

PERLAKUAN STERILISASI DALAM INISIASI AREN



**Oleh
Edhi Sandra**



**DIVISI BIOPROSPEKSI DAN PEMANFAATAN LESTARI HIDUPAN LIAR
DEPARTEMEN KONSERVASI SUMBERDAYA HUTAN DAN EKOWISATA
FAKULTAS KEHUTANAN DAN LINGKUNGAN
IPB UNIVERSITY
2025**

Judul Artikel : PERLAKUAN STERILISASI DALAM INISIASI AREN

Penulis : Edhi Sandra

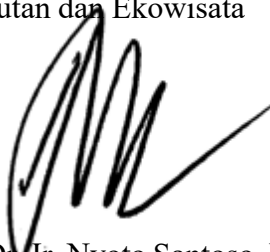
NIP : 196610191993031002

Bogor, 25 Juni 2025

Penulis,

Mengetahui,

Ketua Departemen Konservasi Sumberdaya
Hutan dan Ekowisata

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

(Dr. Ir. Nyoto Santoso, MS)

A handwritten signature in black ink, featuring a series of loops and a long horizontal stroke at the bottom.

(Ir. Edhi Sandra MSi)

I. PENDAHULUAN

Latar Belakang

Kultur jaringan merupakan salah satu metode perbanyakan tanaman secara in vitro yang sangat potensial diantaranya adalah untuk pengembangan komoditas kehutanan, termasuk pada tanaman aren (*Arenga pinnata*). Namun, salah satu tantangan utama dalam tahap awal kultur jaringan adalah masalah kontaminasi, terutama saat proses inisiasi, yaitu memasukkan bagian dari suatu tanaman (eksplan) dalam kondisi steril. Persentase keberhasilan inisiasi adalah 0% sampai 10% hal ini bukan disebabkan penanamnya tidak profesional melainkan hampir semua makhluk di dunia ini mengandung mikroba di dalam dirinya, apalagi tanaman yang asli alam liar (hutan tropika). Eksplan dari tanaman hutan seperti aren umumnya berasal dari lingkungan liar yang kaya akan mikroorganisme patogen maupun endofit. Hal ini menyebabkan tingkat kegagalan inisiasi menjadi tinggi apabila tidak diikuti dengan prosedur sterilisasi yang ketat dan efektif.

Proses inisiasi merupakan titik kritis dalam kultur jaringan karena keberhasilan tahapan ini sangat menentukan kelanjutan proses regenerasi tanaman. Kontaminasi yang terjadi pada tahap ini dapat menyebabkan eksplan membusuk, mengalami nekrosis, bahkan gagal tumbuh. Oleh karena itu, diperlukan strategi sterilisasi yang tepat dan efisien agar diperoleh eksplan yang benar-benar bersih dari mikroba, namun tetap mempertahankan viabilitas dan potensi tumbuh eksplan.

Tujuan

Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk memperoleh sistem sterilisasi yang efektif dan efisien dalam menghasilkan eksplan aren steril, yang dapat digunakan lebih lanjut dalam proses kultur jaringan untuk mendukung program perbanyakan dan pemuliaan tanaman aren.

II. METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juni 2025 di Laboratorium Kultur Jaringan, Divisi Bioprospeksi dan Pemanfaatan Hidupan Liar (Divisi BPHL), Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata, Fakultas Kehutanan dan Lingkungan, IPB University.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi benih aren (*Arenga pinnata*) dari daerah Banten, etanol 70%, larutan klorin (NaOCl), larutan HgCl₂ (jika digunakan), Tween-20, antibiotik (misalnya streptomisin atau rifampisin), serta media kultur dasar (Murashige and Skoog) yang telah dilengkapi dengan bahan tambahan seperti Benomyl, Streptomycin Powder (BSP), dan zat pengatur tumbuh (ZPT) sesuai kebutuhan.



Gambar 1 Bahan sterilisasi fungisida dan bakterisida

Alat yang digunakan meliputi laminar air flow, autoklaf, mikropipet, pinset dan pisau bedah steril, tabung kultur atau botol kultur, timbangan analitik, oven, serta mikroskop.

