PENGARUH BERBAGAI JENIS STERILAN DAN WAKTU PERENDAMAN TERHADAP KEBERHASILAN STERILISASI EKSPLAN DAUN KENCUR (Kaempferia galanga L) PADA TEKNIK KULTUR IN VITRO

Anis Shofiyani, Agus Mulyadi Purnawanto, Reza Zahara Abdul Aziz,

Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Purwokerto Email: shofiyanianis@gmail.com

ABSTRACT

This study aims to determine the effect of sterile and immersion duration on the success of sterilization of kencur (Kaempferia galanga L) leaf explants using in vitro culture techniques and to find out the types of contaminants that emerge. The study was conducted from October 2018 to February 2019, located at the Basic Agrotechnology Laboratory and Plant Engineering Laboratory, Faculty of Agriculture, Universitas Muhammadiyah Purwokerto. The design used was a randomized block design (RBD) with 15 treatments. Each treatment was repeated 3 times. The treatments were the immersed in 6% chlorine for 10 minutes (S1), for 15 minutes (S2), for 20 minutes (S3), the immersed in 0,1 g/ml HgCl2 for 1 minute (S4), for 3 minutes (S5), for 5 minutes (S6), the immersed in HgCl2 0,2 g/ml for 1 minute (S7), for 3 minutes (S8), for 5 minutes (S9), the immersed in HgCl2 0,3 g/ml for 1 minute (S10), for 3 minutes (S11), 5 minutes (S12), immersed in dithane 2 g/l for 1 hour (S13), for 12 hours (S14), for 24 hours (S15). The results showed that the treatment of Dithane sterile 2 g/l water with an immersion duration of 1 hour (S13) significantly affected the percentage of contamination and succeeded in reducing contamination by 44.44%, while the use of chlorine sterile and HgCl2 had no significant effect. The types of contaminants that appear are Macrophomoina sp., Aspergillus sp., Cladosporium sp., And Pseudomonas sp.

Keywords: Sterilization, Kencur, Hgcl2, Chlorine, Dithane

PENDAHULUAN

Kencur (Kaempferia galanga L.) adalah salah tanaman satu temu-temuan (Zingiberaceae) yang berkhasiat sebagai obat. Kencur telah banyak manfaatkan sebagai bahan baku obat tradisional (jamu), fitofarmaka, industri kosmetika, penyedap rasa makanan dan minuman, rempah-rempah. Penelitian sebelumnya menginformasikan peran kencur sebagai penambah nafsu makan, pengobatan infeksi bakteri, obat batuk, disentri, tonikum, ekspektoran, masuk angin, sakit perut karena rimpangnya mengandung antara lain saponin,

flavanoid, fenol serta minyak atsiri (Syamsuhidayat dan Johnny, 1991).

Menurut Rahmat (2004) pada permintaan kencur yang tinggi di Indonesia terutama dari pabrik obat mendorong para petani untuk dapat memenuhi kencur dalam jumlah banyak. Pengembangan tanaman kencur di lapangan pada umumnya menggunakan rimpang hal ini memiliki beberapa kekurangan seperti, rentan terhadap hama dan penyakit, biaya mahal, serta pada produktivitasnya kurang stabil pada musim kemarau (off season). Upaya yang dilakukan saat ini dalam perbanyakan kencur

adalah dengan metode kultur jaringan tanaman karena mampu menghasilkan rimpang kencur dengan hasil yang tinggi dan seragam, serta dapat memenuhi stok bibit steril sehingga dapat digunakan untuk perbanyakan selanjutnya (Lestari, 2011).

Pengembangan bibit tanaman kencur dengan metode kultur in vitro ternyata memiliki kendala, salah satu kendala yang sering dihadapai adalah sterilisasi eksplan untuk mendapatkan bahan tanam yang steril sehingga kegagalan kegiatan kultur in vitro akibat kontaminasi dapat dihindari. Menurut Sandra (2002), sterilisasi merupakan permasalahan utama yang menentukan keberhasilan kultur jaringan, terutama sterilisasi eksplan yang berasal dari luar atau lapang. Jika sterilisasi maka kegiatan gagal selanjutnya tidak bermanfaat.

