

Sterilisasi Eksplan Daun dalam Perbanyak Bibit Kopi Arabika Melalui Somatik Embriogenesis

Rina Arimarsetiowati¹⁾

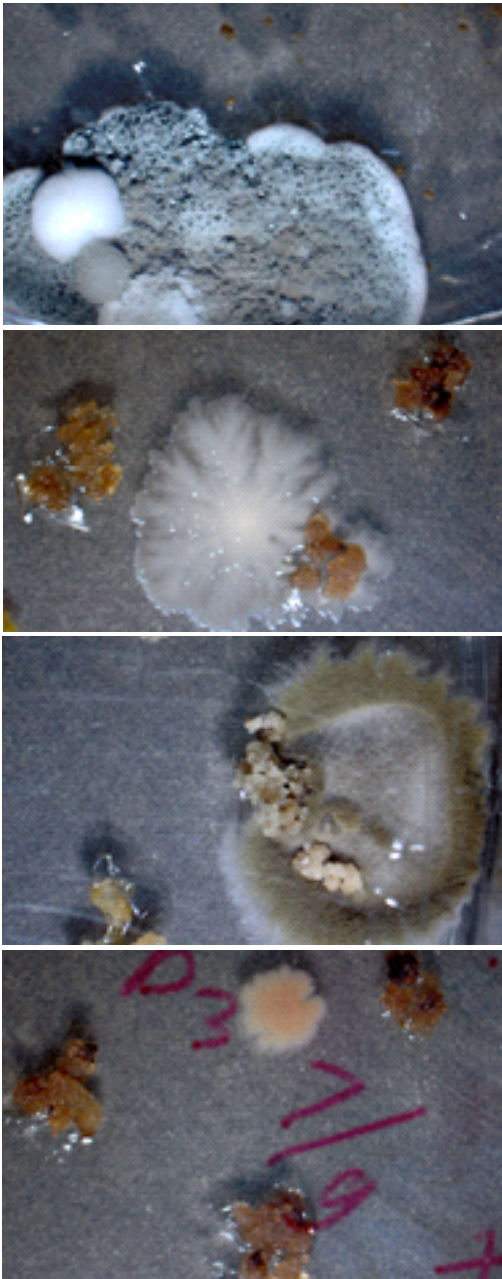
¹⁾Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB. Sudirman 90 Jember 68118

Sterilisasi merupakan salah satu tahapan yang penting dalam perbanyak kopi arabika melalui teknik Somatik Embriogenesis. Sterilisasi dilakukan dalam 4 aspek yaitu sterilisasi eksplan, peralatan dan media kultur yang akan digunakan serta lingkungan kerja. Sterilisasi erat kaitannya dengan pembuatan media kultur dan proses perbanyak embrio somatik. Sterilisasi adalah suatu proses yang berusaha membebaskan bahan atau alat dari mikroorganisme. Bahan atau alat yang telah melalui proses sterilisasi tidak akan benar-benar bebas dari mikroorganisme. Tujuan utama sterilisasi adalah untuk meminimalkan gangguan dari mikroorganisme yang tidak dikehendaki (kontaminan). Sterilisasi adalah kegiatan dalam kultur jaringan yang harus dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* dan menggunakan alat-alat yang steril.

Perbanyak tanaman melalui teknik Somatik Embriogenesis kopi arabika akan berhasil dengan baik apabila semua persyaratan dipenuhi yaitu: media yang cocok, kondisi atmosfer yang sesuai dan kondisi aseptik/steril. Kondisi aseptik berlaku untuk eksplan daun kopi arabika (bahan tanam), peralatan dan media tanam kultur serta lingkungan kerja. Apabila kondisi aseptik tidak dipenuhi, maka proses perbanyak Somatik Embriogenesis kopi arabika akan gagal karena kontaminasi, misalnya jamur dan bakteri akan tumbuh di media kultur (lihat gambar di bawah).

