

Artikel

STERILISASI PERALATAN DAN MEDIA KULTUR JARINGAN

Sri Wulandari¹, Yonita Sholihatun Nisa¹, Taryono², Siwi Indarti², dan Rr. Rahmi Sri Sayekti^{1*}

^{1*}Pusat Inovasi Agroteknologi,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta,
Indonesia

²Fakultas Pertanian,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta,
Indonesia

*Korespondensi Email:
rahmi.sri.s@ugm.ac.id

ABSTRACT

Plant tissue culture is a technology used to propagate plants under controlled and aseptic environmental conditions. One of the obstacles in tissue culture activities is the presence of bacterial and fungal contamination. Equipment and growing media that are used for tissue culture can be the source of contamination. The method that can be used to reduce contamination is using sterilization. Sterilization is used to kill or eliminate microorganisms so that the equipment and media are free from contaminants. Equipment sterilization can be done through several methods such as wet sterilization and dry sterilization. Wet sterilization is carried out using an autoclave, while dry sterilization can be carried out using an oven, fire, and glass bead sterilizer. Media sterilization is generally carried out using an autoclave or membrane filter.

Keyword: plant tissue culture, source of contaminant, sterilization, equipment, culture media

PENDAHULUAN

Kultur jaringan tanaman merupakan teknologi perbanyak tanaman dari sel, jaringan, maupun organ tanaman pada media padat atau cair dalam kondisi aseptik. Keseluruhan tanaman dapat diregenerasi dari jaringan kecil atau sel tanaman pada media kultur yang sesuai di bawah kondisi lingkungan yang terkontrol (Gaikwad *et al.*, 2017). Selain perbanyak tanaman, kultur jaringan juga dapat digunakan untuk menghasilkan haploid ganda, kriopreservasi, memperbanyak tanaman varietas baru, melestarikan tanaman langka dan terancam punah maupun tanaman yang sulit diperbanyak, serta untuk menghasilkan metabolit sekunder dan tanaman transgenik. Kelebihan utama dari teknologi kultur jaringan yaitu dapat menghasilkan bahan tanam dengan kualitas tinggi dan seragam. Kegiatan ini juga dapat dilakukan sepanjang tahun dalam kondisi bebas penyakit di mana pun tidak tergantung pada musim maupun cuaca (Jain, 2016).

Jaringan tanaman atau kultur sel membutuhkan berbagai kombinasi nutrisi, mineral, zat pertumbuhan

tanaman, vitamin dan gula sebagai sumber karbon. Namun, media kultur ini juga sesuai untuk pertumbuhan bakteri dan jamur secara cepat. Mikroorganisme yang menyerang jaringan tanaman atau kultur sel pada umumnya tumbuh dengan cepat, sehingga akan menghabiskan nutrisi dan menghasilkan racun yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan mematikan jaringan tanaman (Misra dan Misra, 2012).

Kontaminasi oleh bakteri dan jamur merupakan masalah yang sering menyerang kultur jaringan tanaman. Sumber kontaminasi dapat berasal dari peralatan yang terbuat dari kaca maupun plastik, media kultur, peralatan yang digunakan untuk memindahkan eksplan ke media, bahan tanam yang dipakai, serta ruang penanaman dan pertumbuhan eksplan (Bhojwani dan Dantu, 2013). Persiapan dan pemeliharaan sistem kultur jaringan memerlukan sterilisasi media kultur, wadah kultur, dan sterilisasi permukaan benih atau jaringan tanaman yang dikultur, serta sterilisasi semua peralatan yang digunakan untuk kegiatan kultur jaringan. Spora jamur atau sel bakteri yang bersentuhan dengan media pertumbuhan akan

mengontaminasi eksplan secara cepat. Untuk mencegah terjadinya kontaminasi perlu dilakukan sterilisasi peralatan. Sterilisasi berguna untuk membunuh dan membersihkan semua bentuk mikrobial hidup di peralatan dan bahan tanam yang digunakan (Misra dan Misra, 2012).

STERILISASI PERALATAN

A. Metode Sterilisasi Basah (*Steam Sterilization Method*)

Metode sterilisasi basah dilakukan menggunakan autoklaf yang dioperasikan dengan uap air di bawah tekanan (Misra dan Misra, 2012). Metode ini digunakan terutama untuk sterilisasi media, cairan dan peralatan laboratorium. Peralatan laboratorium yang dapat disterilisasi menggunakan metode ini adalah sebagai berikut (Bhojwani dan Dantu, 2013):

1. Peralatan yang terbuat dari plastik berkualitas baik seperti *polypropylene*, *polymethylpentene*, *polyallomer*, Tefzel, *polytetrafluoroethylene* (PTFE), dan Teflon FEP.
2. Peralatan yang terbuat dari kaca seperti botol kultur, gelas beker, dan pipet.

