

## PENGGUNAAN ALKOHOL DAN SODIUM HIPOKLORIT SEBAGAI STERILAN TUNGGAL UNTUK STERILISASI EKSPLAN KELAPA SAWIT

### THE USE OF ALCOHOL AND SODIUM HYPOCHLORITE AS SINGLE STERILIZING AGENTS FOR OIL PALM EXPLANT STERILIZATION

Dian Rahma Pratiwi, Sri Wening, Erwin Nazri, dan Yurna Yenni

**Abstrak** Perbanyakkan kelapa sawit melalui teknik kultur jaringan diawali dengan proses sterilisasi eksplan. Sterilisasi merupakan tahapan yang krusial karena menentukan jumlah produksi tanaman kultur yang bebas mikrob. Konsentrasi dan durasi paparan sterilan harus ditentukan secara empiris agar diperoleh prosedur sterilisasi eksplan yang efektif namun tidak menyebabkan kematian eksplan. Penelitian ini bertujuan memperoleh protokol sterilisasi yang tepat untuk eksplan daun muda kelapa sawit menggunakan sterilan tunggal. Dua jenis sterilan yakni alkohol dan sodium hipoklorit pada konsentrasi dan durasi paparan tertentu digunakan dalam perlakuan sterilisasi. Perlakuan alkohol yang diberikan tidak menunjukkan perbedaan tingkat kontaminasi, *browning*, dan respon pertumbuhan eksplan yang signifikan melalui uji sidik ragam (ANOVA), begitupun perlakuan dengan sodium hipoklorit (NaOCl). Perlakuan terbaik ditunjukkan pada perlakuan alkohol 70% dengan durasi paparan selama 5 menit dan sodium hipoklorit 10% selama 10 menit. Perlakuan tersebut cukup efektif menekan kontaminasi eksplan dengan persentase eksplan yang mengalami *browning* paling rendah, serta respon pertumbuhan berupa pembengkakan jaringan paling baik. Alkohol dengan konsentrasi tinggi yaitu 80% dan 90% menyebabkan kematian jaringan, sedangkan penggunaan sodium hipoklorit dalam konsentrasi tinggi meningkatkan risiko eksplan *browning*. Jenis kontaminasi yang ditemukan dalam kultur

adalah bakteri dan jamur. Dominasi kontaminan bakteri ditemukan pada perlakuan alkohol, sedangkan pada perlakuan sodium hipoklorit kontaminasi didominasi oleh jamur.

**Kata kunci:** alkohol, eksplan, kelapa sawit, sodium hipoklorit, sterilisasi

**Abstract** Oil palm micropropagation through tissue culture is initiated with explants sterilization. Sterilization is a crucial stage because it determines the production rate of sterile plant cultures. Concentration and exposure time of sterilizing agents must be determined empirically to gain effective method which produces explants with low mortality. This research aimed to obtain effective protocols for unopened-leaves sterilization of oil palm using single sterilizing agents. Alcohol and sodium hypochlorite (NaOCl) at certain concentrations and duration of exposure were used as sterilization treatments. Treatments of alcohol did not show any significant differences on contamination, browning, and growth response rate based on analysis of variance (ANOVA) as well as sodium hypochlorite. The best results were shown by 70% alcohol for 5 minutes and 10% NaOCl for ten minutes. These treatments were sufficiently effective in reducing contamination with the lowest percentage of browning explants and high growth response rate. Application with higher concentration of alcohol (80% and 90%) caused death of explants, while higher concentration of sodium hypochlorite increased browning explants. The type of contamination found in culture were bacteria and fungi. Domination of bacteria was found in alcohol treatment while fungi contamination dominated in NaOCl treatment.

**Keywords:** alcohol, explants, oil palm, sodium hypochlorite, sterilization

---

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Dian Rahma Pratiwi (✉)

Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Jl. Brigjen Katamso No. 51 Medan, Indonesia

Email: dianrahmapratiwi@gmail.com

## PENDAHULUAN

Perbanyakan kelapa sawit dapat dilakukan dengan mengkulturkan sebagian organ atau jaringan melalui teknik aseptik secara *in vitro* yang disebut kultur jaringan. Pencegahan terhadap risiko kontaminasi merupakan usaha krusial yang harus dilakukan di awal penerapan teknik kultur jaringan demi menciptakan lingkungan kultur yang aseptik dan tanaman bebas mikrob. Infeksi kontaminan akan menghambat pertumbuhan eksplan bahkan berpotensi menyebabkan kegagalan untuk tumbuh. Jenis kontaminan yang umumnya ditemukan yakni bakteri dan jamur, serta mikroorganisme lain seperti virus, khamir, kapang, tungau, dan serangga penghisap getah tanaman (*thrips*) (Cobrado dan Fernandez, 2016). Di negara tropis seperti Indonesia, kontaminasi jamur paling banyak dijumpai dan menyebabkan kematian tanaman kultur jaringan (Omamor *et al.*, 2007).