Kegiatan sterilisasi ini sangat penting dilakukan untuk mengatasi berbagai macam kontaminasi yang berasal dari¹⁾:

1. Organisme kecil yang masuk ke dalam media, seperti semut.
2. Sterilisasi media dalam *autoclave* yang kurang tepat, meliputi lamanya waktu sterilisasi.
3. Pencucian botol kultur, erlenmeyer, alat-alat lainnya yang kurang bersih/steril.
4. Lingkungan kerja dan ruang kultur yang tidak steril.
5. Kecerobohan dalam bekerja.



Jamur dan bakteri yang tumbuh di media kultur dalam perbanyakkan embrio somatik kopi arabika

Sterilisasi Bahan Tanaman

Kontaminasi eksplan daun terdiri dari kontaminasi eksternal maupun internal. Kontaminasi terjadi pada saat pengambilan eksplan daun di lapang maupun metode sterilisasi dalam *laminar air flow cabinet* yang kurang tepat. Sel tanaman dan kontaminan adalah sama-sama benda hidup. Kontaminan harus dihilangkan tanpa mematikan sel tanaman. Sterilisasi bahan tanam dilakukan

2 tahap, meliputi sterilisasi di lapang dan sterilisasi di *laminar air flow cabinet*. Sterilisasi di lapang dilakukan dengan menyiram larutan Benlate sebanyak 2 gr/L pada tanaman 1 minggu sebelum eksplan daun kopi arabika diambil. Hal ini bertujuan agar larutan Benlate meresap dalam tanaman dan mengurangi kontaminasi jamur yang berasal dari lapang.

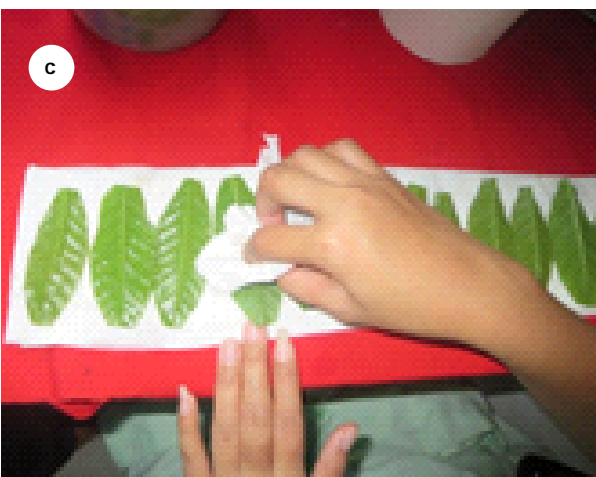
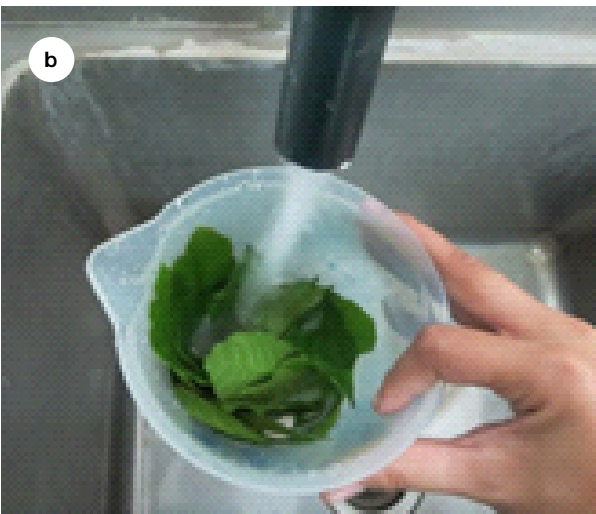
Sterilisasi eksplan daun dalam *laminar air flow cabinet* pada umumnya dilakukan dengan merendam eksplan dalam larutan sodium hipoklorit dengan konsentrasi dan waktu yang berbeda sebanyak tiga kali. Sterilisasi pertama dengan konsentrasi 20% selama 10 menit, selanjutnya dengan konsentrasi 15% selama 10 menit dan terakhir dengan konsentrasi 10% selama 10 menit. Masing-masing tahapan diakhiri dengan membilas eksplan daun dengan air steril sebanyak tiga kali. Sterilisasi eksplan daun kopi arabika dilakukan dalam beberapa tahapan sebagai berikut:

