

PENGARUH STERILAN DAN WAKTU PERENDAMAN PADA EKSPLAN DAUN KENCUR (*Kaemferia galanga* L) UNTUK MENINGKATKAN KEBERHASILAN KULTUR KALUS

Anis Shofiyani dan Oetami Dwi Hajoeningtjas
Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Purwokerto
Jl. Raya Dukuhwaluh PO Box 202 Purwokerto

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh senyawa kimia Bayclin (Natrium hipoklorid/NaClO) dan alkohol 70% terhadap penurunan kontaminasi eksplan daun kencur, mencari pengaruh waktu perendaman senyawa kimia sterilan terhadap pertumbuhan eksplan daun kencur serta mengetahui pengaruh interaksi antara senyawa kimia sterilan dan waktu perendaman terhadap perolehan kultur kalus kencur yang bebas kontaminasi.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2009 sampai dengan bulan April 2010 di Laboratorium Kultur Jaringan Universitas Muhammadiyah Purwokerto. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 ulangan. Variabel pengamatan meliputi : Persentase kontaminasi, persentase eksplan yang tumbuh, waktu pertama kontaminasi muncul, dan sumber kontaminan (Bakteri/jamur).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Penggunaan senyawa kimia bayclin (Natrium hipoklorid/NaClO) 20% dan alcohol 70% mampu mengurangi kontaminasi baik eksternal maupun internal yang disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Waktu perendaman eksplan dalam senyawa kimia sterilan dengan lama waktu perendaman berkisar 5-10 menit mampu menurunkan kontaminasi antara 35-56 % dalam penelitian ini. Kombinasi penggunaan senyawa kimia bayclin 20% selama 10 menit dan alcohol 70% selama 10 menit mampu menurunkan kontaminasi pada eksplan berkisar 42%.

PENDAHULUAN

Konsep hidup kembali ke alam (*back to nature*) saat ini semakin digalakkan dengan tujuan menekan penggunaan bahan-bahan sintetis (mencegah efek sampingnya), mengendalikan pola hidup yang konsumtif dan mengoptimalkan potensi alam yang ada. Salah satu realisasinya

adalah penggunaan obat tradisional yang bersumber dari tumbuhan. Berdasarkan hal itu dapat diperkirakan bahwa permintaan obat tradisional baik dalam negeri maupun luar negeri akan meningkat. Peningkatan tersebut akan dipacu oleh semakin tingginya harga obat sintetis dan khususnya di Indonesia harganya

naik sampai 400 % akibat krisis ekonomi (Ruspany, 2000 *cit* Shofiyani, 2003).

Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai obat yaitu kencur (*Kaempferia galanga* L) . Kencur banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional (jamu), fitofarmaka, industri kosmetika, penyedap makanan dan minuman, rempah, serta bahan campuran saus rokok pada industri rokok kretek. Secara empirik kencur digunakan sebagai penambah nafsu makan, infeksi bakteri, obat batuk, disentri, tonikum, ekspektoran, masuk angin, sakit perut karena rimpangnya mengandung antara lain saponin, flavonoid, fenol serta minyak atsiri (Syamsuhidayat dan Johnny, 1991).

Minyak atsiri didalam rimpang kencur mengandung etil sinnamat dan metil p-metoksisinamat yang banyak digunakan didalam industri kosmetika dan dimanfaatkan sebagai obat asma dan anti jamur. Banyaknya manfaat kencur memungkinkan pengembangan pembudidayaannya dilakukan secara intensif yang disesuaikan dengan

produk akhir yang diinginkan (Oti, *et.al.* 2005).

Senyawa saponin, flavonoid, fenol serta minyak atsiri yang terkandung di dalam kencur merupakan hasil metabolit sekunder suatu tanaman (Indrayanto, 1987). Tanaman obat dan aromatik dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder bernilai ekonomi tinggi, seperti vinblastina/ vinkristinapada tanaman tapak dara (*Vinca rosea*), ajmalisina, digitalis (*Dioscorea* sp), kinina pada tanaman kina (*Cinchoa* sp.), kodeina, yasmim pada tanaman melati (*Jasminum sambac*), piretrin pada tanaman Piretrum (*Pyrethrum pelargonium*) dan spearmint pada tanaman mentha (*Mentha* sp.), (Harris, 1989).