Kontaminasi mikrob (bakteri dan jamur) dapat berasal dari sumber yang beragam, misalnya material tanaman yang sudah terinfeksi penyakit, teknik pengerjaan kultur jaringan yang kurang tepat, serta kondisi laboratorium yang belum memenuhi standar (Ray dan Ali, 2016; Fang dan Hsu, 2012). Kontaminasi jamur secara khusus, dapat berasal dari eksplan itu sendiri (misalnya berasal dari tanaman sakit), udara, bahkan saat kegiatan mengkulturkan berlangsung (Ankur *et al.*, 2014). Kejadian kontaminasi juga berkaitan dengan kondisi sirkulasi udara di ruangan, kebersihan meja atau dinding, termasuk kebersihan tubuh/kulit operator teknis (Odutayo *et al.*, 2007). Mikrob yang ada di udara maupun terbawa oleh eksplan dapat tumbuh dengan baik dalam media kultur tanaman. Hal tersebut dikarenakan media kultur menyediakan nutrisi yang baik tidak hanya bagi tanaman, namun juga cocok bagi pertumbuhan mikrob (Omamor *et al.*, 2007). Keberadaan mikrob yang pertumbuhannya mendominasi eksplan menyebabkan terjadinya persaingan nutrisi di dalam media, membatasi ketersediaan oksigen, serta meningkatkan kematian tanaman kultur (Orlikowska *et al.*, 2017; Nadha *et al.*, 2012). Selain itu, adanya infeksi yang tersembunyi (*latent infection*) juga dapat mempengaruhi pertumbuhan, nekrosis jaringan, hingga penurunan proliferasi tunas dan akar (Kane *et al.*, 2011; Saad dan Elshahed, 2012; Klayraung *et al.*, 2017).

Kultur jaringan kelapa sawit masih memiliki peluang yang besar untuk memproduksi tanaman

komersial secara massal dengan sifat yang seragam dan identik dengan induknya (Pádua *et al.*, 2018). Namun untuk mengarah ke perbanyakan komersial, kultur jaringan kelapa sawit masih menemui permasalahan terkait kontaminasi eksplan yang relatif tinggi. Menurut Eziashi *et al.*, (2014), tantangan utama dari kultur jaringan kelapa sawit adalah adanya kontaminasi bakteri endofit yang tidak dapat dijangkau oleh desinfektan, sehingga penambahan antibiotik dapat digunakan sebagai upaya alternatif menekan kontaminasi. Namun, hingga saat ini penggunaan antibiotik untuk mengendalikan kontaminasi bakteri endofitik masih terus dipertimbangkan. Hal ini terkait sifat bakteristatik (menghambat pertumbuhan bakteri) dari antibiotik yang jika aplikasinya dihentikan maka sifat tersebut akan hilang dan pertumbuhan bakteri muncul kembali. Selain itu, penggunaan antibiotik berisiko meningkatkan toksisitas yang menyebabkan eksplan *browning* dan mati. Jika digunakan dalam durasi yang panjang, antibiotik menyebabkan resistensi strain bakteri bahkan menyebabkan abnormalitas tanaman akibat terjadinya perubahan genetik di tingkat organel (gen-gen yang ada di sitoplasma) (Abdi *et al.*, 2008).

Terjadinya kontaminasi dalam pengerjaan kultur jaringan menimbulkan kerugian sebesar 3-15% di banyak laboratorium (Abass, 2013). Eziashi *et al.* (2014) menambahkan bahwa tingkat kontaminasi untuk eksplan daun muda kelapa sawit cukup tinggi berkisar 6-27%. Oleh karena tingginya tingkat kontaminasi tersebut, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memperoleh protokol sterilisasi yang tepat untuk eksplan daun muda kelapa sawit menggunakan sterilan tunggal yang mudah didapat, murah, serta rendah risiko mencemari lingkungan guna menekan kontaminasi dan mendapatkan bahan kultur yang steril.