Langkah-Langkah Penelitian

1. Seleksi Benih Aren

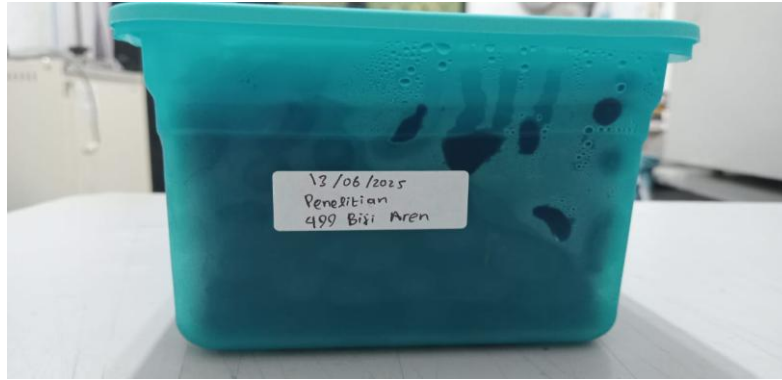
Benih aren yang digunakan diseleksi berdasarkan :

1. tingkat kebersihan fisik dan potensi pertumbuhan.
2. kondisi fisiknya tidak mengalami cacat atau kekurangan.
3. Benih dipilih yang tidak diserang hama penyakit.

Pemilihan benih dilakukan untuk mengurangi risiko kontaminasi dari sumber utama yaitu permukaan atau jaringan dalam benih dan juga mencegah peluang mendapatkan tanaman yang tidak baik kualitasnya.

2. Karantina Bahan Indukan Eksplan

Sebelum dilakukan sterilisasi, benih atau bahan tanaman ditempatkan dalam kondisi karantina, yaitu direndam dalam larutan fungisida sistemik seperti Benomyl selama 24–48 jam untuk mengurangi populasi mikroba epifit dan endofit.



Gambar 2 Perendaman dan penyimpanan biji Aren dengan antibiotik selama 24 jam

Karantina Esha Flora yang dilakukan mengandung 3 hal pokok:

1. Meniadakan mikroba endofit,
2. Memperkuat sel sehingga tidak mudah terinfeksi oleh penyakit,
3. Mempercepat pertumbuhan sel pucuk, sehingga diharapkan jumlah sel yang membelah lebih cepat dari berpindahnya penyakit dari sel satu ke sel lainnya

3. Perendaman dalam Larutan Antibiotik

Eksplan kemudian direndam dalam larutan antibiotik (seperti streptomisin sulfat 100–200 ppm) selama 24 jam untuk menginaktivasi bakteri endofit yang sulit dieliminasi. Ada tiga kelompok besar mikroba yaitu 1. mikroba jamur/ fungi, 2. mikroba bakteri gram positif, 3. Mikroba gram negatif. Sehingga untuk mengeliminir mikroba endofit tersebut sebaiknya menggunakan antibiotik yang dapat mematikan ketiga kelompok mikroba tersebut.

4. Sterilisasi Luar Laminar

Sterilisasi permukaan dilakukan secara bertahap:

1. perendaman dan pengocokan dalam larutan deterjen + Tween-20.
2. Dimulai dengan pencucian menggunakan air mengalir di bawah keran, sambil diusap dan disikat dengan sikat gigi, kemudian disiapkan untuk perlakuan sterilisasi luar laminar
3. Perlakuan sterilisasi luar laminar
 1. Direndam di larutan deterjen 0,5 g/100 ml + tween 80 1 tetes/100 ml (20 menit)
 2. Dibilas air mengalir, sambil disikat satu per satu
 3. Direndam di larutan fungisida 2 g/100 ml + bakterisida 2 g/100 ml (1 jam)
 4. Dibilas air mengalir
 5. Direndam di larutan amoxilin 1 tablet/100 ml (1 jam)
 6. Dibilas air mengalir
 7. Dikumpulkan dalam 1 botol



Gambar 3 Perendaman dengan Deterjen dan Tween 80 di Luar LAF

5. Sterilisasi dalam Laminar

Setelah sterilisasi luar, eksplan dipindahkan ke dalam laminar air flow. Di dalam laminar, dilakukan bilas akhir menggunakan akuades steril, dan pemotongan bagian luar jaringan untuk menghindari kontaminasi residu bahan kimia.