Suhu dan tekanan standar yang dibutuhkan pada proses sterilisasi menggunakan autoklaf dilakukan pada suhu tinggi untuk periode waktu yang singkat lebih banyak disukai dibandingkan dengan suhu yang lebih rendah untuk waktu yang lebih lama. Beberapa suhu atau tekanan standar yang digunakan adalah 115 °C/10 psi, 121 °C/ 15 psi, dan 132 °C/27psi. (psi = pon per inci persegi). Akan tetapi, pada umumnya suhu dan tekanan yang digunakan adalah 121°C/ 15 psi (Gupta dan Shukshith, 2016). Pengaturan waktu yang biasa digunakan dengan metode sterilisasi basah ini adalah 10 - 15 menit. Kondisi tersebut sangat efektif untuk membunuh bakteri dan spora jamur (Ikenganyia, et al., 2017). Hal yang perlu menjadi perhatian dalam proses sterilisasi ini adalah bahwa waktu sterilisasi dihitung setelah autoklaf mencapai kondisi normal yaitu pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi, bukan dimulai pada saat menekan tombol "on" (Gupta dan K.S., 2016). Selain itu, jangan meninggalkan media kultur terlalu lama di dalam autoklaf dikarenakan dapat mengakibatkan perubahan kimia pada media sehingga dapat menyebabkan pertumbuhan tanaman yang buruk (Ikenganyia, et al., 2017).

B. Metode Sterilisasi Kering (*Dry Sterilization Method*)

Oven pengering laboratorium merupakan peralatan yang digunakan dalam sterilisasi kering. Sterilisasi ini membutuhkan waktu pemaparan yang lebih lama dan suhu yang lebih tinggi dibandingkan

dengan sterilisasi dengan menggunakan metode basah. Hal ini relatif tidak efisien, tetapi akan sangat berguna ketika digunakan untuk menghilangkan air pada peralatan dan sterilisasi pada peralatan yang terbuat dari logam (Rogers, 2012). Peralatan yang terbuat dari logam apabila disterilisasi menggunakan metode sterilisasi basah akan menyebabkan peralatan tersebut mudah berkarat dan menjadi tumpul (Misra dan Misra, 2012).

Pada metode ini digunakan suhu yang sangat tinggi selama beberapa jam dengan tujuan untuk membunuh atau menghilangkan agen yang menjadi penyebab kontaminasi pada kultur jaringan (seperti spora jamur dan bakteri). Oven bekerja menggunakan proses konduksi panas dengan terlebih dahulu memanaskan permukaan bagian luar peralatan, kemudian menyerap panas dan memindahkannya ke bagian tengah alat tersebut (Alkhadim, 2018). Oven yang digunakan harus memiliki kipas yang terpasang di dalamnya dengan tujuan agar sirkulasi udara panas dapat berjalan dengan baik. Peralatan yang akan disterilisasi dianjurkan agar tidak terlalu banyak sehingga kinerja oven dapat maksimal (Bhojwani dan Dantu, 2013).

Metode sterilisasi kering biasanya digunakan pada peralatan laboratorium yang tidak dapat basah dan peralatan yang tidak akan meleleh, terbakar ataupun berubah bentuk jika terkena suhu tinggi. Peralatan yang dapat disterilisasi menggunakan metode ini adalah sebagai berikut (Ikenganyia, et al., 2017):

1. Peralatan yang terbuat dari kaca (*Glassware*) seperti cawan petri (petridish), pipet, tabung reaksi, botol kultur.
2. Peralatan yang terbuat dari logam seperti skalpel, gunting, pinset, mata pisau (blades), spatula.



Gambar 1. Sterilisasi Peralatan Menggunakan Oven (Dokumentasi Pribadi)

Periode pemanasan oven untuk sterilisasi peralatan laboratorium dilakukan sekitar satu jam hingga suhu sterilisasi yang dibutuhkan telah tercapai. Rekomendasi temperatur dan lamanya waktu oven pengering laboratorium untuk sterilisasi peralatan laboratorium adalah suhu 160°C dibutuhkan waktu 45 menit, suhu 170°C dibutuhkan waktu 18 menit, suhu 180°C dibutuhkan waktu 7,5 menit, dan suhu 190°C dibutuhkan waktu 1,5 menit (Ikenganyia, *et al.*, 2017). Peralatan yang akan disterilisasi lebih baik agar disegel terlebih dahulu menggunakan alumunium foil, disarankan agar tidak menggunakan kertas apabila suhu sterilisasi lebih dari 170°C dikarenakan kertas akan terurai pada suhu tersebut (Misra dan Misra, 2012).

C. Sterilisasi Menggunakan Api

Sterilisasi ini biasanya dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) untuk peralatan yang terbuat dari logam dengan menggunakan api bunsen. Peralatan tersebut seperti pinset dan skalpel. Sebelum dipanaskan menggunakan api bunsen, terlebih dahulu peralatan tersebut dicelupkan kedalam etanol dengan konsentrasi 70%. Etanol memiliki sifat yang mudah menguap dan mudah terbakar sehingga prosesnya melibatkan proses pembakaran yang membutuhkan kehati-hatian dan konsentrasi agar dapat meminimalisir risiko (Misra dan Misra, 2012).



