

MODIFIKASI METODE STERILISASI TERHADAP KEBERHASILAN SUBKULTUR
ANGGREK PADA PRAKTIKUM DI LABORATORIUM TEKNIK BENIH DAN
PERBANYAKAN TANAMAN POLITEKNIK PERTANIAN NEGERI PAYAKUMBUH

Ghufriati (1), rghufriati@gmail.com
Marjulis (2) ajomarjulis@gmail.com
PLP Laboratorium Kultur Jaringan
Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh

ABSTRAK

Anggrek adalah salah satu tanaman hias yang bernilai ekonomis tinggi, banyak penggemar- nya dan harga cenderung stabil. Anggrek memiliki bunga cantik beraneka warna yang merupakan hasil persilangan dari berbagai macam jenis anggrek tersebut. Buah anggrek hasil persilangan hanya bisa dikembangbiakkan secara kultur jaringan.

Salah satu rangkaian perkembangbiakkan anggrek secara kultur jaringan adalah subkultur anggrek. Pada kegiatan praktikum subkultur anggrek di Laboratorium Teknik Benih dan Perbanyak Tanaman terjadi kegagalan karena kultur yang ditanam sudah terkontaminasi, tapi tidak terlihat jelas.

Berdasarkan hal tersebut maka penulis melakukan penelitian dengan judul “Modifikasi Sterilisasi Terhadap Keberhasilan Subkultur Anggrek Pada Praktikum di Laboratorium Kultur Jaringan Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh”.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode sterilisasi yang efektif untuk menghilangkan kontaminasi dan agar subkultur anggrek tumbuh dengan baik.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh, pada bulan Februari 2021 sampai dengan Juni 2021. Metode penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan 4 ulangan dengan 3 sampel perulangan. Perlakuannya adalah A = kontrol (tanpa sterilisasi), B = Sterilisasi dengan Clorox 0,525% selama 9 menit, C= Sterilisasi dengan Clorox 1,05% selama 6 menit dan D= Sterilisasi dengan Clorox 1,575% selama 3 menit. Adapun parameter pengamatan adalah hari pertama terjadi kontaminasi, jumlah kontaminasi dan jenis kontaminasi.

Dari hasil penelitian terlihat bahwa perlakuan A (kontrol) terjadi kontaminasi jamur sebanyak 30%, perlakuan B 15 %, perlakuan C 5% dan perlakuan D 0%. Lamanya proses sterilisasi tidak berpengaruh pada hasil, tetapi semakin tinggi jumlah konsentrasi memberikan hasil yang terbaik. Dari hasil tersebut dapat disarankan untuk melakukan sterilisasi subkultur anggrek dengan pemakaian clorox 1,575% selama 3 menit (perlakuan D).

Kata kunci : kultur jaringan, subkultur, sterilisasi, kontaminasi

I. PENDAHULUAN

Anggrek adalah salah satu tanaman hias yang bernilai ekonomis tinggi, banyak penggemarnya dan harga cenderung stabil. Anggrek memiliki bunga cantik beraneka warna yang merupakan hasil persilangan dari berbagai macam jenis anggrek tersebut. Buah anggrek hasil persilangan hanya bisa dikembangbiakkan secara kultur jaringan.

Salah satu rangkaian perkembangbiakkan anggrek secara kultur jaringan adalah subkultur anggrek. Sub Kultur Anggrek adalah salah satu materi praktikum yang diajarkan kepada mahasiswa Budidaya Tanaman Pangan dan Budidaya Tanaman Hortikultura.. Dalam praktikum ini mahasiswa diajarkan cara memindahkan bibit anggrek hasil dari tabur biji ke dalam botol media yang baru. Masalah yang ditemukan yaitu adanya kontaminasi pada media setelah dilakukan subkultur, karena kultur yang dipindahkan sudah terkontaminasi, tapi tidak terlihat jelas secara visual.