## BAHAN DAN METODE

### Pengambilan Sampel dan Persiapan Eksplan

Tanaman kelapa sawit yang digunakan dalam penelitian adalah jenis Dura dan Tenera. Eksplan yang digunakan adalah daun muda yang belum membuka (umbut) yang diambil dari pucuk pohon kelapa sawit. Daun yang digunakan sebagai sampel adalah daun yang berada pada posisi -4, -5, -6, -7, dan -8. Daun selanjutnya dipotong menjadi berukuran 1 cm x 1 cm dalam kondisi suhu

ruang dan dipisahkan tiap lembarnya sebelum direndam dalam larutan sterilisasi (Gambar 1). Penelitian sterilisasi ini dilaksanakan pada Mei 2019 hingga Juli 2019 di Laboratorium Kultur Jaringan Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS), yang berlokasi di Kabupaten Simalungun, Sumatera Utara.

### Perlakuan Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan menggunakan alkohol (percobaan 1) dan sodium hipoklorit/NaOCl (percobaan 2) dalam berbagai konsentrasi dan durasi paparan yang berbeda, dilanjutkan dengan perendaman eksplan dalam larutan air gula steril. Larutan gula ini digunakan sebagai larutan pembilas sekaligus osmotikum. Percobaan 1 dengan alkohol menggunakan eksplan dari pohon Dura, sedangkan eksplan pada percobaan 2 dengan sodium hipoklorit menggunakan pohon Tenera, namun perbedaan genetik akibat penggunaan jenis pohon yang berbeda diabaikan dalam penelitian ini. Kontrol percobaan dilakukan dengan menggunakan larutan sodium hipoklorit 10% selama 20 menit menurut hasil optimasi sterilisasi eksplan sebelumnya di laboratorium kultur jaringan PPKS. Eksplan yang sudah steril selanjutnya ditanam pada media inisiasi kalus, yakni media Murashige and Skoog (MS) yang telah dimodifikasi dan ditambahkan zat pengatur tumbuh. Perlakuan sterilisasi yang diterapkan dapat dilihat pada Tabel 1.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan acak kelompok satu faktor dengan lima ulangan. Faktor dalam penelitian ini adalah perlakuan sterilan yang tercantum pada Tabel 1 dan posisi daun sebagai kelompok. Setiap perlakuan terdiri dari 10 tabung yang berisi satu eksplan sehingga total eksplan per perlakuan berjumlah 50, dan total keseluruhan eksplan yang digunakan berjumlah 350 untuk satu percobaan. Variabel yang diamati dalam penelitian antara lain jenis kontaminasi, persentase kontaminasi, eksplan yang menunjukkan respon pertumbuhan (berupa pembengkakan jaringan), dan eksplan mengalami pencokelatan (*browning*). Data respon diperoleh dengan melakukan skoring. Pengamatan munculnya kontaminasi berlangsung selama 30 hari dengan interval waktu pengamatan setiap 3 hari. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan R Studio versi 1.2.1335 melalui uji ANOVA, apabila perlakuan berbeda signifikan diuji lanjut menggunakan uji Duncan untuk melihat pengaruh perlakuan yang diberikan. Uji Duncan dilakukan dengan bantuan perangkat lunak R (RStudio Team, 2018).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses sterilisasi umbut kelapa sawit di dalam laminar diawali dengan menentukan posisi daun yang dipilih sebagai eksplan berdasarkan filotaksisnya, dilanjutkan dengan pemotongan dan

Tabel 1. Kombinasi perlakuan untuk sterilisasi eksplan kelapa sawit  
 Table 1. Treatment combination for explants sterilizing of oil palm

Kode	Perlakuan	Percobaan
A1T1	Alkohol 70% 5 menit, air gula 3%	1
A1T2	Alkohol 70% 10 menit, air gula 3%	1
A2T1	Alkohol 80% 5 menit, air gula 3%	1
A2T2	Alkohol 80% 10 menit, air gula 3%	1
A3T1	Alkohol 90% 5 menit, air gula 3%	1
A3T2	Alkohol 90%, 10 menit, air gula 3%	1
N1T1	NaOCl 10%, 5 menit, air gula 3%	2
N1T2	NaOCl 10% 10 menit, air gula 3%	2
N2T1	NaOCl 20% 5 menit, air gula 3%	2
N2T2	NaOCl 20% 10 menit, air gula 3%	2
N3T1	NaOCl 30% 5 menit, air gula 3%	2
N3T2	NaOCl 30% 10 menit, air gula 3%	2
K	NaOCl 10% 20 menit, air gula 3% (sebagai kontrol)	1 dan 2

