

Efektivitas Beberapa Metode Sterilisasi terhadap Tingkat Kontaminasi Eksplan Tulang Daun Duku pada Kultur In-Vitro

The Effect of Different Sterilization Techniques on the Contamination Levels of Duku Leaf Midrib Explant in In-Vitro Culture

Rihani Inaya¹, **Irmawati Irmawati**^{1*)}, Susilawati Susilawati¹, Helen Helen¹,
Weri Herlin², Zaidan P. Negara¹

¹Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya, Indralaya, Ogan Ilir
30662, Sumatera Selatan, Indonesia

² Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya, Indralaya,
Ogan Ilir 30662, Sumatera Selatan, Indonesia

*)Penulis untuk korespondensi: irmawati@fp.unsri.ac.id

Sitasi: Inaya, R., Irmawati, I., Susilawati, S., Helen, H., Herlin, W., & Negara, Z. P. (2024). The effect of different sterilization techniques on the contamination levels of duku leaf midrib explant in In-Vitro Culture. In: Herlinda S *et al.* (Eds.), Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal ke-12 Tahun 2024, Palembang 21 Oktober 2024. (pp. 667–678). Palembang: Penerbit & Percetakan Universitas Sriwijaya (UNSRI).

ABSTRACT

The Duku plant (*Lansium domesticum*) is one of the popular tropical fruit in Indonesia. Using the idea of plant cells' totipotency, tissue culture is an alternate method for a quick and massive propagation of high-quality duku plant seedlings. This research was aimed to evaluate different sterilization materials and procedures on duku leaf midrib explants through tissue culture. The research was conducted from June to September 2024 at Tissue Culture Laboratory, Department of Agronomy, Universitas Sriwijaya (2°59'23.4"S 104°43'53.4"E). A combination of sterilizing substances, including 70% alcohol, fungicide, bactericide, liquid detergent, and NaOCl, were utilized in this sterilization procedures. The percentage of live explants, browning explants, and explants infected with bacteria or fungi then were calculated using parametric descriptive analysis. The results showed that the P3 treatment's sterilant combination liquid detergent for 3 minutes, 0.2% of fungicide and bactericide for 10 minutes, 1% NaOCl for 15 minutes, and 70% alcohol for 5 minutes produced the highest percentage of live explants (46%) with a relatively low percentage of contaminated explants (30%) and the lowest percentage of browning explants (23%). Thus P3 treatment was concluded as the best treatment to reduce the contamination level and browning of duku leaf midrib explant.

Keywords: bacteria, browning, fungi, inoculation

ABSTRAK

Tanaman Duku (*Lansium domesticum*) adalah jenis buah tropis di Indonesia yang banyak diminati oleh masyarakat. Kultur Jaringan merupakan alternatif untuk menghasilkan bibit tanaman duku bermutu dengan jumlah banyak dan dalam waktu yang singkat yang mengacu pada konsep sifat totipotensi sel tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan beberapa jenis bahan dan prosedur sterilisasi yang berbeda pada eksplan tulang daun tanaman duku secara kultur jaringan. Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai September 2024 di Laboratorium Kultur Jaringan, Program Studi Agronomi, Universitas Sriwijaya (2°59'23.4"S 104°43'53.4"E). Perlakuan

sterilisasi ini menggunakan kombinasi bahan sterilan yaitu alkohol 70%, bakterisida, fungisida, detergen cair, dan NaOCl. Penyajian data menggunakan analisis deskriptif parametrik dengan menghitung persentase eksplan hidup, eksplan *browning* dan eksplan kontaminasi jamur ataupun bakteri. Hasil dari penelitian ini yaitu didapatkan bahwa kombinasi sterilan pada perlakuan P3 yaitu detergen cair selama 3 menit, bakterisida 0,2% selama 10 menit fungisida 0,2% selama 10 menit, NaOCl 1% selama 15 menit, dan alkohol 70% selama 5 menit menghasilkan persentase eksplan hidup tertinggi sebesar 46%, dengan persentase eksplan terkontaminasi cukup rendah yakni 30% dan persentase eksplan *browning* paling sedikit yaitu sebesar 23%. Perlakuan P3 dapat disimpulkan merupakan perlakuan terbaik karena mampu menekan tingkat kontaminasi dan *browning* pada eksplan tulang daun duku.

Kata kunci: bakteri, *browning*, inokulasi, jamur

PENDAHULUAN

Keragaman jenis tanaman buah lokal di Indonesia belum dikelola secara maksimal padahal mempunyai sifat unggul dan potensial untuk dikembangkan (Kusumasari *et al.*, 2017). Duku (*Lansium domesticum*) tergolong dalam komoditi tanaman buah lokal tropis khas Indonesia, varietas yang terkenal adalah duku Palembang. Susilawati *et al.* (2017) menyatakan bahwa duku Palembang memiliki karakteristik kulit buah yang tipis dan rasa daging buah yang manis. Penyebarannya hampir diseluruh kabupaten di Sumatera Selatan diantaranya Komering, Lahat, Muara Enim dan Musi Banyuasin. Duku notabene jarang dibudidayakan sebagai komoditas utama perkebunan, sehingga sedikit dijumpai perkebunan buah duku ataupun pembibitannya. Pasokan buah duku biasanya berasal dari perkebunan rakyat yang bersifat turun temurun, Selain itu, masa juvenil tanaman duku terbilang lama yakni 8-17 tahun menjadi faktor penghambat lainnya dalam regenerasi tanaman duku.