Gambar 2. Sterilisasi Peralatan Menggunakan Api Bunsen (Dokumentasi Pribadi)

D. Sterilisasi Menggunakan *Glass Bead Sterilizier*

Peralatan logam selain dapat disterilisasi menggunakan api juga dapat disterilisasi dengan menggunakan *glass bead sterilizer*. Alat sterilisasi ini memiliki panas 275°C – 350°C sehingga mampu membunuh spora jamur dan bakteri yang menempel pada permukaan peralatan yang kita gunakan. Peralatan yang digunakan hanya perlu dimasukkan ke dalam manik-manik yang telah dipanaskan selama 10 – 60 detik, kemudian sebelum digunakan terlebih dahulu didinginkan (Misra dan Misra, 2012).



Gambar 3. Sterilisasi Peralatan Menggunakan *Glass Bead Sterilizer* (Dokumentasi Pribadi)

STERILISASI MEDIA

Media kultur jaringan harus disterilisasi dengan benar karena selain sebagai pendukung pertumbuhan dan perkembangan eksplan, media juga merupakan sumber munculnya kontaminasi (Bhojwani dan Dantu, 2013). Terdapat dua metode yang umum digunakan untuk sterilisasi media kultur yaitu menggunakan autoklaf dan membran filtrasi di bawah tekanan positif. Sterilisasi media menggunakan autoklaf dilakukan pada tekanan 15 psi dan suhu 121°C . Untuk cairan dengan volume 100 ml atau lebih sedikit dibutuhkan waktu autoklaf selama 15-20 menit, sedangkan untuk volume cairan yang lebih besar (2-4 liter), dibutuhkan waktu 30-40 menit dimulai ketika mencapai suhu dan tekanan yang ditentukan (Misra and Misra, 2012). Sterilisasi media dalam jumlah kecil dapat menggunakan panci presto, alat ini memiliki prinsip kerja yang sama dengan autoklaf (Bhojwani dan Dantu, 2013). Sterilisasi menggunakan filter menjadi alternatif yang dapat dipilih dikarenakan banyak protein, vitamin, asam amino, ekstrak tumbuhan, hormon, dan karbohidrat yang mudah rusak maupun nonaktif apabila dipanaskan. Porositas membran filter yang digunakan tidak boleh lebih dari 0.2 mikron (μm). Botol kultur terlebih dahulu disterilisasi menggunakan autoklaf sebelum digunakan sebagai wadah media. Pada umumnya, filter terbuat dari selulosa asetat atau selulosa nitrat dan tersedia dalam unit plastik sekali pakai yang telah disterilkan. Selama proses sterilisasi, membran filter akan menghambat semua partikel, mikroorganisme, dan virus yang berukuran lebih dari diameter pori (Misra and Misra, 2012).

KESIMPULAN

Sterilisasi merupakan kegiatan yang berguna untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada peralatan kultur jaringan, media kultur, dan bahan tanam yang digunakan. Sterilisasi peralatan dapat dilakukan dengan sterilisasi basah menggunakan autoklaf, sterilisasi kering menggunakan oven, sterilisasi api, dan sterilisasi menggunakan *glass bead sterilizer*. Sterilisasi media kultur jaringan dapat dilakukan menggunakan membran filtrasi di bawah tekanan positif dan autoklaf dengan waktu sterilisasi yang disesuaikan dengan volume cairan media.

DAFTAR PUSTAKA

- Alkhadim, S. A. S. (2018). Hot air oven for sterilization: definition and working principle. SSRN Electronic Journal, 1-7.
- Bhojwani, S.S. and P.K. Dantu. (2013). Plant Tissue Culture: And Introductory Text. Springer, India.
- Gaikwad, A.V., S.K. Singh, and R. Gilhotra. (2017). Plant tissue culture – a review. Journal of Pharmaceutical Research and Education 2(1), 217–220.
- Gupta, N.V. and Shukshith K.S. (2016). Qualification of autoclave. International Journal of PharmTech Research 9(4), 220-226.
- Ikenganya, E.E., M.A.N. Anikwe, T. E. Omeje, and J. O. Adinde. (2017). Plant tissue culture regeneration and aseptic techniques. Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology 1(3), 1-6.
- Jain, (2016). Plant Tissue Culture Lab Practices Made Easy (For Beginners). Maharaja Ranjit International E Publication, Indore.
- Misra, A.N. and M. Misra. (2012). Sterilization Techniques in Plant Tissue Culture. Fakir Mohan University, Balasore.
- Rogers, W. J. (2012). Steam and dry heat sterilization of biomaterials and medical devices. Sterilization of Biomaterials and Medical Devices, 20–55.