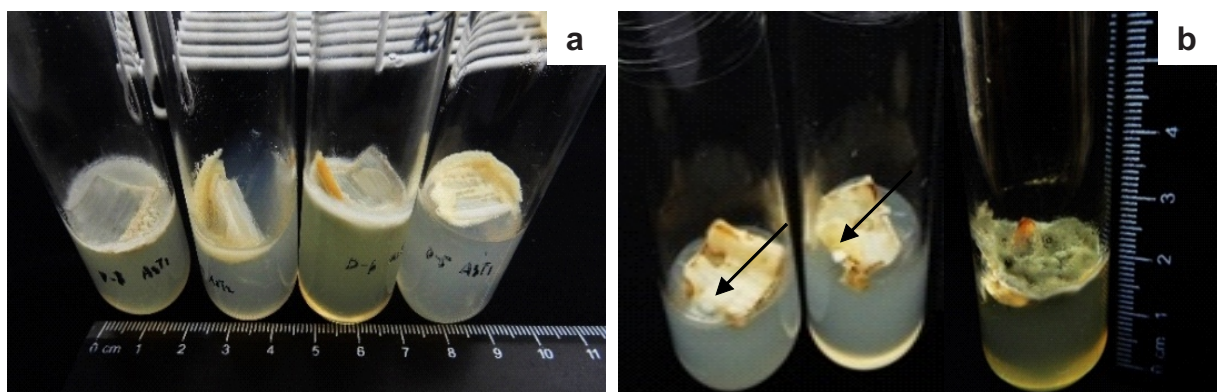


Gambar 1. Proses persiapan dan sterilisasi eksplan. a) sampel umbut kelapa sawit, b) filotaksis kelapa sawit, c) pelepasan pelepah bagian luar, d) pemotongan eksplan, e) eksplan berukuran 1 cm, dan f) perendaman eksplan dalam larutan sterilan.

Figure 1. Preparation and explants sterilization process. a) unopened-leaves sample, b) oil palm phyllotaxis, c) removing outer portion of the sample, d) cutting of the samples, e) explants with 1 cm in size, and f) soaking explants in sterilizing solution.

perendaman dalam larutan sterilisasi (Gambar 1). Kemunculan mikroba terlihat sejak hari kelima kultur dan masih ditemukan hingga 30 hari setelah penanaman. Jenis kontaminasi yang muncul adalah jamur dan bakteri, dengan jumlah bakteri mendominasi pada percobaan alkohol dan jamur mendominasi pada percobaan NaOCl (Gambar 2 dan Tabel 2). Jenis kontaminasi yang muncul kemudian diamati morfologinya, dan diperoleh

hasil bakteri yang tumbuh memiliki morfologi koloni mengkilat dan mengkilat berserabut, dengan warna yang bervariasi seperti putih keruh, kuning keemasan, dan kuning keruh (Gambar 2a). Jamur yang muncul memiliki miselium berwarna putih dan hijau (Gambar 2b). Morfologi kontaminan yang ditemukan dalam penelitian ini serupa dengan laporan yang disampaikan oleh Eziashi *et al.* (2014).



Gambar 2. Kontaminasi mikroba pada kultur kelapa sawit. a) bakteri, dan b) jamur. Tanda panah menunjukkan kontaminasi jamur pada eksplan.

Figure 2. Microbes contamination in oil palm culture. a) bacteria, and b) fungi. Arrows showed fungi contamination on explants.