Kusumasari *et al.* (2017) merangkum beberapa permasalahan yang kerap kali dijumpai dalam pengembangan tanaman buah diantaranya tanaman buah yang ada berusia puluhan bahkan ratusan tahun dan merupakan warisan turun menurun, pada umumnya diperbanyak dari biji sehingga kualitas buah kurang baik, kurangnya perhatian terhadap peremajaan induk tanaman dan upaya perbanyak tanaman secara modern. Bentuk upaya mengatasi permasalahan tersebut adalah perbanyak secara teknik kultur jaringan. Kultur jaringan meliputi penanaman jaringan atau organ tanaman pada medium yang mengandung gula, vitamin, asam- asam amino, garam-garam organik, zat pengatur tumbuh, air dan bahan pematat (agar). Komposisi media tumbuh tersebut sangat menguntungkan bagi pertumbuhan jamur dan bakteri. Maka dari itu, sterilisasi eksplan menjadi faktor penting dalam menentukan keberhasilan program kultur jaringan. Eksplan yang kurang steril maka besar resiko kemungkinan mikroorganisme yang terbawa oleh eksplan tersebut akan tumbuh dengan cepat dan dalam waktu yang singkat menyerang luka potong eksplan dan melepaskan senyawa toksik ke dalam medium kultur yang dapat menyebabkan kematian jaringan (Handayani *et al.*, 2018).

Faktor penting dalam perbanyak tanaman secara kultur jaringan adalah mendapatkan kondisi aseptik, maka perlu memerhatikan tahap sterilisasi baik pada alat maupun eksplan yang akan digunakan. Beberapa teknik sterilisasi sudah banyak dilakukan dan berhasil diterapkan pada perbanyak kultur in vitro. Ardiansyah *et al.* (2014) menggunakan bakterisida, fungisida, detergen, dan larutan hipoklorit untuk mensterilisasi tanaman tembesu. Penelitian tersebut menunjukkan hasil eksplan yang direndam dengan natrium hipoklorit 0.5% (v/v) selama 15 dan 20 menit menghasilkan eksplan aseptik tertinggi dengan persentase hidup sebanyak 26.67% dan 33.3%. Pratiwi *et al.* (2021) menyatakan

bahwa penggunaan alkohol 70% dengan waktu perendaman 5 menit dan bayclin (Natrium hipoklorit) 10% dengan waktu perendaman 10 menit efektif mencegah kontaminasi pada eksplan umbut kelapa sawit.

Berdasarkan penelitian Maharani *et al.* (2021) menggunakan fungisida benomil dalam sterilisasi eksplan ruas batang jeruk dengan hasil terbaik menggunakan konsentrasi fungisida benomil 0,4% (gr/l) dengan waktu perendaman selama 40 menit menghasilkan persentase eksplan hidup tanpa adanya kontaminasi dan berpengaruh nyata terhadap persentase browning. Penambahan bakterisida juga berpengaruh terhadap persentase kontaminasi eksplan, pemberian bakterisida 1,5% dengan bahan aktif streptomisin mampu menunjukkan hasil persentase kontaminasi terendah pada eksplan tanaman stevia (Cahyono & Ningsih, 2023). Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan mendapatkan prosedur sterilisasi terbaik dengan taraf NaOCl dan waktu perendaman yang efektif dalam menekan tingkat kontaminasi dengan resiko eksplan *browning* seminimal mungkin terhadap eksplan tulang daun muda (*leaf midrib*) tanaman duku (*Lansium domesticum*).

BAHAN DAN METODE

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut: 1) Alat Tulis Kantor (ATK), 2) *Aluminium foil*, 3) Autoklaf, 4) Batang pengaduk, 5) Blade, 6) Botol kultur, 7) Cawan petri, 8) Erlenmeyer 9) Gelas beaker, 10) Gelas ukur, 11) *Hotplate*, 12) *Laminar Air Flow* (LAF), 13) *Magnetic strirer*, 14) Plastik pembungkus, 15) pH meter, 16) Pinset, 17) Pipet tetes, 18) *Scalpel*, 19) Saringan, 20) Spatula dan 21) Timbangan analitik. Bahan digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: 1) Agar-agar, 2) Arang aktif, 3) Aquadest, 4) Alkohol, 5) Benomyl, 6) BAP (*Benzyl Amino Purin*) dan NAA (*Napthalenecetic Acid*), 7) Deterjen cair, 8) HCl, 9) Larutan stok hara, 10) Media MS (*Murashige and Skoog*), 11) NaOCl, 12) NaOH, 13) Streptomisin sulfat, 14) Sukrosa, 15) Tween 20, 16) Eksplan tulang daun (*leaf midrib*) dari daun muda tanaman duku. Penelitian ini menggunakan menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari 5 perlakuan prosedur sterilisasi (Tabel 1), setiap perlakuan terdapat 10 unit botol kultur yang diberi 3 kali pengulangan sehingga diperoleh 150 unit percobaan. Data yang digunakan adalah data primer yaitu data yang diperoleh hasil penelitian pengamatan dengan lima peubah pengamatan yaitu persentase hidup (%), persentase browning (%), persentase kontaminasi jamur (%), persentase kontaminasi bakteri (%).

Tabel.1 Perlakuan sterilisasi pada eksplan tulang daun (*leaf midrib*) tanaman duku

Perlakuan	Kombinasi Bahan Sterilan dan Durasi Sterilisasi
P1	Deterjen cair selama 3' + Streptomisin sulfat 0,2% selama 10' + Benomyl 0,2% selama 10' + NaOCl 1% selama 25' + Alkohol 70% selama 5'
P2	Deterjen cair selama 3' + Streptomisin sulfat 0,2% selama 10' + Benomyl 0,2% selama 10' + NaOCl 1% selama 20' + Alkohol 70% selama 5'
P3	Deterjen cair selama 3' + Streptomisin sulfat 0,2% selama 10' + Benomyl 0,2% selama 10' + NaOCl 1% selama 15' + Alkohol 70% selama 5'
P4	Deterjen cair selama 3' + Streptomisin sulfat 0,2% selama 10' Benomyl 0,2% selama 10' + NaOCl 1,5 % selama 10' + Alkohol 70% selama 5'
P5	Deterjen cair selama 3' + Streptomisin sulfat 0,2% selama 10' + Benomyl 0,2% selama 10' + NaOCl 1,5 % selama 5' + Alkohol 70% selama 5'

Keterangan: Bahan sterilan tersebut diantaranya deterjen cair merek dagang Mama lime, bakterisida Agrept 20 WP (bahan aktif Streptomisin sulfat 20%), fungisida Benlox (bahan aktif Benomyl 50%), disinfektan Bayclin (bahan aktif NaOCl 5,25%) dan alkohol 70%.

Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis deskriptif kuantitatif yaitu penelitian yang menyajikan data-data faktual kemudian dianalisis dan ditampilkan dalam bentuk grafik.

HASIL

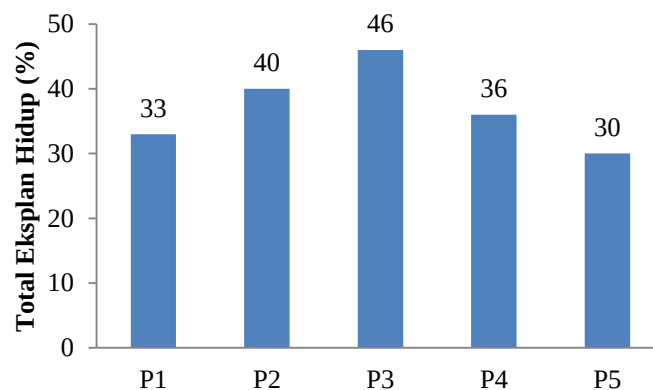
Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup eksplan tulang daun duku selama 4 minggu setelah inokulasi disajikan pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Persentase eksplan hidup hingga 4 MSI

Perlakuan	Persentase Eksplan Hidup (%)			
	1 MSI	2 MSI	3 MSI	4 MSI
P1	83	50	33	33
P2	83	66	46	40
P3	83	66	56	46
P4	73	63	50	36
P5	70	56	36	30

Berdasarkan data yang disajikan pada tabel persentase eksplan hidup (Tabel 2), dapat dilihat bahwa di minggu pertama persentase hidup tertinggi berasal dari eksplan yang disterilisasi dengan NaOCl konsentrasi 1% waktu perendaman 25 menit (P1), 20 menit (P2) dan 15 menit (P3) yakni bertahan 83% di setiap perlakuan, sedangkan persentase hidup terendah berasal dari eksplan yang disterilisasi dengan NaOCl 1,5% selama 10 menit (P4) dengan nilai persentase 73% dan 5 menit (P5) 70% . Pada minggu kedua, penurunan drastis terjadi pada persentase hidup eksplan yang disterilisasi dengan perlakuan 1 (P1) yakni menurun hingga angka 50% sekaligus menjadi nilai terendah dari lima perlakuan pada minggu tersebut, sedangkan pada P2 dan P3 masih berada pada tingkat persentase hidup tertinggi dengan nilai persentase 66%, P4 bertahan 63% , dan P5 menduduk posisi kedua terendah setelah P1 yakni tersisa 56% eksplan hidup.



Gambar 1. Persentase eksplan hidup 4 minggu setelah inokulasi (MSI)

Persentase terus mengalami penurunan seiring meningkatnya persentase kontaminasi dan *browning* setiap minggu. Pada minggu ketiga, eksplan yang disterilisasi dengan perlakuan (P1), (P4), dan (P5) menunjukkan hasil persentase hidup terendah diantara perlakuan lainnya, eksplan dari P1 tersisa 33% yang bertahan hidup, angka ini tetap bertahan pada minggu keempat, sedangkan (P4) dan (P5) menurun hingga nilai persentase 36% dan 30%.

Eksplan yang disterilisasi pada perlakuan P3 menghasilkan persentase eksplan hidup tertinggi pada 4 minggu setelah inokulasi, yaitu sebesar 46% (Gambar 1). Persentase terendah dihasilkan dari perlakuan P5 yang hanya menyisakan eksplan hidup sebesar 30%.

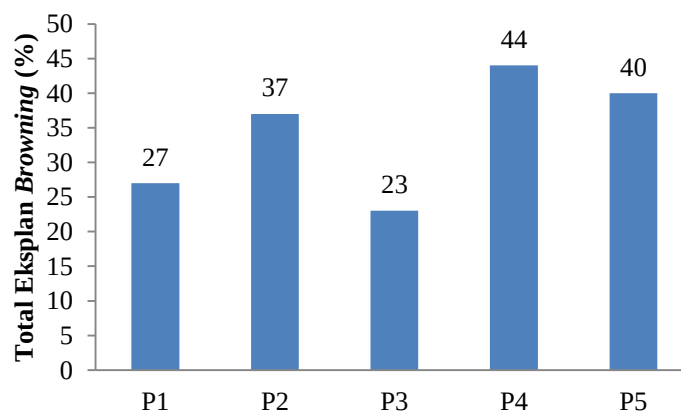
Persentase Eksplan Browning

Eksplan dari kelima perlakuan mulai menunjukkan gejala *browning* sejak minggu pertama pengamatan, seperti yang dapat dilihat pada Tabel 3 berikut. Puncak *browning* terjadi di minggu pertama pada eksplan yang disterilisasi dengan perlakuan 4 dan 5 menghasilkan nilai persentase masing-masing 20%, sedangkan persentase terendah di minggu tersebut berasal dari eksplan yang disterilisasi dengan perlakuan 3 (P3) nilai persentase 7%. Pada minggu kedua hasil persentase eksplan *browning* tertinggi berasal pada eksplan yang disterilisasi dengan perlakuan 2 (P2) yakni mencapai nilai 17%, namun pada minggu berikutnya persentase turun menjadi 7% dan 0%.

Tabel 3. Persentase eksplan browning selama 4 MSI

Perlakuan	Eksplan Mengalami Browning (%)			
	1 MSI	2 MSI	3 MSI	4 MSI
P1	10	10	7	0
P2	13	17	7	0
P3	7	3	10	3
P4	20	7	7	10
P5	20	7	10	3

Eksplan yang diberi perlakuan P3 tetap menunjukkan persentase terendah pada minggu kedua yakni dengan nilai persentase 3%, namun puncak *browning* pada P3 justru terjadi pada minggu ketiga disaat keempat perlakuan lainnya mengalami penurunan persentase *browning*. Tingkat *browning* pada eksplan yang disterilisasi dengan NaOCl 1% (P1,P2,dan P3) cenderung rendah, sedangkan persentase eksplan *browning* tertinggi berasal dari eksplan yang diberi perlakuan sterilisasi 4 dan 5 (NaOCl 1,5%) dengan nilai persentase *browning* 44% dan 40%.



