh. 2000. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh IAA dan 2-IP pada Kultur Jaringan Bakal Buah Pisang. *Jurnal Hortikultura*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Pusat Penelitian Hortikultura dan Aneka Tanaman. Jakarta. Hal. 183-190.
- Santoso, U. dan F. Nursandi. 2001. *Kultur Jaringan Tanaman*. Penerbitan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang.
- Setiyoko, B. 1995. *Kultur Meristem Tanaman Pisang (Musa paradisiaca L.) Kultivar Ambon untuk Memperoleh Tanaman yang Bebas Cucumber Mosaic Virus*. Laporan Skripsi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wattimena, G. A. 1992. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Pusat Natar Universitas Institut Pertanian Bogor Bekerja Sama dengan Lembaga Sumberdaya Informasi-IPB, Bogor.
- Yuwono, T. 2008. *Bioteknologi Pertanian*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