Dalam kenyataannya, produksi metabolit sekunder dari rimpang kencur untuk kebutuhan pabrik-pabrik industry sangat dipengaruhi oleh keberadaan dan pertumbuhan tanaman di lapang yang ditentukan oleh berbagai factor lingkungan seperti tanah, nutrisi, iklim serta hama dan penyakit. Salah satu upaya untuk menghasilkan

metabolit sekunder dengan jumlah yang banyak adalah dengan teknologi kultur jaringan seperti kultur kalus. Kultur *in vitro* tidak hanya dapat digunakan untuk konservasi dan perbanyak tanaman, melainkan dapat juga diterapkan untuk produksi metabolit sekunder. Melalui teknik ini, produksi metabolit sekunder tidak bergantung kepada sumber tanaman di lapang.

Tahap awal kegiatan kultur kalus yang memiliki peran penting atas keberhasilan kegiatan ini adalah penyediaan bahan tanam/eksplan yang bebas dari kontaminasi. Metode sterilisasi yang digunakan dengan ketepatan cara, bahan sterilan maupun waktu sterilisasi yang digunakan akan menentukan keberhasilan proses sterilisasi yang dilakukan.

Berbagai cara sterilisasi telah banyak dilakukan oleh peneliti maupun pelaksana kultur *in vitro* dengan menggunakan berbagai macam cara yang diharapkan efektif untuk menghilangkan sumber kontaminan yang terdapat dalam eksplan. Kombinasi bahan sterilan dan waktu

perendaman yang tepat merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan sterilisasi. Ada berbagai bahan kimia sterilan yang dibutuhkan untuk sterilisasi eksplan yaitu natrium hipoklorit (NaClO), Sodium hipoklorit (klorox), merkuri khlorit (Sublimat), detergent dan alkohol 70%.

Berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa penggunaan senyawa-senyawa kimia seperti bayclin, mercury khlorit dan alkohol 70% yang dikombinasikan dengan waktu perendamandalam proses sterilisasi eksplan cukup baik untuk menurunkan oersentase eksplan yang terkontaminasi. Namun demikian sejauh mana peran senyawa kimia tersebut terhadap penurunan persentase kontaminasi ekplan daun kencur perlu dikaji lebih jauh dalam penelitian ini.

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, waktu penelitian selama 6 (enam) bulan.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Laminair air flow cabinet (LAF); botol kultur; timbangan analitis; skalpel dan blade; pinset; pH meter; lampu spirtus; gelas ukur; batang pengaduk; otoklaf; lemari es.

2. Bahan

Alkohol 70%, Bayclin, Detergen, 2,4-D; BAP; alumunium foil; HgCl₂; aquades; asam sulfat; agar; sukrosa; CaCl₂.2H₂O; CoCl₂.6H₂O; CuSO₄.5H₂O; FeSO₄.7H₂O; Glisin; H₃BO₃; KH₂PO₄; KI; MgSO₄.7H₂O; MnSO₄.4H₂O; Myoinositol; Na₂EDTA;

NaMoO₄.2H₂O; NH₄NO₃; Asam Nikotinat; Piridoksin-HCl; Thiamin-HCl; Sukrosa; ZnSO₄.7H₂O.

C. Rancangan Percobaan

Perlakuan untuk sterilisasi eksplan kencur terdiri atas dua faktor yaitu konsentrasi senyawa kimia bayclin (natrium hipoklorid/NaClO), dan alkohol 70%. Kombinasi perlakuan sterilisasi eksplan dapat dilihat pada tabel 2. Semuanya disusun acak dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga ulangan, dan setiap unit perlakuan menggunakan 5 botol kultur.

Tabel 2. Konsentrasi Bayclin, Alkohol 70% dan lama perendaman eksplan daun kencur.

Perlakuan	Kombinasi
S1	Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 5'
S2	Bayclin 20 % selama 10' + Alkohol 70% selama 5'
S3	Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 10'
S4	Bayclin 20 % selama 10' + Alkohol 70% selama 10'
S5	Alkohol 70% selama 15'
S6	Bayclin 20% selama 15'