Kesulitan perbanyakan tumbuhan yang terkontaminasi mikroorganisme dengan kultur jaringan, yaitu bagaimana menghilangkan mikroorganisme sumber kontaminan dengan bahan sterilian tanpa mematikan tumbuhan (eksplan) (Darmono, 2003). Menurut Gunawan (1987) bahan-bahan sterilisasi yang biasa digunakan umumnya bersifat toksik terhadap jaringan. Melihat hal tersebut konsentrasi sterilan harus diperhatikan agar bisa menghilangkan kontaminan tetapi tidak merusak atau mematikan eksplan.

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 streilisasi. Ada berbagai bahan kimia sterilant yang dibutuhkan untuk sterilisasi eksplan yaitu natrium hipoklorit (NaClO), Sodium hipoklorit (klorox), merkuri khlorit (Sublimat), detergent dan alkohol 70% (Shofiyani dan Hajoeningtijas, 2010). Berdasarkan penelitian sebelumnya pada sterilisasi daun tanaman kemiri dengan perlakuan NaClO 1% dengan lama perendaman 2,5 menit terbukti mampu menurunkan kontaminasi hingga 0% 2018). (Lutfiyani, Fauzan et al.(2017) menyatakan pada penelitiannya perlakuan 300 mg/L merupakan konsentrasi HgCl2 terbaik untuk sterilisasi kultur tunas samping jati yang dapat menghasilkan kultur dengan tingkat aseptik tertinggi yaitu sebanyak 85%. Menurut Suratman et al. (2013) Pemberian bahan sterilisasi NaClO 3 % selama 5 menit yang dikombinasikan dengan HgCl2 0,1 % selama 5 menit memberikan hasil yang terbaik dalam menekan persentase terkontaminasi pada eksplan daun.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Alat yang digunakan antara lain: Laminar air flow cabinet (HALF-250), Autoclav (All American 1925X 25Qt 24L), Hot plate magnetic stirer (Favorit HS0707V2), jarum ose, gelas objek, mikroskop (nikon, jepang),

Bahan : daun tanaman kencur varietas

Galesia 2, agar, sukrosa, fungisida Dithane, HgCl2, larutan alkohol 70%, larutan kaporit, aquades, crystal violet, lugol, safranin, media MS, zat pengatur tumbuh (2,4D) 2,4 *Diklorofenoksiasetat* dan (BA) *Benzil Adenin*.

Persiapan dan Sterilisasi Eksplan

Eksplan berupa daun tanaman kencur varietas Galesia 2 yang diperoleh dari BALITRO, Bogor. Daun kedua dijadikan bahan eksplan dalam penelitian ini. Daun kencur yang sudah terpilih dipotong dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm, dan untuk menghilangkan kotoran yang terdapat pada masing-masing eksplan dilakukan pencucian menggunakan air mengalir dan deterjen sampai bersih kemudian melanjutkan dengan sterilisasi sesuai perlakuan.

Penanaman Eksplan dan pemeliharaan

Eksplan yang telah melalui proses sterilisasi sesuai perlakuan selanjutnya ditanam dalam media dasar MS dengan penambahan 2,4 D 2 ppm dan BA 0,5 ppm. Penanaman dilakukan di dalam Laminar Air Flow (LAF) untuk mendapatkan kondisi lingkungan steril pada saat penanaman eksplan yang bertujuan untuk menghindari adanya kontaminasi dari jamur ataupun bakteri.

Pemeliharaan dilakukan untuk menghindari kontaminasi yang disebabkan oleh lingkungan sekitar kultur yang kurang steril dengan melakukan penyemprotan dengan alkohol 70 % pada botol-botol kultur yang berisi eksplan..

Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 15 perlakuan.

Pada masing-masing perlakuan terdapat 3 ulangan dengan 3 sampel pada masing-masing ulangan sehingga digunakan 135 botol eksplan. Sterilisasi yang dilakukan menggunakan 3 (tiga) metode sebagai berikut: **Metode I**

Metode ini menggunakan bahan sterilan berupa larutan kaporit (CaClO₂) dengan konsentrasi 6% yang terdiri atas 3 perlakuan lama perendaman, yaitu dengan waktu lama perendaman 10 menit, 15 menit, dan 20 menit serta dikombinasikan dengan larutan alkohol 70% selama 2 menit.

Metode II

Menggunakan sterilan berupa larutan HgCl2 (Mercuri) dengan konsentrasi 0,1 g/ml; 0,2 g/ml; dan 0,3 g/ml yang dikombinasikan dengan lama perendaman 1 menit, 3 menit, dan 5 menit.

