

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Optimasi Sterilisasi

Optimasi sterilisasi merupakan upaya untuk mencegah terjadinya kontaminasi dalam kultur *in vitro*. Adanya kontaminasi dapat menyebabkan pertumbuhan eksplan menjadi terhambat bahkan menyebabkan eksplan mati. Kontaminasi akan bersaing dengan eksplan untuk mendapatkan nutrisi, sehingga eksplan akan kalah dengan adanya kontam. Karena itu perlu dilakukan optimasi sterilisasi eksplan yang bertujuan untuk mendapatkan metode sterilisasi yang cocok untuk digunakan dalam sterilisasi eksplan pada tahap induksi kalus *aglaonema*. Pada tahap ini persentase yang diamati meliputi persentase hidup, kontam dan pencoklatan.

Tabel 1. Persentase eksplan hidup, eksplan terkontaminasi dan eksplan pencoklatan *Aglaonema* sp pada optimasi sterilisasi selama 2 minggu

Perlakuan	Pencoklatan (%)	Hidup (%)	Kontaminasi (%)
NaClO 10% 10' + NaClO 5% 5'	0	100,00 a	0,00 a
NaClO 10% 15' + NaClO 5% 5'	0	55,56 a	44,44 a
NaClO 20% 10' + NaClO 5% 5'	0	88,89 a	11,11 a
NaClO 20% 15' + NaClO 5% 5'	0	100,00 a	0,00 a

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata antara perlakuan berdasarkan uji F pada taraf kesalahan 5%

Eksplan dinyatakan hidup apabila eksplan tersebut tidak mengalami pencoklatan dan terkontaminasi oleh bakteri maupun jamur, pada optimasi sterilisasi tidak terjadi *browning* atau pencoklatan (0 %). Ada beberapa faktor yang menyebabkan eksplan tidak mengalami pencoklatan atau *browning*, salah satunya yaitu, bahan tanam atau eksplan yang diambil dalam penelitian ini adalah

sel-selnya aktif membelah diri (Meristem) dan sedikit mengeluarkan senyawa fenol sehingga eksplan tidak mengalami *browning*. Hal lain yang menyebabkan eksplan tidak *browning* yaitu eksplan dibilas pada air mengalir, pembilasan pada air mengalir dapat membantu mengeluarkan senyawa fenol yang ada pada eksplan.

Pada optimasi sterilisasi ini perlakuan NaClO 10% 10' + NaClO 5% 5' dan NaClO 20% 15'+ NaClO 5% 5' menghasilkan persentase eksplan hidup tertinggi yaitu sebesar 100%. Hal ini dikarenakan senyawa NaClO pada perlakuan tersebut mampu menghambat metabolisme sel mikroba. Menurut Pelczar dan Chan (1988) NaClO akan terionisasi menjadi Cl^- yang akan mengoksidasi protein sel mikrobia, sehingga sel mikrobia tidak dapat melangsungkan metabolismenya kemudian mati. Pada perlakuan NaClO 20% 10' + NaClO 5% 5' menghasilkan persentase eksplan hidup sebesar 88,89% dan persentase kontaminasinya sebesar 11,11%. Persentase terendah terdapat pada perlakuan NaClO 10% 15' + NaClO 5% 5' yang menghasilkan eksplan hidup sebesar 55,56% dengan persentase kontaminasinya sebesar 44,44%. Hal ini disebabkan NaClO yang bereaksi dengan air tidak membunuh mikrobia secara maksimal, sehingga ada beberapa eksplan yang terkontaminasi.

Kontaminasi sebagian besar disebabkan oleh bakteri. Bakteri tersebut pada awalnya muncul di tepi eksplan yang membentuk lingkaran dan sedikit berlendir, kemudian bakteri berkembang dan menutupi seluruh bagian eksplan dan medium

10' + NaClO 5% 5' terjadi kontaminasi pada hari ke-4 setelah inokulasi dan setelah itu tidak mengalami kontaminasi sampai berakhir pengamatan. Pada perlakuan NaClO 10% 10' + NaClO 5% 5' dan perlakuan NaClO 20% 15' + NaClO 5% 5' tidak terjadi kontaminasi dan pencoklatan, namun pada perlakuan NaClO 10% selama 15 menit + 5% selama 5 menit eksplan hidup mengalami penurunan pada hari ke-3 namun cenderung stabil sampai kepada hari ke-14 eksplan mengalami penurunan drastis. Sedangkan pada perlakuan NaClO 20% selama 10 menit + 5% selama 5 menit mengalami penurunan pada hari ke-4 dan hidup stabil sampai pada hari terakhir. Pada perlakuan NaClO 20% selama 15 menit + 5% selama 5 menit mengalami hal yang serupa dengan perlakuan NaClO 10% selama 10 menit + 5% selama 5 menit tidak mengalami penurunan dari awal penanaman sampai pada akhir pengamatan. Hal ini karena konsentrasi pada sterilisasi sangat tepat dan waktu yang maksimal dapat mencegah terjadi kontaminasi. Sehingga untuk melanjutkan penelitian ke tahap induksi kalus perlakuan yang digunakan yaitu NaClO 20% selama 15 menit + 5% selama 5 menit.