D. Tata Laksana Penelitian

1. Sumber dan Sterilisasi Eksplan

Bahan yang akan digunakan sebagai eksplan adalah daun kencur. Penyediaan eksplan dilakukan dengan cara emilih rimpang kencur yang sehat dan baik. Kemudian rimpang direndam dalam detergen selama 12 jam, kemudian dibilas dalam air mengalir dan dikeringanginkan. Rimpang kencur kemudian disimpan dengan cara dihamparkan dalam ruangan yang bersuhu sejuk, aerasi baik dan tidak terkena cahaya langsung untuk mempercepat pertumbuhan tunas. Tunas yang sudah terbentuk dengan menghasilkan daun kencur yang sudah membuka digunakan sebagai bahan tanam/eksplan. Potongan daun dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm dari daun yang

sudah terpilih digunakan untuk tahapan penelitian selanjutnya

2. Sterilisasi eksplan

Bahan tanaman yang sudah diperoleh kemudian diperlakukan sesuai dengan rancangan penelitian (tabel 2). Bahan kimia sterilan yang digun akan antara lain Bayclin dan alcohol 70%. Setelah melalui proses sterilisasi eksplan ditanam dalam media induksi kalus yang bertujuan untuk menumbuhkan eksplan agar terbentuk kalus.

3. Induksi kalus

Untuk menginduksi pembentukan kalus dari eksplan yang ditanam dilakukan pada medium dasar MS dengan penambahan 2,4-D 0 - 2 mg/l medium dan BAP 0 - 0,3 mg/l medium seperti tampak pada Tabel 3.

Tabel 3. Konsentrasi 2,4-D dan BAP untuk induksi kalus

BAP (mg/l) 2,4-D(mg/l)	0	0,1	0,2	0,3
0	D0B0	D0B1	D0B2	D0B3
0,5	D1B0	D1B1	D1B2	D1B3
1	D2B0	D2B1	D2B2	D2B3
1,5	D3B0	D3B1	D3B2	D3B3
2	D4B0	D4B1	D4B2	D4B3

Induksi kalus dilakukan dengan cara menanam eksplan dalam medium induksi tunas. Selanjutnya ditentukan medium yang paling banyak menginduksi pembentukan kalus setelah delapan minggu kultur

4. Variabel yang diamati

Variabel yang diamati meliputi: Persentase kontaminasi, persentase eksplan yang tumbuh, waktu pertama kontaminasi muncul, dan sumber kontaminan (Bakteri/jamur).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Waktu Pertama Kontaminasi Tumbuh

Hasil pengamatan waktu pertama kontaminasi muncul menunjukkan bahwa rerata waktu pertama kontaminasi muncul menunjukkan variasi waktu yang beragam. Dalam pengamatan ini asal kontaminasi berpengaruh terhadap waktu yang dibutuhkan sampai sumber kontaminasi muncul dalam media. Waktu yang dibutuhkan bervariasi dengan waktu yang singkat (kurang dari 7 hari) hingga membutuhkan waktu cukup lama (lebih

dari 10 hari) hingga kontaminasi muncul.

Dari variasi waktu tersebut, dalam pengamatan waktu pertama kontaminasi muncul dibagi menjadi 2 (dua) kelompok sumber kontaminasi yaitu kontaminasi Eksternal (waktu pertama kontaminasi muncul kurang dari 10 hari) dan kontaminasi internal (waktu pertama kontaminasi muncul lebih dari 10 hari). Data hasil pengamatan waktu pertama kontaminasi muncul dapat dilihat pada tabel 4.

Dari data Tabel 4. terlihat bahwa waktu pertama kontaminasi muncul dari masing-masing perlakuan sterilisasi menunjukkan perlakuan S4 (perendaman dalam Bayclin 20% selama 10 menit dilanjutkan perendaman dalam alkohol 70% selama 10 menit) menunjukkan tidak terjadi kontaminasi eksternal. Perlakuan S3 (Bayclin 2 % selama 5' + Alkohol 70% selama 10') memberikan rerata waktu 4,5 hari, perlakuan S1 (Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 5') memberikan rerata waktu 6,6 hari,

Tabel 4. Rerata waktu Pertama kontaminasi muncul
(hari setelah inokulasi)

Perlakuan	Kontaminasi Eksternal	Kontaminasi Internal
S1	6,6	18
S2	7,5	16,5
S3	4,5	14
S4	7	16,75
S5	7	16,5
S6	7,5	16

perlakuan S4 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 10') dan S5 (perendaman dalam Alkohol 70% selama 15 menit) selama 7 hari, sedangkan perlakuan S2 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 5') dan S6 (Bayclin 20% selama 15') memberikan rerata waktu 7,5 hari.