Metode III

Menggunakan larutan Dithane dengan konsentrasi 2 g/l dan lama waktu perendaman selama 1 jam, 12 jam, dan 24 jam serta dikombinasikan dengan alkohol 70% selama 2 menit.

Berdasarkan ketiga metode sterilisasi diatas maka kombinasi perlakuan meliputi : perendaman dalam kaporit 6% selama 10 menit (S1), 15 menit (S2), 20 menit (S3), direndam dalam HgCl2 0,1 g/ml selama 1 menit (S4), selama 3 menit (S5), selama 5 menit (S6), HgCl2 0,2 g/ml selama 1 menit (S7), selama 3 menit (S8), selama 5 menit (S9), HgCl2 0,3 g/ml selama 1 menit (S10), selama 3 menit (S11), 5 menit (S12), direndam dalam dithane 2 g/l selama 1 jam (S13), selama 12 jam (S14),

selama 24 jam (S15). Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu, persentase kontaminasi, waktu pertama kontaminasi, sumber kontaminasi, dan identifikasi sumber kontaminan.

Pengamatan dan Analisis data

Variabel pengamatan meliputi persentase kontaminasi, waktu pertama kontaminasi, sumber kontaminasi, dan identifikasi sumber kontaminan. Data yang diperoleh dari hasil penelitian berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif seperti sumber kontaminasi dan identifikasi kontaminasi. Data kuantitatif meliputi persentase kontaminasi dan waktu pertama kontaminasi, dianalisis secara statistik menggunakan aplikasi SPPS versi 25. Data dianalisis menggunakan analisis variansi (ANOVA), apabila terdapat perbedaan yang nyata maka akan dilanjutkan dengan DMRT pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengamatan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa masing-masing metode sterilisasi menunjukkan hasil yang berbeda terhadap penekanan tingkat kontaminasi yang terjadi pada eksplan. Ketiga metode yang diujikan menunjukkan hasil untuk sterilan berupa larutan kaporit perlakuan (CaClO2) dengan konsentrasi 6% yang terbagi atas 3 lama perendaman, yaitu dengan waktu 10 dan 20 menit serta menit, 15 menit, dikombinasikan dengan larutan alkohol 70% selama 2 menit. Penggunaan metode ini tingkat kontaminasi masih 100% dengan sumber kontaminan yang berasal dari jamur, yang ditandai dengan adanya hifa atau benang miselium.

Metode sterilisasi eksplan daun kencur menggunakan bahan sterilan berupa larutan HgCl2 (Mercuri) dengan konsentrasi 0,1 g/ml; 0,2 g/ml; dan 0,3 g/ml yang dikombinasikan dengan lama perendaman 1 menit, 3 menit, dan 5 menit. Penggunaan metode ini menunjukkan hasil tingkat pesentase kontaminasi masih tinggi berkisar antara 66,66% sampai 100%, dengan sumber kontaminan yang berasal dari jamur yang ditandai dengan adanya hifa atau benang miselium dan bakteri yang ditandai dengan bercak-bercak lendir pada permukaan media.

Metode dengan menggunakan larutan Dithane dengan konsentrasi 2 g/l dengan lama perendaman masing-masing selama 1 jam, 12 jam, dan 24 jam serta dikombinasikan dengan alkohol 70% selama 2 menit. Penggunaan metode ini didapatkan hasil yang lebih baik jika dibandingkan dengan metode I dan II, karena mampu menekan persentase kontaminasi hingga 0% atau tidak ada kontaminasi baik itu jamur maupun bakteri. Efektifitas penggunaan metode sterilisasi dalam penelitian yang dilaksanakan disajikan dalam tabel 1.

Persentase Kontaminasi

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam pada Tabel 1 untuk perlakuan S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S9, S10, S11, dan S12, dengan jenis sterilan kaporit dan HgCl2 tidak berbeda nyata, sedangkan perlakuan S14 dan S15 tidak mengalami kontaminasi. Pada perlakuan S13 dengan jenis sterilan Dithane berbeda nyata terhadap persentase kontaminasi. **Tingkat** kontaminasi pada perlakuan yaitu sebesar 66,66% - 100,00% hal tersebut diduga karena lama perendaman yang relatif singkat dan tingkat konsentrasi jenis sterilan kaporit dan HgCl2 yang rendah sehingga sterilan kurang meresap dan dapat mengendalikan kontaminasi eksplan daun. Sejalan hasil penelitian Farooq et al., (2002) Senyawa kaporit yang diberikan dalam konsentrasi rendah dan lama perendaman singkat tidak terlalu efektif dalam mengendalikan kontaminasi pada eksplan. Peran kaporit terhadap penekanan tingkat kontaminan yaitu dengan cara melepaskan ion klorin membunuh yang mampu mikroorganisme dengan cara mengoksidasi sel membran sehingga akan merusak se1 mikroorganisme tersebut (Estrela, 2002).