Tabel 2. Morfologi mikrob yang tumbuh pada eksplan kelapa sawit  
 Table 2. *Microbes morphology that grew on oil palm explants*

No	Perlakuan	Jenis kontaminan	Morfologi koloni	Warna koloni/miselium
1	A2T1	Bakteri	Mengkilat serabut	Putih keruh
2	A2T2	Bakteri	Mengkilat	Kuning keemasan
3	A2T2	Bakteri	Mengkilat	Kuning keruh
4	A3T1	Bakteri	Mengkilat	Kuning keemasan
5	A3T1	Bakteri	Mengkilat serabut	Putih keruh
6	A3T2	Bakteri	Mengkilat	Putih keruh
7	K	Bakteri	Mengkilat	Putih keruh
8	K	Bakteri	Mengkilat	Putih keruh
9	K	Bakteri	Mengkilat	Kuning keemasan
10	K	Jamur	-	Putih
11	K	Jamur	-	Putih
12	K	Jamur	-	Hijau
13	N1T1	Jamur	-	Putih
14	N2T1	Jamur	-	Putih
15	N2T2	Jamur	-	Putih

Perlakuan sterilisasi yang terdiri dari kombinasi konsentrasi alkohol dan durasi paparan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kontrol terhadap variabel tingkat kontaminasi, eksplan *browning*, dan respon pertumbuhan, begitu pula dengan perlakuan NaOCl (Tabel 3 dan 4). Faktor kelompok yang diuji yaitu posisi daun juga tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (data tidak ditampilkan). Hal ini menunjukkan bahwa kontaminasi eksplan tidak berkelompok pada posisi daun tertentu melainkan menyebar, yang artinya daun pada posisi -4 hingga -8 memiliki potensi kontaminasi yang sama. Pada percobaan alkohol ditemukan kontaminasi dalam persentase rendah pada empat perlakuan A2T1, A2T2, A3T1, dan A3T2 termasuk kontrol (K), sedangkan pada percobaan NaOCl kontaminasi ditemukan pada tiga perlakuan yaitu N1T1, N2T1, dan N2T2. Pada perlakuan lainnya tidak ditemukan eksplan yang terkontaminasi.

Kontaminasi eksplan ditemukan lebih banyak pada perlakuan dengan pemberian alkohol konsentrasi tinggi (80% dan 90%). Hal ini diduga karena proses penguapan alkohol menjadi lebih cepat seiring tingginya konsentrasi yang digunakan sehingga efektivitasnya menurun.

Alkohol pada konsentrasi tinggi tidak efektif digunakan untuk mengendalikan kontaminasi. Hal ini dikarenakan alkohol pada konsentrasi tinggi (di atas 70%) menyebabkan koagulasi dinding sel bakteri yang berlebihan sehingga mencegah disinfektan masuk ke dalam sel. Pada konsentrasi 70%, alkohol justru memiliki aktivitas antimikrob melalui mekanisme denaturasi dan koagulasi protein bakteri (McDonnell, 2017). Kandungan 30% air dalam larutan alkohol berfungsi memperpanjang waktu kontak mikroorganisme dengan alkohol sehingga memperlambat penguapan dan meningkatkan efek sterilisasi (Yoo, 2018).

Lebih jauh lagi, penggunaan sterilan dalam konsentrasi tinggi membuat lapisan permukaan eksplan menjadi hancur (Pierik, 1987). Efek merusak dari konsentrasi sterilan yang tinggi ini memicu pertumbuhan mikrob. Selain konsentrasi, waktu sterilisasi yang lama juga dapat berdampak mematikan jaringan eksplan dan hal ini pun berpotensi mendukung pertumbuhan mikrob (Onwubiko *et al.*, 2013). Kondisi ini berpotensi meningkatkan risiko kontaminasi saat penanaman. Kerusakan jaringan eksplan meningkatkan ketersediaan nutrisi untuk sel-sel bakteri karena terjadinya degradasi

Tabel 3. Analisis sidik ragam untuk variabel kontaminasi, *browning*, dan respon pertumbuhan dalam perlakuan alkohol

Table 3. Analysis of variance for contamination, *browning*, and growth response variable in alcohol treatment

Parameter	Derajat bebas (Df)	Jumlah kuadrat (Sum Sq)	Rerata kuadrat (Mean Sq)	F hitung	p-value
Kontaminasi	6	0,003	0,003	2,008	0,166
<i>Browning</i>	6	0,003	0,003	2,872	0,099
Respon pertumbuhan	6	0,105	0,105	2,168	0,151

Tabel 4. Analisis sidik ragam pada variabel kontaminasi, *browning*, dan respon pertumbuhan dalam perlakuan sodium hipoklorit

Table 4. Analysis of variance for contamination, *browning*, and growth response variable in sodium hypochlorite treatment