Sedangkan untuk kontaminasi internal rerata waktu pertama kontaminasi muncul pada masing-masing perlakuan menunjukkan variasi waktu antara 14 hari – 18 hari setelah inokulasi/tanam. Perlakuan S1 (perendaman dalam bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 5') menunjukkan rerata waktu pertama kontaminasi muncul 18 hari; S4 (perendaman dalam bayclin 20% selama 10' dilanjutkan dengan perendaman dalam alkohol 70% selama 10') selama

16,75 hari; S2 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 5') dan S5 (perendaman dalam alkohol 70% selama 15') selama 16,5 hari ; S6 S6 (Bayclin 20% selama 15') selama 16 hari dan S3(Bayclin 2 % selama 5' + Alkohol 70% selama 10') selama 14 hari.

Dari data tersebut terlihat bahwa perlakuan S4 (perendaman dalam bayclin 20% selama 10' dilanjutkan dengan perendaman dalam alkohol 70% selama 10') dan S5 (perendaman dalam alkohol 70% selama 15') memberikan pengaruh yang terbaik terhadap proses sterilisasi pada eksplan dalam rangka menghilangkan mikroorganisme penyebab kontaminasi eksternal baik yang disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Namun demikian perlakuan ini masih belum mampu menghilangkan kontaminasi

yang disebabkan oleh sumber kontaminan internal yang terbawa dari bahan tanam /eksplan yang digunakan.

2. Sumber Kontaminasi

Pengamatan terhadap sumber kontaminasi pada penelitian ini menunjukkan bahwa sumber kontaminan pada media disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Kontaminasi berasal dari kontaminan eksternal baik berupa jamur maupun bakteri, ataupun kontaminan internal yang pada umumnya berasal dari bakteri yang tumbuh di dalam jaringan tanaman. Sumber kontaminan yang menyerang dapat dilihat pada tabel 5 berikut ini.

Dari data diatas dapat terlihat bahwa perlakuan sterilisasi eksplan S1 (bayclin 20% selama 5' + alkohol 70 % selama 5') dan S3 (Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 10') menyebabkan kontaminasi eksternal dari sumber kontaminan jamur yaitu masing-masing sebanyak 35 %, perlakuan S2 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 5') menyebabkan kontaminasi dari sumber kontaminan jamur sebanyak 21%, perlakuan S5 (Alkohol 70% selama 15 ') dan S6 (Bayclin 20 % selama 15') masing-masing kontaminasi oleh jamur sebanyak 7%, sedangkan perlakuan S4 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 10') mampu menghambat pertumbuhan jamur.

Tabel 5. Persentase media terkontaminasi dari berbagai sumber kontaminasi (%)

Perlakuan	Eksternal		Internal	
	Jamur	Bakteri	Jamur	Bakteri
S1	35	7	0	7
S2	21	14	0	14
S3	35	14	7	0
S4	0	14	0	28
S5	7	0	0	28
S6	7	28	0	21



a. Kontaminasi oleh jamur



b. Kontaminasi oleh bakteri

Gambar 2. Kontaminasi eksternal dengan sumber kontaminan jamur dan bakteri

Sumber kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri terlihat pada perlakuan S6 (Bayclin 20% selama 15') menunjukkan persentase terbanyak yaitu 28% kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri eksternal, perlakuan S2 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 5'); S3 (Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 10') dan S4 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 10') masing-masing sebanyak 14% kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri, S1 (bayclin 20% selama 5' + alkohol 70 % selama 5') sebanyak 7 %, sedangkan S5 (Alkohol 70% selama 15 ') tidak menimbulkan kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri eksternal.

Perkembangan kontaminan internal untuk masing-masing perlakuan menunjukkan hanya perlakuan); S3 (Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 10') yang masih dapat menimbulkan kontaminasi internal yang disebabkan oleh jamur, sedangkan perlakuan lainnya ternyata masih menyebabkan timbulnya kontaminasi internal yang disebabkan oleh bakteri, dengan hasil yaitu perlakuan S1 sebanyak 7%, S2 sebanyak 14 %, S6 sebanyak 21 % , dan S4 dan S5 masing-masing sebanyak 28% kontaminasi internal yang disebabkan oleh bakteri.