Penggunaan HgCl₂ dalam sterilisasi eksplan sering dilakukan karena merupakan jenis sterilan yang mengandung ion merkuri yang dapat menyebabkan toksik karena terjadi proses presipitasi protein yang dapat menghambat aktifitas enzim dan bersifat sangat korosif. Pengaruh HgCl₂ terhadap penekanan kontaminan, yaitu dengan melepaskan ion Hg2+ yang dapat menyebabkan pengaruh toksik pada proses presipitasi protein sehingga aktivitas enzim yang menghambat bertindak sebagai bahan yang bersifat korosif (Alfian, 2006). Sedangkan Penelitian dari Priadi (2008) menyatakan penggunaan HgCl₂ konsentrasi rendah dengan dan perendaman singkat belum mampu menekan persentase kontaminasi pada tunas ubi kayu, ditunjukkan dengan persentase kontaminasi pada genotip Iding mencapai 30-70% dan pada genotip Gebang mencapai 20-60%.

Pada perlakuan S13, dengan jenis sterilan Dithane berbeda nyata terhadap persentase kontaminasi, ditunjukkan dengan persentase kontaminasi yang mampu menekan dibawah 50% yaitu 44,44%. Sejalan dengan penelitian sebelumnya menunjukkan yang bahwa perendaman menggunakan larutan Dithane selama 24 jam dilanjutkan dengan perendaman bakterisida, dan perendaman pada alkohol 70% selama 1 menit mampu dengan optimal mengendalian kontaminasi pada eksplan daun burahol (Habibah et al., 2013). Senyawa Dithane merupakan fungisida yang sering digunakan pada sterilisasi teknik kultur in vitro, karena terdapat senyawa mankozeb dalam Dithane yang dapat mencegah infeksi jamur dengan menghambat perkecambahan spora yang menempel dipermukaan tanaman (Djojosumarto, 2004).

Penyebab kontaminasi dapat bersumber dari media maupun eksplan yang kurang sempurna dalam sterilisasi sehingga tumbuh bakteri atau jamur pada eksplan maupun media kultur. Kontaminasi pada media dan eksplan juga dapat terjadi karena adanya jamur ataupun bakteri yang tidak mati saat sterilisasi media maupun yang masuk dalam media saat proses penanaman eksplan atau saat pemeliharaan.

33

Tabel 1. Pengaruh Metode Sterilisasi pada Eksplan Daun Tanaman Kencur terhadap Kontaminasi Eksplan.

Perlakuan	Persentase kontaminasi (%)	Waktu pertama kontaminasi (hst)	Identifikasi kontaminan	
S1	100,00d	4,55c	Macrophomoina sp.	
S2	100,00d	4,66c	Aspergillus sp.	
S3	100,00d	4,55c	Aspergillus sp.	
S4	100,00d	4,44c	Aspergillus sp.	
S5	100,00d	4,44c	Aspergillus sp.	
S6	88,88cd	3,99bc	Aspergillus sp.	
S7	100,00d	4,55c	Aspergillus sp.	
S8	66,66bc	3,10bc	Aspergillus sp.	
S9	88,88cd	3,99bc	Aspergillus sp. dan Pseudomonas sp.	
S10	100,00d	4,44c	Cladosporium sp.	
S11	88,88cd	4,44c	Aspergillus sp.	
S12	77,77cd	3,88bc	Cladosporium sp.	
S13	44,44b	2,44b	Cladosporium sp.	
S14	0,00a	0,00a	-	
S15	0,00a	0,00a	-	