Berdasarkan hal tersebut maka penulis berniat untuk melakukan penelitian dengan judul “Modifikasi Sterilisasi Terhadap Keberhasilan Subkultur Anggrek Pada Praktikum di Laboratorium Teknik Benih dan Perbanyakan Tanaman Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh”.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode sterilisasi yang efektif untuk menghilangkan kontaminasi dan agar subkultur anggrek tumbuh dengan baik.

Diharapkan hasil dari penelitian ini bermanfaat untuk keberhasilan praktikum Subkultur Anggrek selanjutnya, sehingga waktu dan bahan praktikum lainnya tidak terbuang.

TINJAUAN PUSTAKA

Kultur jaringan adalah suatu teknik membudidayakan jaringan tanaman menjadi tanaman baru yang lengkap dan mempunyai sifat seperti induknya. Tujuan pokok dari kultur jaringan adalah memproduksi tanaman dalam jumlah besar dalam waktu singkat, terutama untuk varietas-varietas unggul yang baru dihasilkan. Selain itu perbanyakan secara kultur jaringan bertujuan untuk pemuliaan tanaman, rekayasa genetika dan pelestarian plasma nutfah tanaman (Sandra, 2013).

Keberhasilan teknik kultur jaringan ditentukan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah keberhasilan sterilisasi bahan tanam atau eksplan. Kegiatan sterilisasi eksplan bertujuan untuk mengeliminasi mikroorganisme yang mungkin terbawa saat pengambilan eksplan, yang dapat menimbulkan kontaminasi sehingga menghambat pertumbuhan eksplan menjadi tanaman utuh. Menurut Lestari (2008), sterilisasi bahan tanam (eksplan) merupakan langkah awal yang cukup penting, karena bahan tanam yang

akan ditanam harus bebas mikroorganisme. Masalah yang sering timbul setelah penanaman eksplan adalah terjadinya kontaminasi akibat tumbuhnya cendawan dan bakteri, sterilisasi eksplan yang tepat baik dari jenis dan bahan sterilian, konsentrasi dan lamanya perlakuan harus diperhatikan (Sandra, 2013). Selanjutnya Lestari (2008) menambahkan bahwa bahan kimia yang dapat digunakan untuk sterilisasi adalah alkohol 70%, klorok/bleaching 10-30%, HgCl₂ 0,2% dan betadine.

Salah satu rangkaian kegiatan dalam kultur jaringan anggrek adalah kegiatan subkultur. Subkultur adalah pemindahan eksplan dari media satu ke media lain (baik jenis media sama atau beda), proses dimana jaringan atau eksplan pertama dibagi lagi, kemudian dipindahkan ke medium kultur baru (Widyastuti, Deviyanti, 2018).

METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan 11 Februari 2021 sampai bulan Juni 2021, bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah erlemeyer, gelas piala, gelas ukur, pipet ukur, spatula, timbangan analitik, LAF, pinset, scalpel, bunsen, rak kultur, handsprayer, dll

Sedangkan bahan yang digunakan adalah bibit anggrek dalam botol, akuades steril, alkohol 70%, spiritus, kertas tisu, Bayclin 30%, Bayclin 20%, karet gelang, plastik wrapping, kertas label, media subkultur dll.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan dan 4 ulangan. Masing-masing perlakuan ada 20 botol, masing-masing ulangan terdapat 5 botol. Adapun perlakuan tersebut adalah :

Perlakuan:

A = kontrol (tanpa sterilisasi)

B = Sterilisasi dengan clorox 0,525 % selama 9 menit

C = Sterilisasi dengan clorox 1,05 % selama 6 menit

D = Sterilisasi dengan clorox 1,575 % selama 3 menit

Pelaksanaan

A. Persiapan alat dan bahan

Alat –alat yang digunakan adalah autoklaf, oven, Laminar Air Flow , elemeyer, beker glass, gelas ukur, pinset, scalpel, timbangan analitik, hotplate stirer, botol kultur.