Gambar 3. Eksplan yang terkontaminasi bakteri internal (eksudat berwarna merah)

3. Persentase Kontaminasi

Pengamatan terhadap persentase eksplan yang terkontaminasi dalam penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum persentase kontaminasi dibawah 50%, hanya pada perlakuan S3 dan S6 persentase kontaminasi diatas 50%, untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Persentase eksplan yang terkontaminasi (%)

Perlakuan	Persentase Kontaminasi
S1	49
S2	49
S3	56
S4	42
S5	35
S6	56

Dari tabel 6 terlihat bahwa perlakuan S5 (Alkohol 70% selama 15 ') menunjukkan persentase kontaminasi terendah yaitu hanya 35%, perlakuan S4 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 10') sebanyak 42%, perlakuan S1 (bayclin 20% selama 5' + alkohol 70 % selama 5') dan S2 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 5') sebanyak 49%, sedangkan perlakuan S3 (Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 10') dan S6 (Bayclin 20% selama 15') menunjukkan persentase kontaminasi tertinggi yaitu sebanyak 56%.

4. Persentase Eksplan yang tumbuh

Pengamatan persentase eksplan yang tumbuh dapat dilihat pada tabel 7 dibawah ini.

Dalam tabel 7 persentase eksplan yang tidak terkontaminasi pada masing-masing perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan S5 (Alkohol 70% selama 15 ') menunjukkan persentase eksplan tidak terkontaminasi tertinggi yaitu sebesar 65%; perlakuan S4 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 10') sebanyak 58%, perlakuan S1 (bayclin 20% selama 5' + alkohol 70 %

selama 5') dan S2 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 5') sebanyak 51%, sedangkan perlakuan S3 (Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 10') dan S6 (Bayclin 20% selama 15') menunjukkan persentase eksplan yang tidak terkontaminasi terendah yaitu sebanyak 44%.

Sedangkan persentase eksplan yang tumbuh dari eksplan yang tidak terkontaminasi menunjukkan tidak adanya eksplan yang mampu tumbuh pada media yang digunakan dengan perlakuan sterilisasi tersebut.

Tabel 7. Persentase eksplan yang tidak terkontaminasi dan persentase eksplan yang tumbuh

Perlakuan	Persentase eksplan tidak terkontaminasi (%)	Persentase eksplan tumbuh (%)
S1	51	0
S2	51	0
S3	44	0
S4	58	0
S5	65	0
S6	44	0



Gambar 4. Eksplan yang tidak terkontaminasi umur 20 hst

C. Pembahasan Umum

Data penelitian menunjukkan bahwa perlakuan yang digunakan baik jenis sterilan yang diaplikasikan maupun lamanya waktu perendaman eksplan dalam larutan sterilan memberikan hasil yang beragam untuk masing-masing perlakuan.

Perlakuan S3 (Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 10') menunjukkan waktu yang singkat sekitar 4,5 hari untuk memunculkan kontaminasi eksternal baik berupa jamur maupun bakteri. Begitu pula untuk pertumbuhan kontaminasi internal dengan sumber kontaminan berupa jamur membutuhkan waktu yang lebih singkat dibandingkan

perlakuan lainnya yaitu kurang lebih 14 hari setelah tanam. Persentase kontaminasi pada perlakuan ini tertinggi sama dengan perlakuan S6 (Bayclin 20% selama 15') yaitu masing-masing sebesar 56%.

Perlakuan S5 (Alkohol 70% selama 15 ') menunjukkan persentase eksplan terkontaminasi terendah yaitu sebesar 35 %, dengan sumber kontaminan berupa jamur untuk kontaminasi eksternal dengan waktu kemunculan 7 hari setelah tanam dan bakteri untuk kontaminasi internal yang muncul setelah 16,75 hari tanam.

Tingginya kontaminasi yang terjadi menunjukkan bahwa lamanya perendaman dalam etanol yang

dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan clorox yang digunakan belum efektif membunuh agensia penyebab kontaminasi seperti jamur dan bakteri. Gejala yang ditimbulkan dari adanya serangan jamur adalah tumbuhnya hifa-hifa jamur pada permukaan media maupun eksplan setelah inokulasi selama rata-rata 4-10 hari setelah tanam. Hifa-hifa yang terbentuk berwarna putih yang selanjutnya dalam kurun waktu tertentu berubah menjadi berwarna coklat dan hitam. Begitu pula kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri lama penyebaran agensia kontaminan berkisar anatar 4 – 7 hari setelah tanam, dicirikan dengan munculnya lendir berwarna kuning kecoklatan di permukaan media dan eksplan.