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut DMRT. S1 = kaporit 6% selama 10 menit; S2 = kaporit 6% selama 15 menit; S3 = kaporit 6% selama 20 menit; S4 = HgCl2 0,1 g/ml selama 1 menit; S5 = HgCl2 0,1 g/ml selama 3 menit; S6 = HgCl2 0,1 g/ml selama 5 menit; S7 = HgCl2 0,2 g/ml selama 1 menit; S8 = HgCl2 0,2 g/ml selama 3 menit; S9 = HgCl2 0,2 g/ml selama 5 menit; S10 = HgCl2 0,3 g/ml selama 1 menit; S11 = HgCl2 0,3 g/ml selama 3 menit; S12 = HgCl2 0,3 g/ml selama 5 menit; S13 = dithane 2 g/l g/ml selama 1 jam; S14 = dithane 2 g/l g/ml selama 12 jam; S15 = dithane 2 g/l g/ml selama 24 jam.

Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri awalnya ditandai dengan pembentukan selaput bening yang membayang pada media dan berubah menjadi putih kekuningan. Jamur yang muncul awalnya berupa kumpulan spora berwarna putih maupun coklat pada media atau eksplan yang kemudian menyebar disekeliling media dan menutupi seluruh permukaan eksplan, hingga akhirnya eksplan tersebut mati (Hidayat, 2005).

Waktu Pertama Kontaminasi

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam padan Tabel 1 untuk semua perlakuan tidak berbeda nyata. Rata-rata waktu pertama kontaminasi muncul yaitu 2,44 – 4,66 hst, sedangkan pada perlakuan S14 dan S15 tidak mengalami kontaminasi. Perbedaaan waktu pertama terjadi kontaminasi diduga terkait dengan ienis kontaminasi eksternal. Penelitian dari Pancaningtyas dan Cahya (2006) menyatakan bahwa kontaminasi eksternal umumnya muncul setelah beberapa hari hingga 1 bulan setelah tanam. Penyebab kontaminasi pada teknik kultur jaringan tanaman dapat berasal dari eksplan, organisme kecil yang masuk ke dalam media, botol kultur atau alat-alat tanam yang kurang steril, lingkungan kerja dan ruang kultur yang kotor serta kecerobohan dalam pelaksanaan (Gunawan, 1992).

Sumber Kontaminasi

Pengamatan terhadap sumber kontaminasi pada penelitian ini menunjukkan bahwa sumber kontaminasi disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat kontaminan yang bersumber dari jamur menyerang beberapa perlakuan yang diteliti dengan hasil yang beragam untuk sumber kontaminan yang menyerang.

Kontaminan berupa jamur pada eksplan daun diduga karena daun mengalami kontak langsung dengan udara banyak yang mengandung spora jamur. Mendominasinya cendawan yang hidup dalam botol kultur mengakibatkan eksplan yang ditanam tidak memiliki ruang untuk tumbuh yang cukup sehingga menghambat pertumbuhannya dan akhirnya berakhir pada kematian ekplan itu sendiri. Jamur atau cendawan pada umumnya berbentuk seperti benang halus yang tidak bisa dengan mata telanjang. dilihat Namun. kumpulan dari benang halus ini yang disebut miselium bisa dilihat dengan jelas. Jamur memiliki warna miselium yang bermacammacam, yaitu berwarna putih, coklat, hitam, merah dan lain sebagainya (Wudianto, 2002). Kontaminan pada penelitian ini tidak hanya bersumber dari jamur tetapi juga bakteri. Kontaminasi yang sering dijumpai pada kultur in vitro adalah Agrobacterium, Bacillus, Corynebacterium, Enterobacter, Lactobacillus, Pseudomonas. Staphylococcus, dan Xanthomonas (Wolf, 2007). Tabel 1 menunjukkan perlakuan S9 (HgCl2 g/ml selama 5 menit) mengalami kontaminasi bakteri. Sumber kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri menunjukkan ciri-ciri terbentuknya lapisan lendir berwarna putih dan lendir berwarna putih kecoklatan di bagian permukaan media yang terkontaminasi. Selain itu, faktor lain yang mendukung terjadinya kontaminasi seperti bahan sterilan yang kurang meresap pada eksplan sehingga masih terdapat mikroorganisme penyebab kontaminasi dan faktor lingkungan kurang yang steril (Tulainy, 2016).