a. Pencucian eksplan daun kopi arabika

Sebelum dicuci, bagian tepi eksplan daun kopi arabika dihilangkan untuk mengurangi sumber kontaminasi. Sterilisasi eksplan daun dimulai dengan pencucian dengan air mengalir dan pembuangan bagian-bagian yang kotor dan mati. Pencucian dapat dilakukan dengan *tissue* menggunakan sabun cair/deterjen halus. Hal ini bertujuan membersihkan daun dari debu dan kotoran yang menempel yang berasal dari lapang. Selain itu untuk mencegah koloni kontaminan yang masih menempel di permukaan daun agar koloni tersebut lebih peka terhadap bahan-bahan sterilisasi dan menghilangkan senyawa fenol. Daun yang sudah bersih dikeringkan dengan *tissue* dan diletakkan dalam *beaker glass* kemudian dibawa masuk ke dalam *laminar air flow cabinet*.

b. Sterilisasi daun dengan larutan Tween-20

Di dalam *laminar air flow cabinet*, eksplan daun direndam dengan larutan Tween-20 sebanyak 5 tetes yang bertujuan untuk membuka jaringan daun agar bahan sterilan mudah masuk dalam jaringan daun. Perendaman ini dilakukan selama 10 menit. Setelah itu, daun dibilas dengan air steril sebanyak 5 kali.



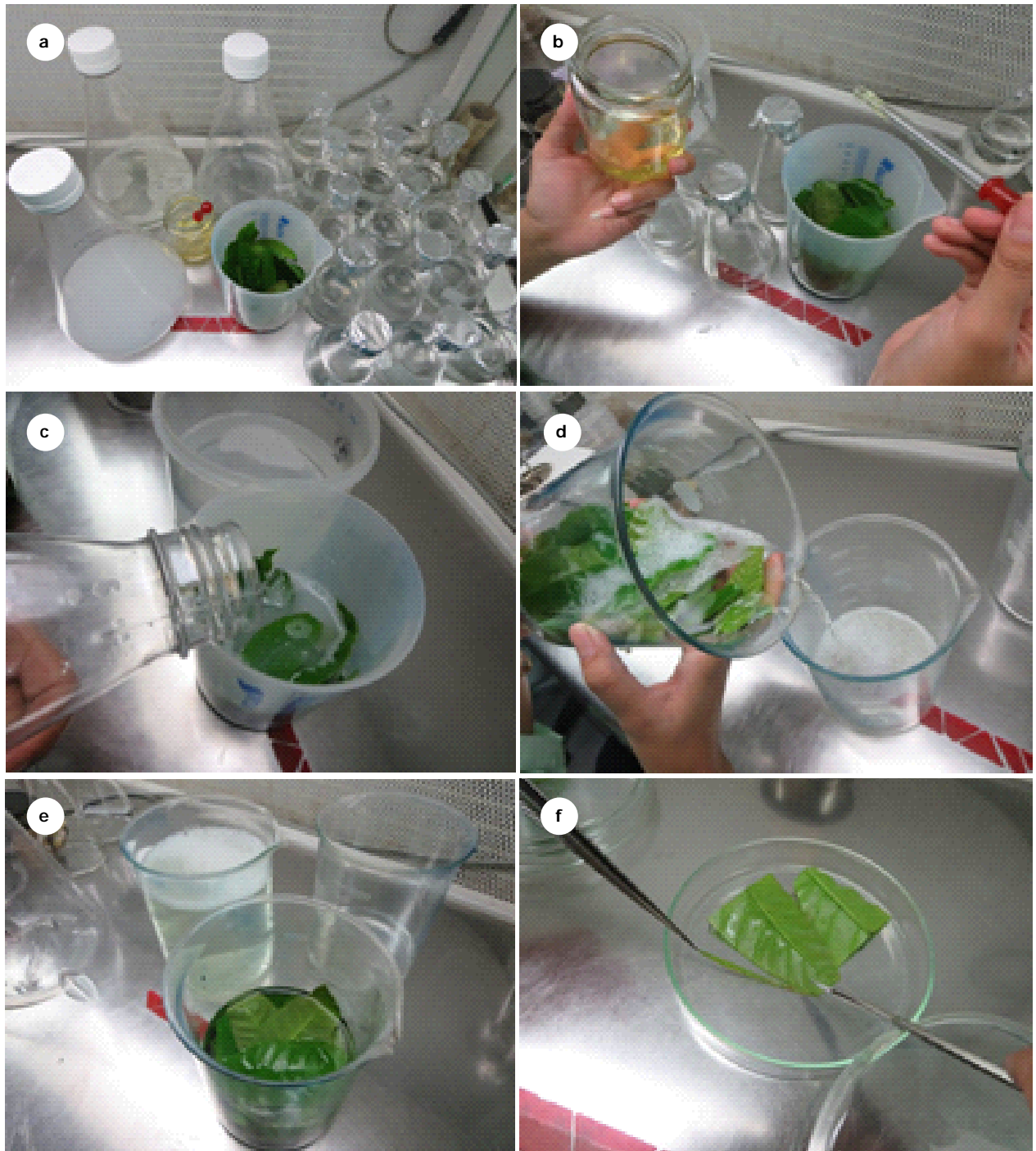
Sterilisasi bahan tanam setelah diambil dari lapang; pemotongan tepi daun sebelum pencucian (a), pencucian eksplan daun dengan air mengalir untuk menghilangkan debu dan kotoran yang berasal dari lapang (b), dan daun yang telah dicuci dikeringkan dengan kertas *tissue* (c)