Tingginya persentase kontaminasi eksternal baik yang disebabkan oleh jamur maupun bakteri cenderung terbawa lewat alat maupun eksplan yang digunakan dalam penelitian, terutama yang terbawa oleh eksplan. Perlakuan sterilisasi eksplan yang dilakukan dengan menggunakan variasi

bahan kimia sterilan dan lamanya waktu perendaman eksplan dalam sterilan masih memberikan persentase kontaminasi eksternal yang cukup tinggi khususnya pada perlakuan S1, S2, S3 dan S6 yaitu masing-masing sebesar 42 %, 35%, 49% dan 35% dalam penelitian ini. Tingginya kontaminasi eksternal pada perlakuan tersebut dimungkinkan karena kondisi bahan tanam yang digunakan yaitu berupa rimpang kencur mengandung sumber kontaminan yang cukup tinggi dari dalam tanah.

Seperti kita ketahui rimpang kencur tumbuh didalam tanah, menyebabkan keadaan rimpang membawa kotoran yang terbawa dari lapangan. Proses pembersihan rimpang dari kotoran yang terbawa dari lapangan membutuhkan ketelitian dan perlakuan yang intensif untuk menghilangkan sumber kontaminan tersebut. Perlakuan yang diberikan ternyata masih belum mampu menghilangkan sumber kontaminan yang terbawa dari eksplan yang kita gunakan.

Kontaminasi internal juga terjadi dalam penelitian ini. Dimana sumber

kontaminan yang mendominasi adalah bakteri internal yang berasal dari dalam jaringan tanaman. Bakteri-bakteri ini sampai sekarang belum dapat diidentifikasi. Kontaminan internal ini sangat sulit diatasi, karena sterilisasi permukaan ternyata belum dapat mengurangi kontaminasi internal ini.

Dalam penelitian ini waktu yang dibutuhkan sumber kontaminan untuk tumbuh berkisar antara 10 – 20 hari setelah tanam. Perlakuan S3 (Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 10') waktu yang dibutuhkan untuk sumber kontaminan muncul adalah kurang lebih 14 hari setelah tanam dengan jamur sebagai sumber kontaminan. Sedangkan perlakuan lainnya sumber kontaminan yang muncul adalah bakteri dengan waktu pertama muncul kurang lebih 16 – 18 hari setelah tanam. Gejala kontaminasi internal yang ditimbulkan oleh bakteri ditunjukkan dengan munculnya eksudat lendir yang berwarna merah pada tepi-tepi bekas potongan pada eksplan. Beberapa saat kemudian eksudat menyebar keseluruh bagian eksplan dan

menyebabkan eksplan mengalami kematian.

Sulitnya kontaminasi internal diatasi dalam proses sterilisasi ini dikarenakan sumber kontaminan berupa jamur maupun bakteri sudah terbawa/tumbuh didalam jaringan tanaman yang digunakan sebagai eksplan. Permasalahan seperti ini umum muncul pada jenis-jenis tanaman yang dibudidayakan dengan cara vegetatif. Tanaman kencur yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan perbanyakan vegetatif dengan rimpang kencur sebagai bahan tanaman dalam perbanyakan secara konvensional. Alternatif yang dapat dilakukan untuk mengurangi kontaminasi internal adalah dengan pemilihan rimpang kencur yang selektif sebelum digunakan sebagai bahan tanam (eksplan) diupayakan menggunakan rimpang kencur yang sehat dan terbebas dari agensia penyebab kontaminasi eksternal dan internal dicirikan dengan bentuk rimpang yang segar, padat dan ukurannya cukup besar. Selain itu juga

dapat dilakukan pencegahan sistemik dengan penambahan antibiotik dengan dosis 50 mg/liter media dan fungisida untuk mengurangi infeksi jamur internal. Namun demikian penggunaan antibiotik harus selektif dan hati-hati karena penggunaan antibiotik yang kurang tepat akan menyebabkan agensia kontaminan bakteri justru akan menyebabkan toleransi.

Persentase eksplan yang tidak terkontaminasi dalam penelitian ini menunjukkan bahwa proses sterilisasi yang dilakukan cukup efektif untuk mengurangi kontaminasi pada eksplan yang digunakan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase eksplan yang tidak terkontaminasi untuk masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut perlakuan S5 (Alkohol 70% selama 15') menunjukkan persentase eksplan tidak terkontaminasi tertinggi yaitu sebesar 65%; perlakuan S4 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 10') sebanyak 58%, perlakuan S1 (bayclin 20% selama 5' + alkohol 70 % selama 5') dan S2 (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70%

selama 5') sebanyak 51%, sedangkan perlakuan S3 (Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 10') dan S6 (Bayclin 20% selama 15') menunjukkan persentase eksplan yang tidak terkontaminasi terendah yaitu sebanyak 44%.