Parameter	Derajat bebas (Df)	Jumlah kuadrat (Sum Sq)	Rerata kuadrat (Mean Sq)	F hitung	p-value
Kontaminasi	6	1,951	1,951	3,337	0,077
<i>Browning</i>	6	0,05	0,047	0,036	0,850
Respon pertumbuhan	6	0,000	0,000	2,420	0,130

enzimatik dinding sel tanaman oleh patogen dan menyebabkan lingkungan sel menjadi lebih encer akibat bocornya cairan sitoplasma. Pada tanaman selada diketahui bahwa daun yang jaringannya rusak secara mekanis terinfeksi bakteri *Escherichia coli* O157:H7 dengan populasi 4-11 kali lipat lebih tinggi dibandingkan infeksi pada daun yang utuh (Brandl 2008).

Penggunaan sterilan tunggal pada eksplan kelapa sawit sebelumnya dilaporkan oleh Eziashi *et al.*, (2014) yaitu alkohol 70% selama 10 menit dan NaOCl 50% selama 10 menit, namun efektivitasnya rendah dibandingkan hasil penelitian ini karena eksplan yang terkontaminasi sebesar 27% dengan alkohol dan 7,5% dengan NaOCl. Berdasarkan hasil penelitian ini, ditemukan dua perlakuan alternatif terbaik untuk menekan kontaminasi eksplan daun muda kelapa sawit yaitu A1T1 (alkohol 70% selama 5 menit) dan N1T2 (NaOCl 10% selama 10 menit) meskipun tidak berbeda nyata secara statistik (Tabel 5).

Hasil yang tidak berbeda nyata ini diduga karena kemunculan kontaminasi yang relatif kecil pada semua perlakuan hingga akhir pengamatan. Faktor lainnya dapat disebabkan rentang konsentrasi perlakuan yang digunakan kurang besar sehingga perbedaan pengaruhnya juga tidak begitu jauh.

Meskipun begitu, hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan perbaikan metode sterilisasi eksplan kelapa sawit sebelumnya dengan waktu sterilisasi lebih cepat yaitu 5-10 menit. Pada penerapan metode sterilisasi sebelumnya (Kontrol/K) untuk skala produksi di laboratorium kultur jaringan PPKS, waktu perendaman yang lama yakni 20 menit menyebabkan kemunculan eksplan *browning* menjadi lebih cepat (data tidak ditampilkan). Saat penanaman untuk skala produksi, eksplan yang ditanam hampir 6 kali lebih banyak (2000 eksplan) dibandingkan saat penelitian (350 eksplan), sehingga ketepatan perendaman yang diharuskan

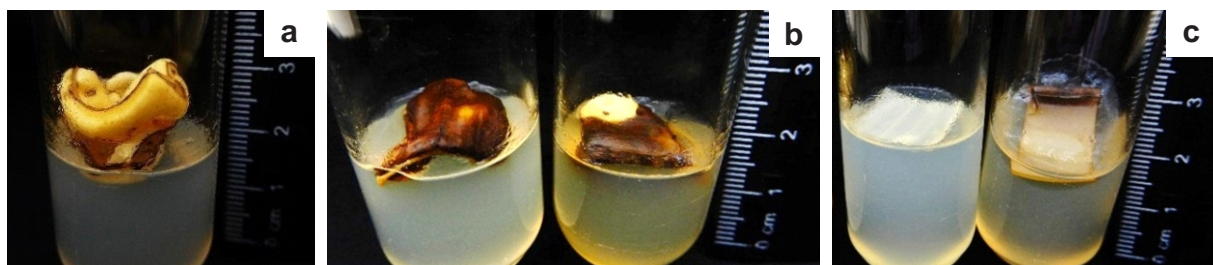
berlangsung selama 20 menit menjadi hal yang sulit dipastikan. Akibatnya, eksplan sangat mungkin direndam dalam larutan sterilisasi dengan waktu yang relatif lebih lama. Oleh sebab itu, pemangkasan waktu rendaman menjadi lebih singkat akan memperkecil risiko eksplan *browning* namun masih efektif dalam menekan kontaminasi. Waktu perendaman yang singkat memiliki keuntungan menurunkan risiko eksplan menjadi rapuh dan risiko peluruhan pigmen dalam jaringan, mengingat tingkat toksisitas alkohol cukup tinggi dan sodium hipoklorit memiliki efek sebagai pemutih (Onwubiko *et al.*, 2013).