Bahan yang digunakan adalah agar swallow, akuades steril, gula, pupuk Growmore 21:21:21, NAA, thiamine, plastik kaca, karet gelang, tisu, kertas label, alat tulis, pisang ambon, air kelapa muda, kertas saring, NaOH 10 %, HCl 1N, dan lainnya.

Semua alat-alat kaca yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan kertas stensil. Akuades dimasukan dalam erlemeyer dan disterilkan bersama dengan alat-alat kaca dalam autoklaf selama 60 menit pada tekanan 1,25-1,5 bar. Alat yang sudah steril disimpan dalam oven, dan akuades disimpan di ruang kultur.

B. Pembuatan media

Semua bahan untuk pembuatan media ditimbang sesuai kebutuhan, dilarutkan dalam akuades steril kurang lebih 950 ml, diaduk di atas hotplate stirer, diukur pH media dengan pH meter sampai 5,8, bila pH kurang dari 5,8 ditambahkan larutan NaOH 1%, bila pH lebih dari 5,8 ditambahkan larutan HCl 1N. Tambahkan akuades steril sampai 1000 ml, masukkan bubuk agar, panaskan sambil diaduk diatas hotplate stirrer sampai mendidih. Media yang sudah masak kemudian diidistribusikan ke dalam botol kultur masing-masing 10 ml per botol, ditutup dengan plastik kaca dan diikat dengan karet gelang. Setelah itu disterilkan dengan pada tekanan 1,25 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Media yang sudah disterilkan disimpan dalam ruang steril.

C. Penyediaan Bibit Anggrek dalam botol

Bibit anggrek dalam botol dipilih ukuran seragam, sehat, dan lebih 4 bulan sejak disubkultur. Jenis anggrek yang digunakan adalah dendobium enoby.

D. Sterilisasi Bibit Anggrek (eksplan) di Laboratorium

Sebelum penanaman, bahan tanam disterilkan sesuai dengan perlakuan, semua kegiatan dilakukan dalam Laminar Air Flow Cabinet. Sebelum disterilkan bibit anggrek (4 botol) dikeluarkan dari botol, letakkan di atas petridis, dipotong akar yang panjang, buang daun kuning dan bersihkan media agar yang melekat pada bibit. Masukkan bibit dalam 4 buah erlemeyer dan diberi label A, B, C dan D. Kemudian dilakukan sterilisasi sesuai perlakuan.

1. Perlakuan A

Tanpa perlakuan (kontrol), atau tanpa sterilisasi. Bibit langsung ditanam ke botol media sebanyak 1 bibit per botol sebanyak 20 botol.

2. Perlakuan B
 - a. Rendam bibit dalam clorox 0,525 % (Bayclin 10%) selama 9 menit, bilas dengan akuades steril tiga kali.
 - b. Eksplan yang sudah steril diletakkan dalam petridis,
 - c. Bibit langsung ditanam ke botol media sebanyak 1 bibit per botol sebanyak 20 botol.

3. Perlakuan C
 - a. Rendam bibit dalam clorox 0,525 % (Bayclin 10%) selama 9 menit, bilas dengan akuades steril tiga kali.
 - b. Eksplan yang sudah steril diletakkan dalam petridis,
 - c. Bibit langsung ditanam ke botol media sebanyak 1 bibit per botol sebanyak 20 botol.

4. Perlakuan D
 - a. Rendam bibit dalam clorox 0,525 % (Bayclin 10%) selama 9 menit, bilas dengan akuades steril tiga kali.
 - b. Eksplan yang sudah steril diletakkan dalam petridis,
 - c. Bibit langsung ditanam ke botol media sebanyak 1 bibit per botol sebanyak 20 botol.

E. Pemeliharaan

Eksplan yang sudah ditanam dalam botol kultur disimpan diletakkan di atas rak kultur di dalam ruang kultur. Pemeliharaan dilakukan dengan cara menyemprot semua botol kultur dengan alkohol 70%, dilakukan setiap hari.