Gambar 2. Persentase total keseluruhan eksplan mengalami *browning*

Berdasarkan Gambar 2, persentase total eksplan mengalami *browning* setelah 4 MSI terendah berasal dari eksplan yang disterilisasi dengan perlakuan 3 (P3) yakni sebanyak 27% dan persentase tertinggi dari eksplan disterilisasi dengan perlakuan 4 (P4) mencapai 44%, nilai persentase ini adalah nilai total persentase *browning* tiap perlakuan selama 4 minggu setelah inokulasi.

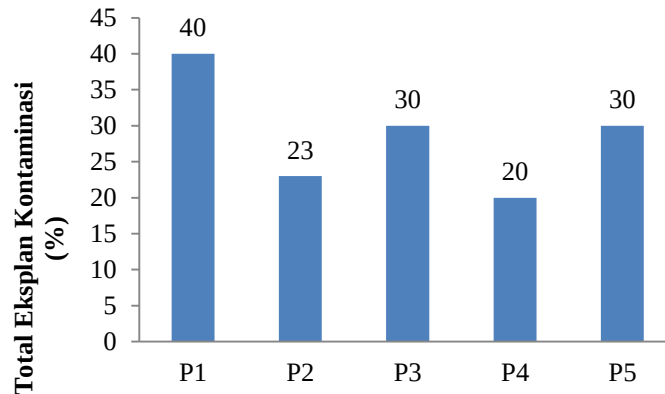
Persentase Eksplan Kontaminasi

Data eksplan kontaminasi gabungan dari total eksplan terkontaminasi bakteri dan total eksplan terkontaminasi jamur disajikan pada Tabel 4 berikut.

Tabel 4. Persentase eksplan kontaminasi selama 4 MSI

Perlakuan	Eksplan Mengalami Kontaminasi Jamur dan Bakteri (%)			
	1 MSI	2 MSI	3 MSI	4 MSI
P1	7	23	10	0
P2	3	0	13	7
P3	10	13	0	7
P4	10	0	7	3
P5	10	7	10	3

Berdasarkan Tabel 4, dapat dilihat bahwa pada minggu pertama eksplan yang disterilisasi dengan P3, P4,P5 menunjukkan nilai persentase tertinggi dengan nilai yang sama yakni 10%, nilai persentase ini berangsur menurun di minggu berikutnya. Kenaikan nilai persentase kontaminasi terjadi pada P1 di minggu kedua, memuncak hingga 23% dan berangsur menurun di minggu berikutnya menjadi 10% dan 0% di minggu keempat setelah inokulasi. Hasil yang cukup mencolok terlihat pada P2 yang menggunakan konsentrasi NaOCl 1% dengan waktu perendaman 20 menit justru memberikan nilai persentase kontaminasi akhir yang rendah yakni 23%, tidak jauh berbeda dengan eksplan yang disterilisasi dengan P4 yang menghasilkan nilai persentase akhir 20%, diduga faktor internal eksplan ataupun kondisi eksternal selama inokulasi turut mempengaruhi persentase kontaminasi eksplan baik disebabkan oleh jamur maupun bakteri.



Gambar 3. Persentase total keseluruhan eksplan kontaminasi

Eksplan dengan total persentase kontaminasi tertinggi berasal dari eksplan pada perlakuan P1 yaitu mencapai 40% (Gambar 3). Puncak kontaminasi pada perlakuan P1 ini terjadi di minggu kedua yang mencapai 23%, angka ini sekaligus menjadi nilai tertinggi persentase kontaminasi mingguan dari 4 minggu setelah inokulasi (Tabel 4). Perlakuan sterilisasi dengan taraf NaOCl 1,5% dan waktu perendaman 10 menit (P4) mampu menekan kontaminasi dengan total persentase akhir 20% yang merupakan terendah di antara perlakuan lainnya

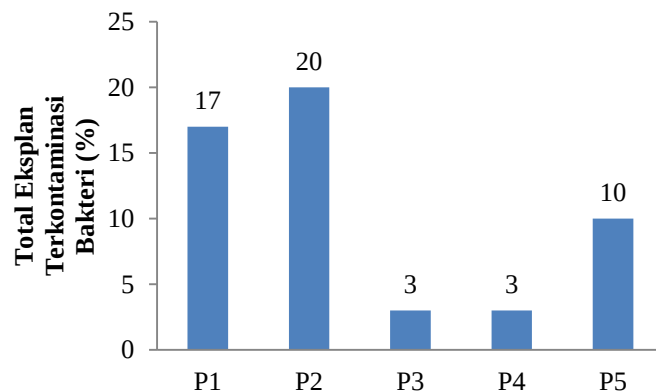
Persentase Eksplan Terkontaminasi Bakteri

Persentase eksplan terkontaminasi bakteri merupakan data hasil pengamatan terhadap kematian eksplan akibat kontaminasi bakteri yang disajikan pada Tabel 5 berikut.

Tabel 5. Persentase eksplan terkontaminasi bakteri selama 4 MSI

Perlakuan	Eksplan Terkontaminasi Bakteri (%)			
	1 MSI	2 MSI	3 MSI	4 MSI
P1	7	7	3	0
P2	0	0	13	7
P3	3	0	0	0
P4	3	0	0	0
P5	10	0	0	0

Berdasarkan data yang disajikan pada Tabel 5, gejala bakteri rata-rata terjadi pada 1 MSI, namun pada perlakuan NaOCl 1% dan waktu perendaman 20 menit (P2) justru baru memuncak di minggu ketiga. Perbedaan terlihat pada hasil eksplan yang disterilasi dengan konsentrasi NaOCl 1% selama 15 menit (P3), kontaminasi eksplan muncul sejak minggu pertama setelah inokulasi kemudian menurun hingga 0% di minggu berikutnya, sama halnya yang terjadi pada eksplan yang disterilasi dengan NaOCl 1,5% selama 10 dan 5 menit (P4 dan P5). Berdasarkan Gambar 4, persentase kontaminasi bakteri tertinggi berasal dari eksplan yang disterilasi dengan NaOCl 1% selama 20 menit (P2) yang mencapai 20%. Sedangkan eksplan yang disterilasi dengan NaOCl 1% selama 15 menit dan NaOCl 1,5% selama 10 menit (P3 dan P4) menunjukkan hasil kontaminasi bakteri terendah yaitu hanya 3%.