- c. Sterilisasi daun dengan larutan Benlate bertujuan untuk mencegah serangan jamur baik endogen dan eksogen selama 20 menit kemudian dibilas dengan air steril sebanyak 5 kali.
- d. Sterilisasi daun dengan larutan sodium hipoklorit 30%, bertujuan untuk mencegah kontaminasi bakteri baik endogen dan eksogen selama 10-15 menit kemudian dibilas dengan air steril sebanyak 5 kali.
- e. Sterilisasi daun dengan larutan alkohol 70%, bertujuan untuk mencegah kontaminasi jamur dan bakteri selama 1 menit kemudian dibilas dengan air steril sebanyak 5 kali.

Penggunaan deterjen halus, larutan Tween-20, larutan Benlate, sodium hipoklorit 30% dan alkohol 70% merupakan teknik sterilisasi yang membedakan dengan teknik sterilisasi pada umumnya. Teknik ini sangat efektif keberhasilannya untuk sterilisasi eksplan daun dan digunakan sebagai protokol resmi dalam kultur jaringan kopi arabika. Bahan-bahan sterilisasi (Benlate, kalsium hipoklorit, alkohol) bersifat racun terhadap jaringan tanaman. Pembilasan yang berkali-kali sesudah perendaman eksplan di dalam larutan bahan sterilisasi sangat diperlukan untuk menghilangkan sisa-sisa bahan aktif yang masih menempel di permukaan bahan tanaman. Setelah semua tahapan proses sterilisasi selesai, eksplan daun diletakkan dalam *petridish* steril untuk selanjutnya dipotong dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm dan ditanam pada media kultur.

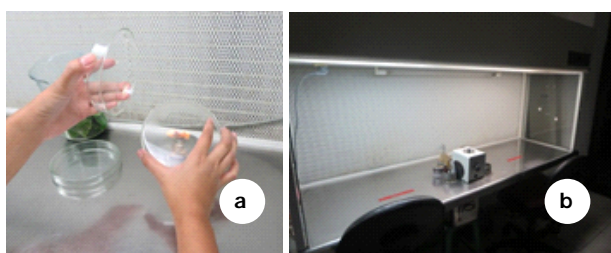
Sterilisasi peralatan dan media

Peralatan yang harus disterilisasi meliputi botol kultur, *erlenmeyer*, *beaker glass*, *petridish*, pinset, gunting, *scalpel*, *forcep*, dll. Peralatan ini dapat dibungkus dengan kertas atau *aluminium foil* terlebih dahulu sebelum dimasukkan dalam *autoclave* selama 1 jam. Suhu yang digunakan untuk sterilisasi adalah 121°C karena pada suhu tinggi tersebut mikroba akan mati pada tekanan 17,5 psi (*pounds per square inch*). Perhitungan waktu sterilisasi dimulai setelah tekanan yang diinginkan tercapai. Alat seperti pinset dan gunting