F. Pengamatan

Pengamatan kultur dilakukan mulai pada umur 3 hari setelah tanam. Parameter pengamatannya adalah (1) jumlah subkultur yang terkontaminasi dan (2) hari pertama munculnya kontaminasi dan (3) jenis kontaminasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Jumlah Eksplan Terkontaminasi

Hasil pengamatan terhadap jumlah kontaminasi terhadap subkultur bibit angrek pada perlakuan modifikasi metode sterilisasi sub kultur angrek dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah subkultur yang Terkontaminasi

Perlakuan	Rata-rata jumlah terkontaminasi (%)
A	30,00 %
B	10,00 %
C	5,00 %
D	0,00 %

Pada Table 1. terlihat bahwa perlakuan A menunjukkan jumlah kontaminasi tertinggi yaitu 30%, diikuti perlakuan B 10%, perlakuan C 5% dan D 0%. Pada perlakuan A (tanpa sterilisasi) terjadi kontaminasi tertinggi, hal ini menunjukkan bahwa bibit anggrek dalam botol tersebut sudah ada bibit kontaminannya, sehingga ketika mendapat makanan yang baru mikroorganisme tersebut langsung berkembang. Menurut Widiastuti, Deviyanti (2018) media dalam kultur jaringan tanaman umumnya terdiri dari hara makro, hara mikro, vitamin, asam amino, gula, bahan pematid dan zat pengatur tumbuh. Semua bahan tersebut ternyata merupakan sumber nutrisi yang diperlukan juga untuk pertumbuhan jamur dimana Suryani et al (2020) mengatakan bahwa senyawa-senyawa nutrisi yang diperlukan untuk kehidupan jamur adalah senyawa organik (gula, sukrosa), sumber nitrogen (Urea, asam amino), ion-ion organik dan anorganik serta vitamin dan zat pengatur tumbuh.

Pada penelitian ini perlakuan jumlah konsentrasi sterilisasi (clorox) lebih berpengaruh dibanding lamanya waktu steril. Semakin tinggi konsentrasi clorox semakin bagus hasil sterilisasi. Hal ini terjadi pada perlakuan D (sterilisasi dengan clorox 1,575% selama 3 menit) dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang ada pada bibit anggrek yang di subkultur. Dalam sterilisasi bahan tanam, hal yang penting diperhatikan adalah bahwa sel tanaman kontaminan adalah sama –sama benda hidup, kontaminasi harus dihilangkan tanpa mematikan sel tanaman, dan pemakaian natrium hipoklorid (clorox) konsentrasi 1-2% dapat digunakan untuk sterilisasi permukaan eksplan (Widyastuti et al, 2018).

2. Hari Pertama Muncul Kontaminasi

Hasil pengamatan terhadap hari pertama munculnya kontaminasi terhadap subkultur bibit anggrek pada perlakuan modifikasi metode sterilisasi sub kultur anggrek dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hari pertama muncul kontaminasi

Perlakuan	Hari pertama muncul kontaminasi (hst)
A	3
B	7
C	40
D	-

Pada Table 2. terlihat bahwa perlakuan A kontaminan muncul pada hari ke 3, perlakuan B hari 7, perlakuan C hari ke 40 dan perlakuan D tidak ada kontaminan. Perlakuan A (tanpa serilisasi) menunjukkan bahwa adanya mikroorganisme pada subkultur bibit anggrek, pada saat yang memungkinkan langsung tumbuh dengan cepat. Menurut Suliansyah (2013) kontaminasi mampu untuk tumbuh dengan baik pada media tanpa adanya bahan tanam dan kontaminasi kultur akan muncul setelah eksplan kontak dengan medium selama 24-36 jam .