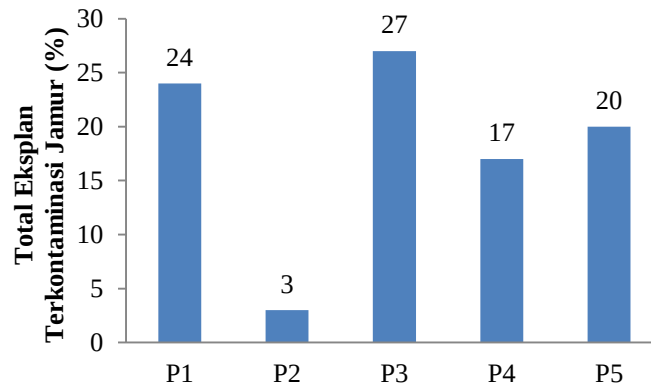
Gambar 4. Persentase total keseluruhan eksplan terkontaminasi bakteri

Persentase Eksplan Terkontaminasi Jamur

Persentase eksplan terkontaminasi jamur merupakan parameter pengamatan terhadap kematian eksplan akibat kontaminasi jamur (Tabel 6). Perlakuan P2 menunjukkan persentase kontaminasi jamur terendah diantara perlakuan lainnya yakni hanya 3% di minggu pertama pengamatan. Berdasarkan Gambar 5, dapat dilihat bahwa perlakuan sterilisasi P2 mampu menekan kontaminasi jamur sngat baik dengan persentase akhir hanya 3% , meskipun pada parameter kontaminasi bakteri P2 justru memberikan hasil sebaliknya. Perlakuan P3 merupakan perlakuan dengan tingkat kontaminasi jamur tertinggi selama 4 MSI, yaitu mencapai 27%. Puncak kontaminasi tertinggi pada perlakuan P3 terjadi pada 2 MSI yaitu sebesar 13%.

Tabel 6. Persentase eksplan terkontaminasi jamur selama 4 MSI

Perlakuan	Eksplan Terkontaminasi Jamur (%)			
	1 MSI	2 MSI	3 MSI	4 MSI
P1	0	17	7	0
P2	3	0	0	0
P3	7	13	0	7
P4	7	0	7	3
P5	0	7	10	3



Gambar 5. Persentase total keseluruhan eksplan terkontaminasi jamur

PEMBAHASAN

Prosedur sterilisasi dalam penelitian ini merupakan evaluasi dari beberapa penelitian yang menggunakan bahan sterilan NaOCl terhadap tanaman tahunan dengan perbedaan konsentrasi dan waktu perendaman. Ardiansyah *et al* (2014) menggunakan larutan natrium hipoklorit untuk mensterilisasi tanaman tembesu dengan konsentrasi 0.5% (v/v) selama 15 dan 20 menit, menunjukkan hasil eksplan aseptik tertinggi dengan persentase hidup sebanyak 26.67% dan 33.3%. Terdapat 5 perlakuan sterilisasi yang diujicobakan dalam penelitian ini, setiap perlakuan memiliki prosedur yang sama, faktor pembeda terletak pada konsentrasi dan waktu perendaman pada bahan sterilan NaOCl.

Tahapan sterilisasi diawali dengan pre sterilisasi yakni pencucian eksplan menggunakan deterjen dan air mengalir. Eksplan kemudian direndam dalam larutan deterjen, bakterisida, fungisida, dan NaOCl yang dilakukan di ruang preparasi, kemudian tahap akhir yakni perendaman eksplan dalam larutan alkohol yang dilakukan di *Laminar Air Flow* tanpa pembilasan air steril seperti yang dilakukan pada tahapan sebelumnya, bertujuan supaya eksplan benar-benar dalam kondisi aseptik. Perlakuan sterilisasi 1, 2 dan 3 menggunakan konsentrasi NaOCl 1% dengan waktu perendaman berurut 25 menit, 20 menit, dan 15 menit, sedangkan pada perlakuan 4 dan 5 menggunakan konsentrasi 1,5% dengan waktu perendaman 10 menit dan 5 menit. Perbedaan tersebut berpengaruh terhadap hasil yang didapatkan selama pengamatan. Pengamatan dilakukan selama 28 hari setelah inokulasi atau 4 minggu setelah inokulasi (MSI).

Parameter yang diamati adalah persentase eksplan hidup, eksplan mengalami browning, eksplan kontaminasi (jamur dan bakteri). Rodinah *et al* (2016) mengkategorikan eksplan hidup apabila eksplan dilihat secara visual menunjukkan warna hijau, tidak terkontaminasi dan tidak menunjukkan perubahan warna menuju coklat kering. Pengamatan terhadap eksplan hidup dilakukan dengan mengamati secara visual berdasarkan kondisi dan warna eksplan yang diamati selama 28 hari setelah inokulasi atau 4 MSI untuk untuk memperkirakan prosedur yang paling efektif dalam menekan tingkat kontaminasi di luar permukaan ataupun kontaminasi sistemik. Eksplan hidup dalam penelitian ini belum menunjukkan adanya perubahan yang signifikan seperti munculnya kalus, tunas ataupun akar, tetapi kondisi eksplan dalam keadaan hijau tanpa adanya gejala browning ataupun kontaminasi. Selaras dengan pendapat Handayani *et al.*, (2018) yang mempropagasi eksplan tunas daun lauhung, eksplan baru menunjukkan pertumbuhan tunas setelah 8 MSI. Jenis eksplan yang digunakan juga mempengaruhi lama pertumbuhan, eksplan yang diambil dari tanaman tahunan cenderung membutuhkan waktu 2-3 bulan dengan penambahan konsentrasi ZPT yang cukup tinggi untuk mendorong percepatan pertumbuhan pada eksplan (Handayani *et al.*, 2021).