Pengamatan terhadap warna eksplan dilakukan satu minggu sekali dengan menggunakan *Munsell Plant Tissue Colour Chart*. Pengamatan terhadap warna eksplan dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Warna eksplan minggu ke-1 dan minggu ke-2 pada optimasi sterilisasi

Perlakuan	Minggu ke-1	Warna	Minggu ke-2	Warna
NaOCI 10% 10'+5% 5'	8/6 5 Y	Kuning kehijauan	8/10 2,5 Y	Kuning kemerahan
NaOCI 10% 15'+5% 5'	8/6 5 Y	Kuning kehijauan	8/10 2,5 Y	Kuning kemerahan
NaOCI 20% 10'+5% 5'	8/6 5 Y	Kuning kehijauan	8/10 2,5 Y	Kuning kemerahan
NaOCI 20% 15'+5% 5'	8/6 5 Y	Kuning kehijauan	8/10 2,5 Y	Kuning kemerahan

Berdasarkan pengamatan diketahui pada minggu pertama eksplan berwarna kuning kehijauan kemudian pada minggu kedua eksplan mengalami perubahan menjadi kuning kemerahan. Hal ini disebabkan tidak adanya Zat pengatur tumbuh pada medium Sukrosa Agar sehingga menyebabkan warna eksplan tidak stabil dan berubah menjadi kuning dan lama kelamaan menjadi kuning kemerahan. Kestabilan warna hijau pada eksplan dipengaruhi oleh hara dan zat pengatur tumbuh dalam media yang jumlahnya mencukupi, sehingga mampu menstimulasi terjadinya sintesis klorofil dalam sel yang mengakibatkan warna eksplan tetap hijau. Seperti yang dikatakan Hendaryono dan Wijayani (1994), bahwa zat pengatur tumbuh sangat diperlukan sebagai komponen medium bagi pertumbuhan, tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dalam medium mengakibatkan pertumbuhan eksplan terhambat.

B. Tahap Induksi Kalus Batang *Aglaonema* sp

Tahap ini merupakan tahap untuk menginduksi kalus batang *Aglaonema* sp dengan penambahan ZPT berupa 2,4-D dan kinetin dalam medium MS. Kalus merupakan kumpulan sel-sel yang belum terdeferensi atau belum membentuk organ, biasanya muncul akibat adanya pembelahan atau pelukaan dari jaringan tanaman. Eksplan disterilisasi berdasar metode sterilisasi terbaik pada saat optimasi sterilisasi yaitu NaClO 20% selama 15 menit + 5% selama 5 menit. Pada

Tabel 4. Persentase eksplan kontaminasi, eksplan hidup, persentase eksplan pencoklatan dan persentase eksplan berkalus pada Induksi Kalus selama 8 minggu