Namun demikian dari jumlah eksplan yang tidak terkontaminasi belum ada yang mampu menghasilkan kalus sesuai dengan yang diharapkan. Tidak terjadinya kalus dalam penelitian ini bukan disebabkan oleh proses sterilisasi yang digunakan namun lebih cenderung pada zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang ditambahkan dalam medium tumbuh. Kondisi eksplan yang diisolasi dalam medium induksi tunas pada umur 20 hari setelah induksi masih menunjukkan kondisi yang cukup baik, ditandai dengan warna eksplan yang masih hijau. Namun demikian lambat laun eksplan mengalami perubahan warna menjadi kuning yang menandakan sel-sel dalam jaringan daun mengalami kerusakan. Hal ini dimungkinkan karena medium induksi kalus yang digunakan masih

belum sesuai untuk induksi kalus dengan eksplan daun kencur dalam penelitian ini.

Sesuai pernyataan Santoso (2004), membuat kalus berarti menginduksi dari bagian tanaman tertentu, yang dirangsang secara hormonal. Kesesuaian dan ketepatan pemilihan jenis dan perimbangan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan akan mempengaruhi keberhasilan pembentukan kalus pada eksplan yang digunakan. Ketidakmampuan eksplan membentuk kalus lebih disebabkan oleh karena kurang tepatnya menggunakan zat pengatur tumbuh yang digunakan khususnya perimbangan konsentrasi 2,4 D dan NAA yang digunakan.

Selain perimbangan zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk induksi tunas, penggunaan sumber eksplan juga berpengaruh terhadap keberhasilan induksi tunas. Dalam penelitian ini eksplan yang digunakan berupa daun kencur yang sudah membuka sempurna (dewasa). Menurut Santoso (2004), penggunaan bagian tanaman yang

masih juvenil (muda/meristematik) akan lebih memudahkan induksi kalus dibandingkan jaringan yang sudah mengalami pendewasaan seperti organ daun. Hal ini berkaitan dengan kondisi totipotensi bahan tanam, dimana pada umumnya sifat totipotensi lebih banyak dimiliki oleh bagian tanaman yang masih juvenil, muda dan banyak dijumpai pada daerah-daerah meristematik tanaman seperti bagian tunas aksilar.

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan di muka dapat disimpulkan bahwa :

1. Penggunaan senyawa kimia bayclin (Natrium hipoklorid/NaClO) 20% dan alcohol 70% mampu mengurangi kontaminasi baik eksternal maupun internal yang disebabkan oleh jamur maupun bakteri
2. Waktu perendaman eksplan dalam senyawa kimia sterilan dengan lama waktu perendaman berkisar 5-10

menit mampu menurunkan kontaminasi antara 35-56 % dalam penelitian ini.

3. Kombinasi penggunaan senyawa kimia bayclin 20% selama 10 menit dan alcohol 70% selama 10 menit mampu menurunkan kontaminasi pada eksplan berkisar 42%.

B. Saran

Bertitik tolak dari hasil penelitian ini perlu dilakukan kajian lebih lanjut tentang alternatif penggunaan antibiotik dan fungisida untuk mengurangi kontaminasi internal yang terbawa oleh bahan tanam yang digunakan dalam kultur kalus. Selain itu perlu dikaji lebih jauh mengenai penggunaan zat pengatur tumbuh 2,4 D dan NAA dengan variasi konsentrasi yang lebih beragam untuk keberhasilan induksi kalus dengan eksplan daun kencur.