Berdasarkan hasil penelitian pada persentase eksplan hidup (Tabel 2) dapat dilihat bahwa eksplan yang disterilisasi dengan perlakuan 3 (P3) menunjukkan persentase tertinggi yakni 46% bertahan hidup setelah 4 MSI, sedangkan persentase hidup terendah berasal dari eksplan yang disterilisasi dengan perlakuan 5 (P5) yakni sebesar 30%. Eksplan hidup bergantung pada konsentrasi dan waktu perendaman pada saat sterilisasi. Hal tersebut didukung oleh hasil penelitian Setiani *et al* (2018) yang melaporkan bahwa eksplan yang disterilisasi dengan konsentrasi natrium hipoklorit yang sama namun dengan waktu perendaman yang berbeda akan didapatkan hasil yang berbeda. Hal ini disebabkan senyawa natrium hipoklorit dapat mengubah struktur dan tekstur eksplan. Eksplan dengan perendaman natrium hipoklorit yang lebih lama menyebabkan permukaannya memar atau mengalami pencoklatan. Semakin lama perendaman eksplan dengan natrium hipoklorit 5,25% maka semakin luas permukaan eksplan yang mengalami pencoklatan dan lama kelamaan menyebabkan kematian jaringan. Penggunaan natrium hipoklorit juga mengakibatkan keputihan jaringan dalam jumlah yang besar. Pada konsentrasi 5,25% (tidak diencerkan) penggunaan natrium hipoklorit menyebabkan kontaminasi hingga 78,33%. Pada konsentrasi 2,5% (sudah diencerkan) dan dengan penambahan prosedur etanol 70%, didapati penurunan kontaminasi hingga 58,33% (Pranata dan Herawati, 2019).

Taraf konsentrasi bahan sterilisasi yang terlalu pekat dapat menyebabkan kerusakan jaringan eksplan, namun konsentrasi yang rendah dengan waktu perendaman yang tidak tepat justru juga dapat menyebabkan kontaminasi yang tinggi sebab dinilai tidak optimal dalam mensterilisasi eksplan dari faktor kontaminan. Penyebab kematian eksplan dalam penelitian ini besar dipengaruhi oleh *browning*. *Browning* (pencoklatan) sering terjadi pada kultur *in vitro* tanaman berkayu atau eksplan yang diisolasi dari tanaman dewasa (Ardiansyah *et al.*, 2014) *Browning* ditandai dengan pencoklatan bahan eksplan diakibatkan adanya aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase yang dilepaskan ketika jaringan eksplan dilukai. Luka bekas pemotongan pada jaringan eksplan menyebabkan stres sehingga terjadi peningkatan aktivasi PAL (Fenilalanin Amonia Liase) diikuti oleh produksi fenilpropanoid (Sulichantini *et al.*, 2024). *Browning* mengakibatkan kematian pada eksplan, sehingga dilakukan perlakuan khusus yaitu penambahan arang aktif sebanyak 2 gr sebagai pencegahan *browning*. Arang aktif sebagai adsorben mampu menyerap senyawa fenol yang dihasilkan oleh eksplan saat proses perlakuan. Selain itu, arang aktif juga menurunkan, bahkan menghambat akumulasi eksudat sel (Safwat *et al.*, 2015). *Browning* pada eksplan tulang daun tanaman duku diawali dengan pencoklatan bekas pelukaan saat memotong eksplan. Hasil penelitian Nurfadilah (2015) menyimpulkan bahwa penambahan arang aktif dapat menurunkan resiko *browning* dan menghasilkan persentase perkecambahan eksplan *Dendrobium taurulinum* lebih tinggi hingga 18,12%.

Bekas luka kecoklatan mulai terlihat 1 hari setelah inokulasi kemudian lama-kelamaan menghitam. Rata-rata puncak *browning* setiap perlakuan terjadi di minggu pertama setelah inokulasi, tetapi puncak *browning* eksplan yang diberi perlakuan sterilisasi 3 justru terjadi pada minggu ketiga setelah inokulasi, hal ini menandakan bahwa prosedur sterilisasi eksplan dengan konsentrasi NaOCl 1% dan waktu perendaman 15 menit optimal dalam mempertahankan eksplan hidup dari gejala *browning* 3 minggu lebih lama dari keempat perlakuan lainnya. Persentase eksplan *browning* pada perlakuan sterilisasi 3 juga menjadi nilai terendah dari seluruh perlakuan dengan nilai 23%, sedangkan persentase eksplan *browning* tertinggi berasal dari eksplan yang diberi perlakuan sterilisasi 4 dan 5 (NaOCl 1,5%) dengan nilai persentase *browning* 44% dan 40%. Eksplan pada perlakuan sterilisasi P4 dan P5 cenderung menunjukkan hasil *browning*, namun apabila dilihat dari parameter kontaminasi, kedua perlakuan ini menunjukkan hasil yang cukup baik. Eksplan yang mengalami kontaminasi ditandai dengan adanya kemunculan bakteri ataupun jamur pada

sampel eksplan dan permukaan media. Pada perlakuan sterilisasi 4 menunjukkan nilai persentase terendah yakni 20%, hal ini mengindikasikan bahwa taraf konsentrasi NaOCl yang ditinggikan dengan waktu perendaman 10 menit mampu menekan kontaminasi pada eksplan, sedangkan persentase kontaminasi tertinggi berasal dari perlakuan sterilisasi P1 yakni 40%. Tingkat *browning* pada perlakuan sterilisasi 1,2, dan 3 cenderung rendah, pada P1 hanya mencapai 27%, namun jika dilihat dari parameter kontaminasi justru sangat tinggi. Hasil ini memperkuat dugaan bahwa keseimbangan antara konsentrasi dan waktu perendaman bahan sterilan NaOCl berpengaruh terhadap keberhasilan hidup dan penyebab kematian eksplan.