Alkohol memiliki spektrum aktivitas antimikrob yang luas. Alkohol dapat digunakan untuk melawan infeksi bakteri, virus, dan jamur, namun tidak efektif untuk membunuh spora. Alkohol mampu mencegah pembentukan spora dan mencegah spora berkecambah, namun efek ini tidak bertahan lama (*reversible*). Sebagai antimikrob, gugus hidroksil (-OH) pada alkohol bertugas mengikat protein mikrob melalui ikatan hidrogen lalu merusak struktur dan fungsi protein serta membran sel (Yoo 2018). Lebih jauh lagi, alkohol bekerja dalam mengganggu proses metabolisme dan melisiskan sel mikrob (McDonnell dan Russell, 1999). Efektivitas antimikrob alkohol rendah pada konsentrasi di bawah 50%, namun efektivitasnya meningkat pada konsentrasi 60% hingga 90% (Eziashi *et al.*, 2014).

Ion klorin dalam sodium hipoklorit bekerja melalui mekanisme oksidasi dalam proses sterilisasi. Mekanisme bakterisida sodium hipoklorit bekerja ketika garam NaOCl membentuk HOCl saat dilarutkan dalam air (Nakagarwara *et al.*, 1998). Ion klorin memutus ikatan kimiawi kromofor (bagian pigmen yang menghasilkan warna) jaringan menjadikannya tidak reaktif

terhadap cahaya (Benzoni dan Hatcher, 2019). Hal tersebut yang menyebabkan perendaman eksplan dalam waktu lama harus dihindari. Dalam menekan pertumbuhan mikrob, ion klorin bertindak sebagai biosida (substansi beracun), mekanisme oksidasi turut menstimulasi inaktivasi enzim serta degradasi asam lemak dan lipid (Pais *et al.*, 2016).

Pertumbuhan awal eksplan dalam media kultur mulai terlihat pada hari kelima kultur yang ditunjukkan adanya pembengkakan jaringan (Gambar 3a), begitu pula eksplan yang menunjukkan pencoklatan/*browning* serta mati (Gambar 3b dan 3c). Pembengkakan jaringan eksplan ini merupakan indikator adanya pertumbuhan, setelah jaringan membengkak biasanya akan diikuti oleh pembentukan kalus pada daerah yang terluka (Junairiah *et al.* 2017). Eksplan yang menunjukkan respon pertumbuhan berupa pembengkakan jaringan ditemukan pada semua perlakuan, kecuali perlakuan alkohol konsentrasi tinggi yaitu 80% dan 90%. Hasil yang baik untuk respon pertumbuhan ditunjukkan pada perlakuan alkohol 70% yakni 50% (A1T2) dan 100% (A1T1) serta semua perlakuan sodium hipoklorit yang persentase respon pertumbuhannya 100% termasuk kontrol (Tabel 5). Fenomena tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi alkohol yang diberikan semakin tinggi tingkat toksisitasnya terhadap jaringan. Peningkatan konsentrasi maupun durasi paparan sterilan dapat menurunkan kontaminasi namun konsekuensinya dapat meningkatkan kematian bahan kultur (Omamor *et al.*, 2007). Hal ini dapat dimengerti karena alkohol merupakan sterilan yang kuat dan juga memiliki toksisitas yang tinggi terhadap tanaman (Oyebanji *et al.*, 2009). Efek toksisitas ini dapat dikendalikan dengan menentukan konsentrasi dan durasi paparan sterilan secara empiris.



Gambar 3. Kondisi eksplan pada kultur kelapa sawit. a) eksplan menunjukkan respon pertumbuhan berupa pembengkakan jaringan, b) eksplan mengalami pencoklatan/*browning*, dan c) eksplan mati.

Figure 3. Explant conditions in oil palm culture. a) explants showing growth response in the form of tissue swelling, b) explants experiencing browning, and c) explants died.