Gambar 4 Proses sterilisasi di dalam laminar Air Flow

Perlakuan sterilisasi di dalam Laminar :

1. Direndam di alkohol 70% (1 menit)
2. Dibilas air steril (3 x 3 menit)
3. Direndam di larutan sodium hipoklorit 15% (15 menit)
4. Dibilas air steril (3 x 3 menit)
5. Direndam di larutan sodium hipoklorit 10% (10 menit)
6. Dibilas air steril (3 x 5 menit)
7. Direndam di larutan bayclin 30% (20 menit)

8. Dibilas air steril (3 x 3 menit)
9. Direndam di larutan bayclin 20% (15 menit)
10. Dibilas air steril (3 x 3 menit)
11. Direndam di larutan bayclin 10% (10 menit)
12. Dibilas air steril (3 x 5 menit)
13. Penanaman

6. Penanaman pada Media Kultur

Eksplan ditanam pada media baku Murashige and Skoog (MS) yang telah ditambah dengan Benomyl dan BSP. Media yang digunakan adalah media MS dengan formula hormon BAP2 mg/l, 2,4D 0,5 GA3 1 mg/l, dan ditambah dengan BSP untuk mengantisipasi tumbuhnya mikroba.

Dalam hal ini digunakan Biji tanpa dikupas karena status biji rekalsitran (bisa berkecambah langsung tanpa harus dormansi terlebih dahulu). Dalam menanam biji di dalam media kultur maka yang harus diperhatikan adalah jumlah air di dalam media kultur di dalam botol harus banyak agar cukup untuk proses perkecambahan semai aren. Oleh sebab itu media yang digunakan adalah media MS berpemadat (dalam bentuk opadat) tapi kemudian ditambah dengan media MS cair sekitar 20 ml di dalam botol kultur kecil (Botol ASI); Jadi bentuk media kultur di dalam botol kultur adalah padat dan cair di atasnya. Media padat untuk berdirinya kecambah, media cair untuk memberikan jumlah cairan yang memadai untuk proses perkecambahan dan imbibisi cairan ke dalam benih melalui lubang biji yang sangat kecil.

7. Ragam Eksplan

Eksplan yang digunakan terdiri atas berbagai bagian tanaman aren seperti biji, embrio, plumula, kotiledon, dan jaringan muda dari tunas kecambah. Keragaman ini memungkinkan evaluasi efektivitas sterilisasi terhadap berbagai tipe jaringan.

8. Strategi Sterilisasi dan Penyelamatan

Eksplan yang menunjukkan gejala kontaminasi ringan atau lambat (*slow-growing contaminant*) dilakukan sterilisasi ulang secara selektif setelah dievaluasi penyebab kontaminasinya berdasarkan analisis kontaminasi. Kultur yang terkontaminasi dilakukan subkultur ke media baru setelah dilakukan perendaman dalam antibiotik dan sterilisasi antiseptik ringan yang formulanya disesuaikan dengan hasil evaluasi analisis kontaminasi.

9. Analisa Kontaminasi

Evaluasi tingkat kontaminasi dilakukan secara berkala hari selama seminggu. Parameter yang diamati meliputi jenis kontaminan (jamur atau bakteri), waktu muncul kontaminasi, dan dimana terjadinya kontaminasi, menempel pada eksplan atau tidak.

Menganalisis kontaminasi akan dapat menentukan asal usul kontaminasi sehingga dapat dievaluasi penyempurnaannya untuk tahap sterilisasi berikutnya

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

1 Hasil Sterilisasi Awal

Sterilisasi awal pada benih aren menunjukkan variasi tingkat keberhasilan tergantung pada kondisi fisik benih dan sumber bahan tanam. Benih yang berasal dari lingkungan terbuka dan lembap cenderung lebih rentan membawa mikroorganisme endofit maupun epifit.

Ragam teknik sterilisasi meliputi:

1. Membersihkan secara fisik dengan cara disikat dengan menggunakan sikat gigi dengan menggunakan detergen dan tween, dilihat atau diperhatikan benar-benar agar tidak ada setitik noda pun pada biji tersebut. Sambil sekali-kali sambil disikat di air keran yang mengalir sampai benar-benar biji mulus tidak ada noda setitik pun. Terutama di daerah-daerah lekukan-lekukan pada biji, terutama ditempat tumbuhnya akar atau tunas pada biji.
2. Sterilisasi dengan fungisida dan bakterisida dengan cara dikocok dan juga disikat, menggunakan sarung tangan karet untuk menyikat permukaan biji dengan larutan fungisida dan bakterisida tersebut. Konsentrasi 500 g/100 ml air. Sterilisasi fungisida dan bakterisida dilakukan berurutan satu-persatu dengan masing-masing 30 menit sambil di sikat. Kemudian dibilas di air keran mengalir sambil disikat dan diusap, kemudian di bilas dengan air steril
3. Perendaman antibiotik streptomycine 500 mg/l. Biji direndam sambil diberi aerator steril untuk mengalirkan udara ke dalam larutan sterilisasi. Perendmana dilakukan 24 jam.