Berdasarkan grafik persentase eksplan terkontaminasi bakteri (gambar 4), perlakuan sterilisasi menggunakan NaOCl 1,5% dengan perendaman 10 menit (P4) menunjukkan kontaminasi bakteri sebanyak 3% sedangkan perendaman dengan NaOCl 1,5% selama 5 menit (P5) menunjukkan adanya kontaminasi bakteri (10%). Hal ini mengindikasikan bahwa lamanya perendaman dapat memengaruhi tingkat kontaminasi. Natrium hipoklorit banyak digunakan karena efektif membunuh bakteri dengan cara merusak membran sel bakteri. Jika senyawa ini diberikan dalam konsentrasi rendah dan lama perendaman singkat tidak terlalu efektif dalam mengendalikan kontaminasi pada eksplan. Namun, apabila semakin lama perendaman dengan NaOCl maka perkembangan jaringan eksplan menjadi terhambat yang ditandai dengan *browning* (warna kecoklatan). Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri menyebabkan eksplan menjadi basah karena terdapat cairan berupa lendir (Setiani *et al.*, 2018).

Sterilisasi dengan NaOCl 1% dan waktu perendaman 25 menit (P1) dan 20 menit (P2) menunjukkan hasil kontaminasi tertinggi selama 4 minggu setelah inokulasi. Puncaknya terjadi pada P2 di minggu ketiga. Hal ini disinyalir bahwa bakteri tidak saja ada pada bahan tanaman di bagian permukaan tetapi juga terdapat bagian dalam bahan tanaman. Biasanya bila ada di permukaan respons kontaminasinya sangat cepat, dalam tempo 24 jam sudah bisa terlihat. Bakteri yang ditemukan dalam hasil penelitian ini menunjukkan karakteristik lendir busuk, terdapat 3 kategori warna lendir yakni berwarna putih, kuning, dan hijau. Gejala lendir diawali dengan adanya titik lendir di sekitar eksplan, lendir lama kelamaan menyebar ke seluruh permukaan eksplan dan media sehingga menyebabkan eksplan membusuk. Bakteri kontaminan pada kultur jaringan diantaranya adalah *Bacillus* sp, *Erwinia* sp, dan *Lactobacillus* sp. Bakteri yang berasal dari genus ini menghasilkan endospora yang bisa tahan pada suhu 100 ° C atau lebih dan sangat tahan terhadap desinfektan seperti alkohol, hipoklorit, dan merkuri klorida (Wulandari *et al.*, 2022). Bakteri *Staphylococcus aerus* dicirikan dengan koloni bakteri berwarna kuning yang dapat dilihat secara visual. Bakteri ini dapat hidup di media agar (*Nutrient Agar Plate*), penyebab bakteri ini disinyalir berasal dari pernafasan dan kulit manusia. Faktor lainnya adalah suhu, ketika bakteri dan jamur dapat menyerang dari luar dan meningkatkan kelembapan sehingga mempercepat perkembangan mikroorganisme. Perbedaan antara kedua jenis kontaminasi antara bakteri dan jamur dibedakan dengan ciri eksplan terkontaminasi bakteri tampak basah dan berlendir sedangkan kontaminasi yang ditimbulkan oleh jamur eksplan mengering dan muncul hifa yang ditandai dengan garis-garis putih.

Terdapat beberapa kategori ciri hifa yang ditemukan dalam hasil penelitian ini yakni koloni hifa putih berkerut seperti beludru (*Apergillus* sp), koloni hifa putih dengan arah pertumbuhan menyebar warna miselium putih, hijau lama-kelamaan menghitam (*Rhizoctonia* sp), hifa berwarna putih menyerupai serat-serat kapas (*Rhizopus* sp) dan jamur dengan hifa putih bersekat dan bercabang (*Colletthricum* sp) (Sulichantini *et al.*, 2024). Kontaminasi jamur menghambat pertumbuhan eksplan dengan menyerap nutrisi pada media dan merusak sel hidup pada eksplan. Eksplan yang terkontaminasi jamur lama-kelamaan

mengering dan seluruh permukaan media ataupun eksplan akan tertutupi oleh hifa jamur, gejala ini dapat dilihat pada eksplan yang terkontaminasi jamur *Rhizoctonia* sp.

Eksplan dengan nilai kontaminasi jamur terendah berasal dari eksplan yang disterilisasi dengan bahan sterilan NaOCl 1% waktu perendaman 20 menit. Perbedaan mencolok terhadap P3 yang justru menghasilkan eksplan kontaminasi jamur tertinggi sebanyak 27% setelah 4 MSI. Banyak faktor penyebab perbedaan hasil pengamatan. Berdasarkan sumber kontaminasi, P2 memang menunjukkan hasil kontaminasi jamur terendah, namun jika dilihat dari kontaminasi bakteri, perlakuan ini justru menunjukkan hasil kontaminasi tertinggi. Maka dinilai perlakuan sterilisasi yang optimal dalam menekan kontaminasi adalah perlakuan sterilisasi dengan hasil kontaminasi gabungan terendah yakni P4 dengan nilai 20% , P3 dan P5 senilai 30%. Berdasarkan hasil pengamatan selama 4 MSI dapat dinilai bahwa perlakuan sterilisasi P3 mampu menekan kontaminasi dengan nilai persentase kontam cukup rendah yakni 30%, juga dapat mempertahankan eksplan hidup sebesar 47% dengan persentase browning sangat rendah yakni 23%. Perlakuan yang mampu menekan kontaminasi dengan baik adalah P4 dan P5 namun taraf konsentrasi NaOCl 1,5% dalam perlakuan ini menyebabkan persentase eksplan cukup tinggi. Pada perlakuan P1 dan P2, perbedaan waktu perendaman sangat menentukan hasil browning dan kontaminasi pada eksplan, maka dari itu perlu adanya keseimbangan antara taraf konsentrasi dan waktu perendaman sehingga didapat perlakuan sterilisasi terbaik yang dinilai mampu menekan tingkat kontaminasi tanpa merusak jaringan pada eksplan sehingga eksplan tetap dapat bertahan hidup dalam kondisi aseptik.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan bahwa eksplan yang disterilisasi dengan taraf konsentrasi NaOCl 1% dan waktu perendaman 15 menit (perlakuan P3) mampu menekan tingkat kontaminasi eksplan dengan persentase eksplan terkontaminasi cukup rendah yaitu sebesar 30%, namun tetap mempertahankan eksplan hidup dengan nilai persentase tertinggi diantara perlakuan lainnya yang mencapai 46% serta nilai persentase eksplan mengalami *browning* sangat rendah yaitu 23. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa taraf konsentrasi NaOCl 1% dan waktu perendaman 15 menit pada perlakuan sterilisasi 3 merupakan prosedur paling efektif untuk eksplan *midrib* daun muda tanaman duku karena taraf konsentrasi dan waktu perendaman tersebut dinilai seimbang dan ideal dalam menekan tingkat kontaminasi eksplan dengan resiko kematian eksplan akibat kerusakan jaringan eksplan yang rendah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada Rektor Universitas Sriwijaya yang telah memberikan pendanaan penelitian ini melalui Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) dengan SK rektor no 0013/SK.LP2M.PT/2024 tanggal 20 Mei 2024.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiansyah, R., Supriyanto, A., Wulandari, A. S., Subandy, B., dan Fitiani. (2014). Teknik Sterilisasi Eksplan dan Induksi Tunas dalam Mikroprogasi Tembesu (*Fragraea fragrans*). *Silvikultur Tropika*, Vol 5(3): 167-173. <https://doi.org/10.29244/j-siltrop.5.3.%25p>
- Cahyono, E. H., dan Ningsih, E. (2023). Pengembangan Metode Teknik Sterilisasi Eksplan Guna Meningkatkan Keberhasilan Kultur Jaringan Tanaman Stevia (*Stevia*