DAFTAR PUSTAKA

- Bajaj, Y.P.S, 1983. *Production of Normal Seeda from Plants Regenerated from the Meristem of Arachis hypogaea and Cicer arietinum Cryopreserved for 20 Months*. Euphica. 32 : 425-430
- Davies, P.J., 1987. *The Plant Hormone: Their Nature, occurrence and Fuction in Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Davies, P.J. (Ed) M. Nijhoff Publ. Dordrecht, Boston, Lancaster. p : 1-11.
- Ditejabun.2000. Statistik Perkebunan Indonesia 1998-2000. *Panili*. Jakarta.
- George, E.F. dan Sherrington, P.D. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exergetic Limited. England. p. 39-71; 331-382.
- Gunawan, L.W., 1988. *Teknik Kultur Jaringan* . Lab. Kultur Jaringan Tanaman Depdikbud Dirjen Dikti, PAU Bioteknologi, IPB Bogor.
- Hadipoenyanti,E. D. Seswita dan N. Ajijjah. 2001. Multiplikasi Tunas Panili Hasil Regenerasi Kalus Secara *In Vitro*. Dalam Prosiding Kongres IV dan Simposium Nasional PERIPI. Yogyakarta. Hal. 283-286.
- Kartha, K.K. 1981. *Meristem Culture and Cryopreservation Method and Application in : Plant Tissue Culture Method and Application in Agriculture* . T.A. Thorpe (ed). Academic Pess. Inc, San Diego, California. Pp :181-209.

- Krikorian, A.D., K. Kelly dan D.L. Smith, 1987. *Hormones in Tissue Culture and Micropropagation in Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Davies, P.J. (Ed) M. Nijhoff Publ. Dordrecht, Boston, Lancaster. p : 593-613
- Mulyaningsih T dan A. Nikmatullah, 2008. *Kultur Jaringan Tanaman*, Fakultas Pertanian UNRAM
- Murashige, T. 1974. *Plant Propagation through Tissue Culture*. Annual Review. Plant Physiology 25 : 135-166.
- Oti R, Rosita SMDM, M. Rahardjo dan Taryono, 2005. *Budidaya Tanaman Kencur*, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatika, Bogor
- Priyono, 2000. *Perbanyakan Abaca (Musa textilis Nee) Melalui Kultur Mata Tunas Secara In vitro*. Pelita Perkebunan () 129-133.
- Purseglove, J.W., E.G. Brown, G.L. Green dan S.R.J. Robins. 1988. *Species*. Vol.2. John Wiley and Sons Inc. New York. 813p.
- Rufledge, C.B dan G.C. Douglas, 1988. *Tips and Micropropagation of 12 Commercial Clones of Polar In-vitro*. *Physiol. Plant* 72 ; 367-373.
- Santoso, U. 1995. *Induksi Kalus Artemisia vulgaris L dari Sumber Eksplan yang Berbeda*. Pusbitan UMM. Malang.
- Santoso, U. Dan Fatimah N, 2004. *Kultur Jaringan Tanaman*. Ed. 2. UMM Press. Malang
- Seswita. D., Hadipoenyanti, E. dan N. Ajijjah. 2001. *Multiplikasi Tunas Panili Hasil Regenerasi Kalus Secara In Vitro*. Dalam Prosiding Kongres IV dan Simposium Nasional PERIPI. Yogyakarta. Hal. 283-286.
- Shofiyani, A. dan A. Suyadi, 2003. *Pemberian Variasi NAA & BAP Terhadap Pertumbuhan Kencur Secara In Vitro*, AGRITECH. Vol.V no.2 , Des 2003. 50 – 56 h.
- Sisunandar dan Julia, D. 2000. *Perbanyakan Pisang Abaka (Musa textilis Nee.) cv. Tangongon secara In vitro*. Laporan Penelitian. FKIP Univ. Muhammadiyah Purwokerto.
- Stapper, R.E. and C.W. Heuser. 1986. *Rapid Multiplikation of Heuchera sanguinea Engelm "Rosamundi" Propagation in vitro*. *Hort. Sci.* 21(4):1043-1044.
- Syamsuhidayat, SS dan Johny, R.H. 1991. *Inventaris Tanaman Obat*, Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 616 p.

-
- Tisserat, B. 1987. *Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration in Plant Cell Culture a Practical Approach*. Dixon, R.A; I.R L(Ed.). Press Limited Oxford.
- Tombe,M. dan D. Sitepu. 1987. *Penyakit Panili di Indonesia*. Edisi Khusus Litro. III(92): 103-108.
- Udarno. L., dan E. Hadipoenyanti. 2001. *Perbanyakan Panili Hibrida Secara In Vitro*. Dalam Prosiding Kongres IV dan Simposium Nasional PERIPI. Yogyakarta. Hal. 283-286
- Zearr, J.B dan M.O. Mapes, 1985. *Action of Growth Regulator in Tissue in Tissue Culture in Forestry*. Bonga J.M. dan Durzan, D.J. (Ed), M Nijhoff & W. Junk Publ. The Hague, The Netherland, p :231-251