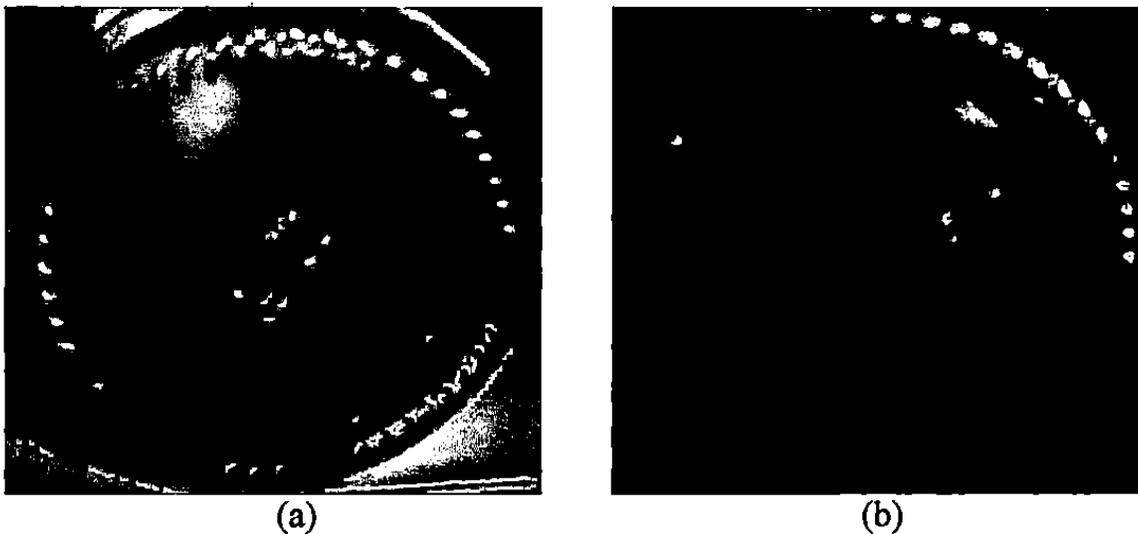
Perlakuan	Pencoklatan (%)	Kontaminasi (%)	Hidup (%)	Kalus (%)
2,4-D 1ppm + kinetin 0,5ppm	44,45 a	55,55 a	0	0
2,4-D 1ppm + kinetin 1ppm	44,44 a	55,56 a	0	0
2,4-D 2ppm + kinetin 0,5ppm	33,33 a	66,67 a	0	0
2,4-D 2ppm + kinetin 1ppm	44,45 a	55,55 a	0	0
2,4-D 3ppm + kinetin 0,5ppm	55,56 a	44,44 a	0	0
2,4-D 3ppm + kinetin 1ppm	22,22 a	77,78 a	0	0

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata antara perlakuan berdasarkan uji F pada taraf kesalahan 5%

Browning atau pencoklatan biasanya terjadi karena adanya tanda perusakan sel eksplan, yang disebabkan oleh reaksi enzim fenolase, biasanya eksplan mengandung enzim fenolase yang dapat berubah menjadi warna coklat jika bersinggungan dengan udara bebas, selain itu juga dapat diakibatkan oleh sterilisasi yang berlebihan, seperti diketahui bahwa sterilisasi dilakukan guna menghilangkan bakteri dan jamur pada eksplan, namun jika proses ini dilakukan berlebihan justru akan merusak sel dan mengakibatkan eksplan berubah menjadi coklat seperti yang dikemukakan Prasetyo (2011).

Kontaminasi yang terjadi pada tahap induksi kalus ini sebagian besar disebabkan oleh bakteri. Hal ini disebabkan bahan tanam yang digunakan berasal dari lapangan dimana banyak mengandung kotoran dan berbagai kontaminan yang hidup di permukaan. Bahan tanam diambil dari tanaman induk berupa batang yang mana lebih dekat dengan tanah sehingga besar kemungkinan terdapat sumber kontaminan. Selain itu dapat disebabkan oleh bakteri yang terdapat di dalam jaringan tanaman (bakteri endogen) seperti yang dikemukakan Pierik

jaringan tanaman. Sterilisasi yang digunakan hanya mampu membunuh bakteri yang berada di permukaan namun belum membunuh bakteri yang berada di dalam jaringan tanaman sehingga menyebabkan eksplan terkontaminasi bakteri dan akhirnya mati. Hal ini terlihat dengan hasil munculnya bakteri sampai pengamatan minggu ke 8 (gambar 2).



Gambar 2. Eksplan pencoklatan dan eksplan terkontaminasi. (a) eksplan coklat
(b) eksplan terkontaminasi bakteri

Pada tahap induksi kalus, persentase eksplan hidup dan eksplan berkalus sebesar 0%. Hal ini diduga karena zat pengatur tumbuh yang digunakan belum sesuai dengan eksplan. Selain itu pada saat sterilisasi bagian luar eksplan dikupas hanya menyisakan bagian dalam saja, sehingga jaringan yang terdapat pada kulit luar hilang dan mengakibatkan tidak adanya proses penyerapan air dan mineral.

Pengamatan terhadap warna eksplan dilakukan satu minggu sekali dengan menggunakan *Munsell Plant Tissue Colour Chart*. Berdasarkan pengamatan pada minggu pertama eksplan berwarna kuning kehijauan (8/6 5 Y) kemudian pada minggu berikutnya eksplan mengalami perubahan warna menjadi kuning keemasan (8/10 2.5 Y) dan pada minggu ke 8 menjadi kecoklatan (7/10

7,5 YR) ██████ pada akhir pengamatan. Hal ini bisa terjadi karena eksplan terlalu lama di dalam botol kultur tanpa dipindahkan ke medium baru, sehingga nutrisi yang tersedia mulai berkurang. Akibatnya tingkat proliferasi sel juga berkurang sehingga menyebabkan clonal bank menjadi tidak