- rebaudiana). *Jurnal Pengembangan Potensi Laboratorium*. Vol2(2):60–68.
<https://doi.org/10.25047/plp.v2i2.3685>
- Handayani, S., Ismadi, Sayuti, M., Rahayu, C., Hasyim. (2018). Pengaruh Bahan Sterilan Etanol dan Merkuri Klorida Terhadap Pertumbuhan Eksplan Tunas Daun Lahung (*Durio dulcis*) Secara *in Vitro*. *Prosiding Forum Komunikasi Perguruan Tinggi Pertanian Indonesia*. Hal: 271-276.
- Handayani, E., Irsyadi M., Aris, I., Leshia, R., Alawiyah, M, N., Ayuningtias, dan Rineksane. 2021. Optimasi Sterilisasi Endosperma Kepel (*Stelethocarpus burahol*) Secara *In Vitro*. *BIO-EDU: Jurnal Pendidikan Biologi*, 6(2) : 113-121.
<https://doi.org/10.32938/jbe.v6i2.1179>
- Kusumasari, A, C., Susila, A., Hindarwati, Y, dan S. Rustini. (2017). Potensi dan Permasalahan Pengembangan Sumber Daya Genetik Tanaman Buah Lokal Jawa Tengah. *Prosiding Seminar Nasional Sumber Daya Genetik*, IAARD Press, pp. 89–100.
- Maharani, S. Haryono, N, dan Mariana, B, D.(2022). Analisis Pengaruh Konsentrasi Pemberian Fungisida Benomyl Terhadap Sterilisasi Kultur Jaringan Ruas Batang Tanaman Jeruk Tawamangu. *Prosiding Seminar Bioteknologi Nasional (SimBioN)*. Vol 1: 109-120.
- Nurfadilah, S. (2015). The Effect of Culture Media and Activated Charcoal on Asymbiotic Seed Germination And Seedling Development of A Threatened Orchid *Dendrobium taurulinum* J.J. Smith *In Vitro*. *Berita Biologi* 15(1): 49-57.
- Pranata, I, T dan Herawati, M, M. (2019). Efektifitas Sterilisasi Kimiawi Eksplan Pucuk *Artemisia annua* dengan Berbagai Prosedur Sterilisasi Pada Tahap Inisiasi *In Vitro*. *Jurnal Agrium*, Vol : 22(2) : 94-101. <https://doi.org/10.30596/agrium.v21i3.2456>
- Rodinah, Razie, F., Naemah, D. & Fitriani, A. (2016). Respon bahan sterilan pada eksplan jelutung rawa (*Dyra lowii*). *Jurnal Hutan Tropis*, 4(3), 240-245.
<https://doi.org/10.20527/jht.v4i3.3617>.
- Safwat, G., Abdul, R. F., & Sharbasy, S. E. (2015). *The effect of some antuioxidants on blackening and growth of in vitro of banana (Musa spp.,cv Grand Naine)*. *J. Genet. Cytol* 44: 47-59.
- Setiani, N. A., Nurwinda, F., & Astriany, D. (2018). Pengaruh desinfektan dan lama perendaman pada sterilisasi eksplan daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson ex. FA Zorn) Fosberg). *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, Vol: 6(3): 78-82.
<https://doi.org/10.21776/ub.biotropika.2018.006.03.01>
- Susilawati, Muhammad, A., Putro, P, D., Lucy, R., Irmawati, Merida, J, D. (2017). Korelasi Karakteristik Vegetatif dan Generatif Aksesori Duku di Area Banyuasin, Sumatera Selatan. *RJOAS*, 9(69). <https://doi.org/10.33230/JLSO.5.1.2016.238>
- Sulichantini, E. D., Nazari, A. P. D., & Nuanyah, A. (2024). Identifikasi Kontaminasi Kultur Jaringan Pisang Cavendish. *Jurnal Agrotek Tropika*. Vol: 12(2): 400-409.
<http://dx.doi.org/10.23960/jat.v12i2.6721>
- Wulandari, S., Nisa, Y. S., Taryono, T., Indarti, S., & Sayekti, R. S. (2022). Sterilisasi peralatan dan media kultur jaringan. *Agrotechnology Innovation (Agrinova)*. Vol 4(2): 16-19. <https://doi.org/10.22146/a.77>