Sterilisasi bahan tanam di *laminar air flow cabinet*; persiapan bahan-bahan sterilisasi (a), sterilisasi dengan menggunakan larutan Tween-20 (b), sterilisasi dengan menggunakan larutan Benlate (c), sterilisasi dengan menggunakan larutan kalsium hipoklorit (d), sterilisasi dengan menggunakan larutan alkohol (e), dan daun steril siap dipotong (f)

dapat juga disterilkan dengan pembakaran atau dengan pemanasan, namun pisau (*blade*) dapat menjadi tumpul bila dipanaskan dalam suhu tinggi²⁾. Oleh karena itu, cara sterilisasi pisau dilakukan dengan pencelupan ke dalam alkohol atau larutan kaporit. Sterilisasi media kultur dimasukkan ke dalam botol kultur atau *erlenmeyer* dalam *autoclave* dengan suhu 121°C dan tekanan 17,5 psi. Setelah itu peralatan yang telah disterilasi diletakkan di dalam *laminar air flow cabinet* sebelum digunakan. Sebelum alat-alat kultur digunakan dalam *laminar air flow cabinet*, alat-alat tersebut disterilkan terlebih dahulu dengan cara disemprot larutan alkohol 70%. Dengan demikian peralatan kultur siap untuk digunakan.



Sterilisasi alat dan media; sterilisasi *petridish* dengan menggunakan bunsen (lampu spiritus) (a), *laminar air flow cabinet* yang telah steril dan siap digunakan untuk kegiatan kultur (b), peralatan kultur disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* (c)

Sterilisasi ruangan (lingkungan kerja)

Sterilisasi *laminar air flow cabinet* dilakukan dengan menyemprot bagian dalam *laminar air flow cabinet* dengan alkohol 70%. Lampu ultra violet dimatikan sebelum meletakkan eksplan daun yang telah steril dalam *laminar air flow cabinet*. Tangan dicuci bersih dengan sabun dan disemprot dengan alkohol 70% sebelum melakukan pekerjaan dalam *laminar air flow cabinet*. Sebaiknya berhati-hati jika ingin menyalakan bunsen dan jauhkan dari

alkohol. Ruang kerja dalam *laminar air flow cabinet* diatur sedemikian rapi dan diusahakan tidak banyak bahan dan peralatan dalam *laminar air flow cabinet* karena akan mengundang kontaminasi jamur. Bahan dan peralatan dimasukkan seperlunya sesuai kebutuhan dalam *laminar air flow cabinet*. Sebaiknya menghindari banyak gerakan tangan dalam laminar. Jika ada eksplan daun jatuh ke permukaan *laminar air flow cabinet* sebaiknya dibuang karena dianggap kontaminasi. Setelah proses transfer eksplan selesai, *laminar air flow cabinet* disemprot dengan alkohol 70%, lampu dan *blower laminar air flow cabinet* dimatikan kemudian ditutup. Teknisi yang melakukan perbanyakan Somatik Embriogenesis juga harus steril dengan menjaga kebersihan tangan dengan menggunakan etanol yang disemprotkan secara merata pada tangan dan peralatan yang digunakan, memakai penutup kepala dan memakai masker penutup muka serta menggunakan jas laboratorium yang bersih.

Penutup

Penyebab munculnya kontaminasi dalam perbanyakan bibit kopi arabika melalui Somatik Embriogenesis adalah spora jamur dan bakteri yang bisa berasal dari pakaian, kulit, rambut, nafas, jaringan tanaman, peralatan, bagian luar wadah kultur, permukaan tempat kerja, dll. Dengan teknik sterilisasi eksplan daun kopi arabika, sterilisasi peralatan dan media tanam yang akan digunakan serta sterilisasi lingkungan kerja yang efektif maka akan memperkecil persentase munculnya kontaminasi jamur dan bakteri.

Sumber Pustaka

- ¹⁾Gunawan, L.W. (1992). *Teknik Kultur Jaringan*. Bogor, Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. 245p.
- ²⁾Edi, S. (2007). *Penuntun Praktikum Kultur Jaringan Tanaman*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Medan, Medan.