

Laporan Pratikum Dasar-Dasar Bioteknologi Tanaman

Topik 3

STERILISASI ORGAN DAN JARINGAN TANAMAN



Oleh :

Arya Widura Ritonga

(A24051682)

Agronomi dan Hortikultura

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Salah satu faktor yang paling menentukan keberhasilan dalam kultur jaringan adalah penyediaan dan pengaturan suatu kondisi yang aseptik. Kondisi tersebut meliputi lingkungan, peralatan, media, ruang kerja, dan sel atau jaringan tanaman yang akan dikulturkan. Sehingga dapat menghasilkan tanaman yang bebas patogen.

Kondisi organ dan jaringan tanaman yang aseptik dapat dicapai dengan melakukan sterilisasi. Sterilisasi dapat dilakukan dengan memberikan perlakuan terhadap organ dan jaringan tersebut sebelum dikulturkan. Ada empat pendekatan atau cara yang biasa digunakan dalam sterilisasi, yaitu panas, kimia, irradiasi, dan filtrasi. Untuk eksplan, sterilisasi biasanya lebih sesuai menggunakan cara pemanasan (mekanik) atau kimia, atau kombinasi dari keduanya. Sterilisasi dengan cara pemanasan biasanya dilakukan pada jaringan tanaman yang keras atau berdaging tebal. Sedangkan cara kimia dipakai untuk eksplan yang lunak atau jaringan yang masih muda (meristem). Perlakuan yang akan diberikan dalam percobaan ini adalah dengan menggunakan bahan kimia yang bersifat toksik sehingga mikroorganisme yang terdapat pada organ dan jaringan akan mati. Namun, bahan-bahan kimia tersebut juga bersifat toksik bagi sel tanaman. Sehingga diperlukan bahan kimia yang sesuai jenis dan konsentrasinya, sehingga hanya mikroorganisme pengganggu saja yang mati. Berikut adalah beberapa bahan kimia yang dapat dipakai dalam sterilisasi:

Tabel Bahan-Bahan Kimia yang Dapat Dipakai dalam Sterilisasi

Bahan Kimia	Konsentrasi (%)
Sodium hypochlorite	0.5-5
Commercial bleach	10-20
Calcium hypochlorite	9-10
Hydrogen Peroxide	3-12
Benzalkonium chloride	0.01-0.1
Ethanol	70-95

Selain bahan-bahan kimia tersebut, dapat juga digunakan beberapa fungisida dan bakterisida seperti Dithane M-45, Benlate, dan Agept. Twee 20 dan 80 merupakan salah satu bahan yang ditambahkan ke dalam sterilan yang berfungsi untuk menurunkan tegangan permukaan larutan sehingga kontak dengan tanaman menjadi lebih baik.

Kegagalan dalam sterilisasi organ dan jaringan tanaman akan menyebabkan kontaminasi. Kontaminasi tersebut dapat diakibatkan oleh beberapa organisme, seperti bakteri (umumnya ditunjukkan dengan adanya warna putih, coklat, pink, atau kuning pada media), fungi, yeast, virus, dan serangga. Kondisi seperti ini sangat tidak dikehendaki.

Tanaman yang digunakan dalam percobaan ini adalah binahong dan bawang putih. Binahong sangat berkhasiat dalam menyembuhkan beberapa penyakit seperti kanker. Bawang putih merupakan salah satu komoditi hortikultura yang bernilai tinggi. Tanaman ini umumnya diperbanyak secara vegetatif karena pada umumnya viabilitasnya rendah. Perbaikan dan peningkatan kualitas bibit bawang putih perlu dilakukan agar bisa mendapatkan bibit dalam jumlah besar yang seragam dan bebas penyakit. Kultur in-vitro merupakan salah satu teknologi perbanyakan yang sangat baik dipakai dalam perbanyakan bawang putih.

Tujuan

Tujuan percobaan ini adalah untuk berlatih melakukan sterilisasi bagian tanaman dari lapang yang akan digunakan sebagai eksplan.