Dari 100 eksplan yang diinokulasikan, sebanyak 65% berhasil tumbuh tanpa kontaminasi dalam dua minggu pertama, sementara 35% menunjukkan gejala kontaminasi, baik berupa jamur (25%) maupun bakteri (10%).

2 Efektivitas Kombinasi Perlakuan Sterilisasi

Pemilihan dan seleksi benih serta pembersihan dan penyikatan dengan detergen dan tween, kombinasi fungisida dan bakterisida sat karantina dengan Basktosin, Benomil, perendaman antibiotik gabungan antara streptomycine, amoxiline, kloramfenicol, dan sterilisasi permukaan secara berlapis dengan BSP terbukti meningkatkan efektivitas sterilisasi. Kontaminasi dapat ditekan hingga di bawah 20% pada kombinasi perlakuan optimal, khususnya pada eksplan yang berasal dari biji. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan fisik dengan diusap dan disikat, pembakaran biji dengan cara dicelupkan ke dalam alkohol dan dibakar, penggunaan ozoniser, penggunaan antibiotik dan sterilisasi bahan kimia sintetik verhasil menekan kontaminasi dalam proses inisiasi secara signifikan

3 Ragam Eksplan dan Respons Kontaminasi

Eksplan dari bagian plumula dan kotiledon menunjukkan tingkat keberhasilan steril yang lebih tinggi dibandingkan dengan eksplan dari jaringan akar dan batang kecambah. Plumula memiliki jaringan muda yang relatif steril secara alami, serta permukaan yang lebih mudah dibersihkan, sehingga respon terhadap perlakuan sterilisasi lebih baik. Sementara itu, jaringan akar cenderung membawa kontaminan dari media tumbuh awal dan sulit untuk disterilkan secara menyeluruh.

4 Respon Eksplan terhadap Media Kultur Steril

Eksplan yang berhasil steril menunjukkan respons positif terhadap media kultur yang telah diperkaya dengan BSP (Benomyl-Streptomycin Powder). Dalam waktu 7–10 hari, terlihat tanda awal pembesaran jaringan dan pembentukan kalus pada beberapa eksplan. Hal ini menunjukkan bahwa proses sterilisasi tidak merusak viabilitas jaringan tanaman dan media yang digunakan mendukung pertumbuhan awal eksplan.

5 Penyelamatan Kultur dan Sterilisasi Ulang

Beberapa eksplan yang mengalami kontaminasi lambat (slow contaminant) berhasil diselamatkan melalui proses sterilisasi ulang. Proses ini meliputi pemotongan bagian kontaminan, perendaman kembali dalam larutan antibiotik ringan, dan inokulasi ulang ke media steril. Dari 30 eksplan yang disterilisasi ulang, sekitar 60% berhasil dipulihkan dan tumbuh normal dalam media baru.

6 Analisa Kontaminasi dan Perbaikan Prosedur

Analisis kontaminasi dilakukan melalui pengamatan morfologi koloni dan waktu muncul kontaminan. Kontaminan jamur cenderung muncul dalam 3–5 hari pertama, sedangkan bakteri umumnya muncul lebih lambat, 5–10 hari. Berdasarkan analisis ini, perbaikan dilakukan pada durasi perendaman dan konsentrasi NaOCl, serta pemilihan eksplan dengan permukaan yang lebih bersih. Penambahan antibiotik dalam media (dalam jumlah terbatas) juga membantu menahan pertumbuhan bakteri residual.