Identifikasi Kontaminasi

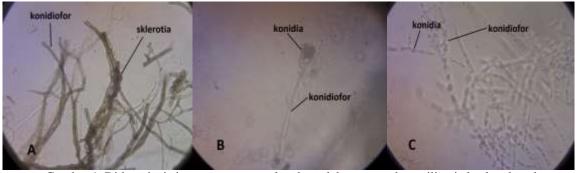
Karakteristik mikromorfologis jenis jamur pada Tabel 2 untuk gambar A, yaitu memiliki konidiofor bersekat, bercabang, berwarna abuabu kehitaman, memiliki bagian berbentuk lonjong, berwarna hitam (Sklerotia) dan tidak ada konidia, diduga jenis jamur ini adalah jamur *Macrophomoina* sp. Menurut Watanabe (2002) pada jamur jenis *Macrophomoina* sp. memiliki karakteristik mikromorfologis memiliki hifa yang bersekat, konidiafor hialin, memiliki sklerotia dengan bentuk bulat lonjong dan berwarna hitam, selalu terbentuk dalam satu gerombolan dan jarang atau tidak terdapat pycnidia.

Karakteristik mikromorfologis jenis jamur pada Tabel 2 untuk gambar B, yaitu memiliki konidiofor berbentuk tegak lurus sederhana tidak bercabang dan tidak bersekat, diujung konidiofor terdapat konidia berbentuk bulat berwarna abu-abu kehitaman, diduga jenis jamur ini adalah jamur *Aspergillus* sp. Menurut Samson *et al.* (1988) pada gambaran jamur *Aspergillus* sp. terdiri atas kepala konidia, konidia, fialid, vesikel dan konidiofor. Kepala konidia adalah struktur yang terletak di bagian terminal konidiofor, berbentuk bulat (globose) atau semi bulat (subglobose) tersusun atas vesikel, metula (jika ada), fialid dan konidia. Vesikel merupakan pembesaran konidiofor

pada bagian apeksnya membentuk suatu struktur berbentuk globose, hemisferis, elips atau clavate. Konidiofor merupakan suatu struktur tegak lurus yang muncul dari sel kaki dan pada ujungnya menghasilkan kepala konidia. Sebagian besar dari spesies *Aspergillus* sp. memiliki konidiofor tidak bercabang yang masing-masing menghasilkan kepala konidia tunggal (Samson *et al.* 1988).

Tabel 2. Karakteristik mikromorfologis jenis jamur yang mengontaminasi eksplan daun tanaman kencur.

No.	Perlakuan	Bentuk konidium	Diduga Jenis jamur
1	S1	konidiofor bersekat, bercabang dan berwarna abu-abu kehitaman; memiliki bagian berbentuk lonjong dan berwarna hitam (Sklerotia); tidak ada konidia.	Macrophomoina sp.
2	S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9 dan S11	konidiofor berbentuk tegak lurus sederhana tidak bercabang dan tidak bersekat, diujung konidiofor terdapat konidia berbentuk bulat berwarna abu- abu kehitaman.	Aspergillus sp.
3	S10, S12, dan S13	konidiofor becabang, tidak bersekat dan berwarna transparan; konidia terdapat di bagian konidiofor menempel seperti rangkaian.	Cladosporium sp.



Gambar 1. Diduga jenis jamur yang muncul pada perlakuan metode sterilisasi eksplan daun kencur A. *Macrophomoina* sp. pada perlakuan kaporit 6% selama 10 menit; B. *Aspergillus* sp. pada perlakuan HgCl2 0,1 selama 1 menit; C. *Cladosporium* sp. pada perlakuan HgCl2 0,3 selama 1 menit, (dengan perbesaran 10x100).

Karakteristik mikromorfologis jenis jamur pada Tabel 2 untuk gambar C, yaitu memiliki konidiofor becabang, tidak bersekat, berwarna konidia terdapat transparan, bagian konidiofor menempel seperti rangkaian. ini Diduga jenis iamur adalah iamur Cladosporium sp. Menurut Crous et al. (2005) pada jamur *Cladosporium* sp. memiliki konidiofor yang berpigmen transparan bercabang serta pada konidia menempel seperti di dalam rangkaian konidiofor.