BAHAN DAN METODE

Pratikum ini dilakukan pada hari Rabu, 3-24 Oktober 2007 di Lab Kultur Jaringan Tanaman Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor

Bahan-bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah:

A. Bahan tanaman

1. Umbi bawang putih
2. Daun dan batang Binahong (*Bassela rubra*). yang mengandung buku dengan tunas aksilar dari binahong

B. Bahan untuk sterilisasi tanaman

Benlate atau Dithane M-45, Agrept (bakterisida), Ditergen, alkohol 70%, chlorox (bahan aktifnya sodium hypochlorite 5.25%) 10% dan 30%, serta aquades steril.

C. Media tanam

Media yang digunakan untuk eksplan hasil sterilisasi ini adalah dengan media MS tanpa zat pengatur tumbuh (ZPT). Setelah satu minggu selanjutnya diseleksi eksplan yang steril untuk dipindahkan ke media MS11 untuk ditumbuhkan membentuk planlet.

D. Alat tanam

Alat tanam yang digunakan diantaranya adalah petridish, scalpel, pinset, gunting, lampu bunsen, dan handsprayer.

Metode yang digunakan dalam percobaan ini adalah:

- a. Mencuci umbi bawang putih yang sudah dikupas kulit, akar, batang, dan daun binahong dengan air, yang kemudian dilanjutkan dengan larutan chlorox.
- b. Membilasnya dengan aquades steril, selanjutnya direndam dalam larutan Dithane M-45 dan Agrept dengan konsentrasi masing-masing 5g/l selama 3 jam.

- c. Setelah 3 jam, buang larutan pestisidanya, kemudian bilas kembali bahan tanaman tadi dengan aquades steril, selanjutnya rendam dalam chlorox 30% selama 20 menit, kemudian bilas dengan aquades steril satu kali. Siung bawang putih dipotong menjadi dua bagian dan buang bagian luarnya. Tunas vegetatif yang masih mengandung basal plate akan dijadikan eksplan berukuran sekitar 0.5-1cm.
- d. Selanjutnya rendam kembali potongan tersebut dalam chlorox 10% selama 10 menit, kemudian bilas kembali dengan aquades steril satu kali.
- e. Potong bagian batang yang mengandung buku sepanjang 1cm daun dipotong berukuran 1cm²
- f. Tanam eksplan yang sudah siap ke media MS tanpa zat pengatur tumbuh. Setiap botol ditanam 4-5 eksplan untuk masing-masing jenis tanaman
- g. Setiap kultur diberi nama tanaman yang dikulturkan dan tanggal tanam kemudian disimpan dalam ruang kultur
- h. Setelah satu minggu, eksplan yang steril dipindahkan ke media MS11.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan sterilisasi yang kita lakukan dapat kita tentukan dengan melakukan pengamatan terhadap eksplan setelah 1 MST dan 2 MST. Berikut adalah tabel hasil pengamatan terhadap pertumbuhan bawang putih, daun binahong, dan batang binahong:

Tabel Pertumbuhan Bawang Putih yang Telah Disterilisasi

Ulangan	Jml Eksplan Steril		Jml eksplan yg tetap hijau&ada pertumbuhan		Jml eksplan yg membentuk kalus/tunas		Tunas per eksplan	
	1 MST	2 MST	1 MST	2 MST	1 MST	2 MST	1 MST	2 MST
1	11	0	11	0	21	0	1.9	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	5	5	5	5	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
Rata-rata	1.6	0.5	1.6	0.5	2.1	0	0.2	0
Standard Deviasi	3.7	1.6	3.7	1.6	6.6	0	0.6	0

Tabel Pertumbuhan Daun Binahong yang Telah Disterilisasi

Ulangan	Jml Eksplan Steril		Jml eksplan yg tetap hijau&ada pertumbuhan		Jml eksplan yg membentuk kalus/tunas		Tunas per eksplan	
	1 MST	2 MST	1 MST	2 MST	1 MST	2 MST	1 MST	2 MST
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	9	0	9	0	7	0	0.78	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	5	5	5	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	5	5	5	5	0	0	0	0
10	6	0	6	0	0	0	0	0
Rata-rata	2.5	1	2.5	1	0.7	0	0.08	0
Standard Deviasi	3.4	2.1	3.4	2.1	2.2	0	0.25	0