IV. SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

1. Proses sterilisasi dalam inisiasi kultur jaringan aren merupakan tahapan yang paling kritis, karena menentukan keberhasilan eksplan dalam membentuk kultur steril yang dapat tumbuh dan berkembang lebih lanjut.
2. Kombinasi perlakuan fisik dengan cara diusap dan disikatsambil dibilas di air keran mengalir, karantina benih dengan fungisida sistemik, perendaman antibiotik, penggunaan ozoniser, pembakaran eksplan dengan alkohol yang dibakar serta sterilisasi berlapis (luar dan dalam laminar) terbukti efektif dalam menekan kontaminasi, dengan tingkat keberhasilan mencapai lebih dari 70%.
3. Eksplan dari bagian biji menunjukkan tingkat keberhasilan steril yang lebih tinggi dibandingkan eksplan dari jaringan akar atau batang kecambah, menunjukkan pentingnya pemilihan jenis jaringan dalam perencanaan sterilisasi.
4. Penggunaan Benomyl dan Streptomycin, Amoxiciline, Kloramfenicol untuk sterilisasi dalam inisiasi dan penggunaan BSP dalam media kultur mendukung pertumbuhan awal eksplan tanpa menghambat viabilitas, serta membantu menekan pertumbuhan kontaminan residual.
5. Strategi penyelamatan melalui sterilisasi ulang dan subkultur berdasarkan evaluasi hasil analisa kontaminasi terbukti mampu memulihkan sebagian eksplan terkontaminasi, sehingga dapat mengurangi kehilangan bahan genetik yang berharga.

Saran

1. Diperlukan penyesuaian sistem sterilisasi berdasarkan sumber bahan tanaman dan jenis jaringan eksplan, agar metode ini dapat diterapkan lebih luas pada berbagai tipe material tanaman aren.
2. Perlu dikembangkan protokol sterilisasi spesifik untuk eksplan dari pohon induk lapangan (maternal tree) yang tumbuh di lingkungan terbuka dengan risiko kontaminasi tinggi.
3. Penambahan tahapan karantina dan perendaman antibiotik yang selektif serta ramah jaringan perlu terus dieksplorasi untuk menurunkan kontaminasi endofit tanpa menurunkan viabilitas eksplan.
4. Proses sterilisasi ulang sebaiknya disiapkan sebagai bagian dari protokol standar, terutama untuk kultur yang menunjukkan kontaminasi lambat, agar penyelamatan bahan dapat dilakukan secara sistematis.
5. Perlu ada dokumentasi lanjutan terhadap jenis kontaminan, respons eksplan terhadap perlakuan, dan efektivitas media alternatif, sebagai dasar pengembangan standar operasional prosedur (SOP) sterilisasi kultur jaringan aren ke depan.

V. DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, S., & Rohani, E. R. (2016). *Kultur Jaringan Tanaman: Prinsip dan Teknik Dasar*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Aminah, H., & Setyowati, A. B. (2010). Teknik Sterilisasi Eksplan untuk Kultur Jaringan Tanaman Hutan Tropika. *Jurnal Penelitian Hutan Tanaman*, 7(4), 179–188.
- Chawla, H. S. (2009). *Introduction to Plant Biotechnology* (3rd ed.). Enfield: Science Publishers.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*. Dordrecht: Springer.
- Hernández, M. S., Espinosa, A. C., & Martínez, L. P. (2011). In vitro sterilization procedures for bamboo micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 10(65), 14637–14642.
- Kartika, J. G., Noverita, & Saptari, A. (2018). Pengaruh Kombinasi Bahan Sterilisasi terhadap Eksplan Kecambah Aren (*Arenga pinnata* Merr.). *Jurnal Hortikultura Indonesia*, 9(2), 90–97.
- Nandini, A. P., & Wahyudi, S. T. (2020). Evaluasi Kontaminasi dan Keberhasilan Sterilisasi Eksplan pada Kultur Jaringan. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 6(2), 158–164.
- Sujarwo, W. (2012). Bioteknologi dalam Konservasi dan Pemuliaan Tanaman Hutan. *Buletin Plasma Nutfah*, 18(2), 60–67.
- Susilowati, A., & Nugroho, W. D. (2015). Optimalisasi Sterilisasi Eksplan dalam Kultur In Vitro. *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati*, 2(3), 47–54.
- Wulandari, R. A., & Gunawan, R. E. (2021). Penggunaan Antibiotik pada Kultur Jaringan untuk Mengendalikan Kontaminasi Endofit. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 8(1), 12–20.