Morfologi koloni bakteri yang mengkontaminasi eksplan dalam penelitian ini tersaji pada tabel 3

Tabel 3. Morfologi koloni bakteri yang mengontaminasi eksplan daun tanaman kencur.

perlakuan	Bentuk atas	Bentuk pinggir	Bentuk permukaan	Warna koloni
S9	Bulat	Bergelombang	Datar	Putih susu

Berdasarkan Tabel 3, morfologi koloni dari bakteri yang mengontaminasi pada perlakuan S9 memiliki penampakan bentuk atas bulat dengan bentuk pinggiran bergelombang serta bentuk permukaan datar dan warna koloni putih. Bentuk koloni dari suatu bakteri dipengaruhi oleh umur dan syarat pertumbuhan tertentu (Hidayat *et al.*, 2006). Variasi bentuk bakteri yang terjadi juga dipengaruhi oleh lingkungan (faktor-faktor biotik dan abiotik), pH, faktor makanan atau medium tumbuh dan

suhu minimum, optimum, dan maksimum (Ilyas, 2001). Koloni bakteri yang berwarna coklat, kuning, putih, putih susu, dan, kuning muda. Perbedaan warna pada setiap koloni disebabkan oleh adanya pigmen yang dihasilkan oleh bakteri. Menurut Savitri (2006) menyatakan bahwa pigmen karotenoid, antosianin, melanin, tripirilmetin, dan penazin, masing-masing dari pigmen tersebut akan memberikan warna yang berbeda-beda.

Tabel 4. Hasil pewarnaan gram dan bentuk sel bakteri yang mengontaminasi eksplan daun tanaman kencur.

Perlakuan	Bentuk sel	Pewarnaan gram
S9	Coccus (bulat)	Negatif



Gambar 3. Bakteri spesies *Pseudomonas* sp. yang tumbuh pada perlakuan S9 (HgCl2 0,2 g/ml selama 5 menit) dengan perbesaran 10x100.

Pada Tabel 4. hasil dari pewarnaan gram yaitu negatif dengan ciri-ciri berwarna merah atau merah muda. Bakteri gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi, seperti lemak dalam persentase lebih tinggi daripada yang dikandung bakteri gram positif, selain itu peptidoglikan bakteri gram negatif juga lebih tipis daripada peptidoglikan bakteri gram positif (Hadioetomo *et al.*, 2005)

Berdasarkan dari hasil pada Tabel 3 dan Tabel 4 diduga bakteri tersebut adalah jenis bakteri *Pseudomonas* sp. Menurut Holt *et al.* (1994) bahwa pada bakteri *Pseudomonas* sp. bersifat gram negatif, bentuk sel coccus (bulat), motil, tidak berspora, warna koloni putih susu, bersifat aerob, katalase positif, oksidase positif, tidak mampu memfermentasi tetapi dapat mengoksidasi glukosa/karbohidrat lain, tidak mempunyai selubung (sheat) dan mempunyai flagel monotrika (flagel tunggal pada kutub) sehingga selalu bergerak.

Kesimpulan

Penggunaan sterilan Dithane 2 g/l air dengan lama perendaman 1 jam pada perlakuan S13 berbeda nyata dan berhasil menurunkan kontaminasi 44,44%, antara sedangakan penggunaan sterilan kaporit dan HgCl2 tidak berbeda nyata. Berdasarkan identifikasi kontaminasi terdapat kontaminan berupa jamur dan bakteri, ienis iamur lain antara Macrophomoina sp., Aspergillus sp., dan Cladosporium sp. sedangkan jenis bakteri antara lain *Pseudomonas* sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Adji, Dhirgo. 2007. Perbandingan Efektivitas Sterilisasi Alkohol 70%, Inframerah, Otoklaf, dan Ozon terhadap Pertumbuhan Bakteri Bacillus subtilis. *Jurnal Sain Veteriner*. Vol 25, No 1. Hlm. 17-24.
- Alfian Z. 2006. Merkuri: Antara Manfaat Dan Efek Penggunaannya Bagi Kesehatan Manusia Dan Lingkungan. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara, Medan
- Crous PW, Schroers H-J, Groenewald JZ, Braun U, Schubert K. 2005. Metulocladosporiella gen. nov. for the casual organism of Cladosporium speckle disease of banana. *Mycological Research* 110:256-275. DOI:10.1016
- Darmono, D.W. 2003. Menghasilkan Anggrek Silangan. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Djojosumarto, P. 2004. *Teknik Aplikasi Pestisida Pertanian*. Kanisius, Yogyakarta. 211 p.
- Estrela, C., Barbin E.L., Spano J.C., Marchesan, M.A., 2002. Mechanism of action of sodium Hypochlorite. *BrazDentJ*. 13(2):113-117.
- Fauzan, Y.S.A, Supriyanto, Tajuddin T. 2017. Efektivitas Merkuri Klorida (HgCl₂) Pada Sterilisasi Tunas Samping Jati (Tectona Grandis) In Vitro. *J Bioteknol Biosains* Indones – Vol 4 No 2 Thn 2017
- Farooq SA, Farooq TT, Rao TV (2002) Micropropagation of Annona squamosa L. using nodal explants. *Pakistan Journal* of Biological Sciences 5(1): 43-46.
- Gunawan LW. 1987. Teknik Kultur Jaringan.