Tabel Pertumbuhan Batang Binahong yang Telah Disterilisasi

Ulangan	Jml Eksplan Steril		Jml eksplan yg tetap hijau&ada pertumbuhan		Jml eksplan yg membentuk kalus/tunas		Tunas per eksplan	
	1 MST	2 MST	1 MST	2 MST	1 MST	2 MST	1 MST	2 MST
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	5	5	5	5	0	5	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
Rata-rata	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0	0.1
Standard Deviasi	1.6	16	1.6	1.6	0	1.6	0	0.3

Tabel pertumbuhan eksplan yang telah disterilisasi di atas memperlihatkan bahwa jumlah rata-rata tunas atau kalus per eksplan yang terbentuk sangat sedikit.. Hal ini disebabkan banyak eksplan yang terkontaminasi. Sehingga eksplan harus dibuang atau diselamatkan. Kontaminasi yang terjadi sebagian besar disebabkan oleh bakteri yang ditandai dengan munculnya warna pink disekitar eksplan pada media kultur. Kontaminasi tersebut sebenarnya dapat dikurangi dampaknya dengan melakukan penyelamatan terhadap eksplan yang belum terkontam. Namun, karena sebagian besar media sudah mulai mengeluarkan cairan, hal ini menyebabkan hamper semua eksplan ikut menjadi terkontaminasi.

Kontaminasi yang terjadi diakibatkan tidak terjaganya kondisi yang aseptik pada saat sterilisasi, seperti banyak yang berbicara (mengeluarkan bakteri atau virus dari mulut), alat-alat yang digunakan jarang disemprot dengan alkohol, tidak melakukan sesuai dengan petunjuk, dan eksplan terlalu lama berada di luar. Hal-hal tersebut menyebabkan tidak sempurna sterilisasi yang dilakukan dan bahkan bertambah banyak.

Bawang putih menghasilkan jumlah rata-rata tunas per eksplan paling kecil dari pada daun dan batang binahong setelah minggu ke-dua walaupun pada 1MST pertumbuhannya baik. Hal ini disebabkan karena dalam kultur in-vitro bawang putih sering dijumpai Latent Contamination yaitu dimana umbi bawang putih mudah terserang penyakit tular tanah (Suil Borne Disease) seperti bakteri dan cendawan yang menyerang bagian dalam suing bawang putih (keller, 2002).

Tabel tersebut juga memperlihatkan bahwa terdapat eksplan yang tumbuh, namun tidak menghasilkan tunas atau kalus pada minggu ke dua. Hal ini karena tanaman tidak belum dapat menyerap hara yang yang terdapat dalam media dengan sempurna. Namun, kedepannya eksplan-eksplan tersebut akan menghasilkan tunas dan kalus.

KESIMPULAN

Tingkat keberhasilan sterilisasi dalam percobaan ini sangat rendah yang di akibatkan tidak terjaganya kondisi yang aseptik selama proses sterilisasi. Kontaminasi yang terjadi, sebagian besar disebabkan oleh bakteri yang menyebabkan timbulnya warna pink pada media di sekitar eksplan. Bawang putih menghasilkan jumlah tunas per eksplan paling sedikit karena adanya Latent Contamination.

SARAN

Dapat dicoba penggunaan tanaman yang lain. Pengamtan juga dilakukan terhadap bakteri dan cendawan yang mengkontaminasi.

DAFTAR PUSTAKA

COLEMAN, J. O. D., Evans, D.E., and Kearns, A. 2003. **Plant Cell Culture**.

New York: BIOS Scientific Publishers.

CONGER, B.V. 1980. **Cloning Agricultural Plants Via In vitro Techniques**.

CRC PRESS, Inc. Florida.

SURYOWINOTO, MOESO. 1996. **Pemuliaan Tanaman secara in vitro**.

Kanisius. Yogyakarta.

<http://www.indobiogen.or.id>