Pada perlakuan D (sterilisasi dengan clorox 1,575 % selama 3 menit) dapat membunuh mikroorganisme yang ada pada bibit anggrek yang disubkultur, sedangkan perlakuan B ((sterilisasi dengan clorox 0,525 % selama 9 menit) belum dapat mematikan mikrooragnisme yang ada pada subkultur bibit anggrek, tetapi dapat memperlambat munculnya kontamian seperti pada perlakuan C (sterilisasi dengan clorox 1,050 % selama 6 menit) kontaminasi terjadi pada hari ke 40 setelah tanam. Menurut Rindang (2015), konsentrasi bahan sterilan yang terlalu rendah tidak efektif karena tidak mampu membunuh mikroorganisme yang ada dipermukaan eksplan.

3. Jenis Kontaminan

Hasil pengamatan terhadap jenis kontaminan terhadap subkultur bibit anggrek pada perlakuan modifikasi metode sterilisasi sub kultur anggrek dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Jenis kontaminan

Perlakuan	Jamur (%)	Bakteri (%)
A	30,00 %	0
B	10,00 %	0
C	5,00 %	0
D	0,00 %	0

Pada Table 3. terlihat jenis kontaminan yang menyerang hasil subkultur bibit anggrek adalah jamur. Hal ini disebabkan karena bahan tanam yang digunakan berasal dari laboratorium atau bahan sudah tumbuh dengan baik secara kultur jaringan, dan perlakuan subkultur diperlukan untuk meregenerasi tanaman dalam botol, seperti untuk mengganti media tanam, untuk tahapan pertumbuhan selanjutnya, dan lain-lain Sehingga kontaminasi hanya terjadi pada permukaan bahan tanam, bukan pada jaringan dalam tanaman. Menurut Widyastuti et all (2018) di negara tropis kontaminasi permukaan merupakan hal yang cukup serius, sehingga beberpaa tahap sterilisasi harus dilakukan. Selanjutnya Widiantoko (2014) menjelaskan bahwa klorin (clorox) sering digunakan sebagai disinfektan untuk menghilangkan mikroorganisme yang tidak dibutuhkan dan klorin sangat toksik bagi mikroorganisme dengan cara menghambat aktivitas metabolisme mikroorganisme tersebut.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil dan pembahasan dapat diambil kesimpulan bahwa modifikasi metode sterilisasi subkultur bibit anggrek memberikan hasil yang terbaik pada perlakuan D yaitu sterilisasi dengan clorox 1,575% selama 3 menit. Lamanya waktu sterilisasi tidak berpengaruh terhadap keberhasilan proses sterilan.

Berdasarkan pembahasan dan kesimpulan diatas dapat disarankan untuk melakukan sterilisasi subkultur anggrek dengan clorox 1,575% selama 3 menit.

DAFTAR PUSTAKA

- Dwiyani Rindang. 2015. Kultur Jaringan Tanaman. Penerbit Pelawa Sari. Bali. 75 hal.
- Lestari, EG. 2008. Kultur Jaringan. Penerbit Akademia. Bogor. 60 hal.
- Sandra Edi.2013. Cara Mudah Memahami dan Menguasai Kultur Jaringan. IPB Press. Bogor.112 hal.
- Suliansyah, Irfan. 2013. Kultur Jaringan Tanaman. Leutikaprio. Yogyakarta. 211 hal.
- Suryani Y, Taupiqurrahman O, Kulsum Y. 2020. Mikologi. PT. Freeline Cipta Gramedia.128 hal. <http://digilib.uinsgd.ac.id>. Buku Mikologi. Unduh. 9 Januari 2021
- Widiantoko.2014. Mengenal Lebih Dekat Disinfektan Klorin. <http://lordbroken.wordpress.com>. Unduh 20 September 2018.
- Widiastuti N, Deviyanti J. 2018. Kultur Jaringan. Teori dan Praktik Perbanyakan Tanaman secara In-Vitro. Penerbit ANDI Yogyakarta. 328 hal.
- Zulkarnain. 2009. Kultur Jaringan Tanaman. Solusi Perbanyakan Tanaman Budidaya. PT. Bumi Aksara. Jakarta.249 hal.