 Lembaga Sumberdaya Informasi IPB.

 Bogor: Laboratorium Kultur 34 an

 Tanaman Pusat Antar Ul.....tas

 Bioteknologi IPB
- Gunawan LW (1992) Teknik Kultur Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Habibah, NA, Sumadi, Ambar S (2013) Optimasi Sterilisasi Permukaan Daun dan

- Eliminasi Endofit pada Burahol. *Journal* of Biology & Biology Education Biosaintifika 5 (2): 95 99
- Hadioetomo, Katna S., Imas T., Tjitrosono S.S., Angka S.L. 2005. Dasar-Dasar Mikrobiologi 1. UI, Jakarta.
- Hidayat N. M.C. Padaga, Suharti S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Penerbit Andi, Yogyakarta.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, S. T. Wiliam. 1994.BergeysManualofDeterminative Bacteriology 9th ed. *Lippincott Wiliamand Wikins*. Philadelphia. 785 hal
- Ilyas, S. 2001. *Mikrobiologi Dasar Diklat Kompilasi* 28. Universitas Sumatra Utara Press, Medan
- Lestari E.G. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyakan Tanaman melalui Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 7 (1).
- Pancaningtyas, S. dan C. Ismayadi. 2001.
 Sterilisasi Ulang pada Perbanyakan
 Somatic Embryogenesis Kakao
 (Theobromo cacao L.) untuk
 PenyelamatanEmbrioTerkontaminasi.
 Pelita Perkebunan 27(1).
- Priadi D, Fitriani H, Sudarmonowati E. 2008. Pertumbuhan *in vitro* Tunas Ubi Kayu (*Manihot esculenta Crantz*) pada Berbagai Bahan Pemadat Alternatif Pengganti Agar. *Biodiversitas*. Vol. 9 No. 1 Hal. 9-12.
- Rahmat R. 2004. *Temu-Temuan Apotik Hidup Di Pekarangan*. Kanisius : Yogyakarta.
- Samson A.R dan Reenen Hoekstra ES van. 1988. Introduction to Food Borne Fungi. Centralbureau Voor

- Schimmelcultures. Baarn. Delpt.
- Sandra, E.2002. *Membuat Anggrek Rajin Berbunga*. Jakarta: Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Savitri, S.D.N. 2006. Isolasi dan Karakteristik Bakteri Halotoleran Pada Peda Ikan Kembung (*Rastrellinger sp.*). *Skripsi*. IPB, Bogor.
- Shofiyani, A., O.D. Hajoeningtijas. 2010. Pengaruh Sterilan Dan Waktu Perendaman Pada Eksplan Daun Kencur (*Kaemferia galanga L*) Untuk Meningkatkan Keberhasilan Kultur Kalus. *AGRITECH*, Vol. XII No. 1 Juni 2010: 11 – 29
- Suratman, Pitoyo, A. Mulyani, S. 2013. Keefektifan Penggunaan Bahan Sterilisasi Dalam pengendalian Kontaminasi Eksplan Pada Perbanyakan tanaman Sirsak (Annona Muricata L.) Secara In Vitro. *Jurnal Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta*
- Syamsuhidayat, S.S. dan Johny, R.H,. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*(1).Jakarta: Bakti Husada. hal 596-7
- Tulainy, I. 2016. pengaruh auksin (2,4 d) dan air kelapa terhadap induksi kalus pada rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*). *Skripsi*. UMP.
- Watanabe, T, 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. CRC Press, New York Wolf, J.B. 2007. Tissue Culture Methods. Departement of Biological Sciences, University of Maryland. Baltimore Country 1000 Hilltop Circle Baltimore Md 21250.
- Wudianto, R. 2002. *Petunjuk Penggunan Pestisida*. Jakarta: Penebar Swadaya.