Tabel 5. Rata-rata persentase eksplan terhadap tiga variabel pengamatan

Table 5. The average percentage of explants for the three observational variables

Perlakuan	Rata rata persentase eksplan (%)		
	Kontaminasi	<i>Browning</i>	Respon Tumbuh
A1T1	0	0	100
A1T2	0	0	50
A2T1	4	4	0
A2T2	2	0	0
A3T1	6	0	0
A3T2	4	0	0
K	4	8	90
N1T1	4	4	100
N1T2	0	0	100
N2T1	0	2	100
N2T2	2	0	100
N3T1	0	6	100
N3T2	0	2	100
K	0	0	100

Adanya eksplan yang *browning* mulai nampak pada kultur hari ke 21 hingga pengamatan terakhir di hari ke 30. Eksplan yang *browning* ditemukan pada perlakuan alkohol yaitu A2T1 sebesar 4%, serta perlakuan NaOCl yaitu N1T1, N2T1, N3T1, dan N3T2 dengan persentase 2-4%, termasuk kontrol (K) sebesar 8%. Hasil ini menunjukkan bahwa sodium hipoklorit memiliki risiko pencokelatan eksplan kelapa sawit lebih tinggi dibandingkan alkohol, meskipun digunakan dalam konsentrasi dan durasi paparan yang rendah. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Eziashi *et al.*, (2014) bahwa penggunaan sodium hipoklorit untuk sterilisasi eksplan lebih berisiko menyebabkan eksplan *browning* dibandingkan alkohol.

Pencokelatan jaringan (*browning*) ini disebabkan sekresi senyawa fenolik. Ketika sel rusak, isi sitoplasma dan vakuola bercampur dan senyawa fenolik mudah teroksidasi oleh udara. Senyawa fenolik teroksidasi dapat menghambat aktivitas enzim dan mengakibatkan penggelapan media kultur dan pencokelatan eksplan yang selanjutnya menyebabkan kematian eksplan (Laukkanen *et al.*, 1999). Konsentrasi fenolik sering dipengaruhi oleh beberapa faktor baik

internal maupun eksternal. Cahaya diketahui mampu menginduksi sintesis flavonol (jenis senyawa fenolik) dalam kloroplas dan sitoplasma (Sun *et al.*, 2017). Beberapa nutrisi, terutama karbohidrat turut mempengaruhi komposisi fenolik (Ibrahim *et al.*, 2011). Beberapa faktor cekaman seperti kekeringan, air, radiasi, dan infeksi patogen dari permukaan yang terluka mempengaruhi konsentrasi fenolik dalam tanaman (Caliskan *et al.*, 2017). Risiko pencokelatan jaringan dapat dikurangi dengan melakukan subkultur tepat waktu serta menambahkan beberapa senyawa yang bertindak sebagai antioksidan seperti arang aktif, asam sitrat, asam askorbat, perak nitrat, sistein, dan PVT (polivinil pirolidon) pada media kultur (Zamir dan Abdur-Rab, 2014; Kasnak, 2020; Modeste *et al.*, 2017).

## KESIMPULAN

Sterilisasi dengan alkohol dan sodium hipoklorit menunjukkan efektivitas yang baik dalam menekan kontaminasi eksplan. Perlakuan yang diberikan tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap persentase kontaminasi



mikrob, respon tumbuh berupa pembengkakan jaringan, serta eksplan yang mengalami pencokelatan. Kontaminan yang ditemukan pada kultur berupa jamur dan bakteri, yang didominasi oleh bakteri pada perlakuan alkohol dan dominasi jamur pada perlakuan sodium hipoklorit. Dari hasil penelitian ini, diperoleh metode sterilisasi alternatif yang cukup efektif untuk eksplan daun muda/umbut kelapa sawit yaitu menggunakan sterilan tunggal berupa alkohol 70% selama 5 menit dan sodium hipoklorit 10% selama 10 menit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abass, M.H. 2013. Microbial contaminants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in Iraqi tissue culture laboratories. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 25(1): 875-882.
- Abdi, Gholamreza, Hassan Salehi, and Morteza Khosh-Khui. 2008. "Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in Valerian (*Valeriana officinalis* L.) Tissue Culture." *Acta Physiologiae Plantarum* 30 (5): 709–14.
- Ankur V., B. Meena, and N.S.K. Harsh. 2014. Identification and bioassay of fungal contaminants observed during *in vitro* propagation of *Saracaasoca* (Roxb.) De Wilde. *Biotechnology International*. 7(2): 35-42.
- Benzoni T, and Hatcher JD. 2019. Bleach Toxicity. [Diakses 3 September 2019]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441921/>.
- Brandl, M.T. 2008. Plant lesions promote the rapid multiplication of *Escherichia coli* O157:H7 on postharvest lettuce. *Applied and environmental microbiology* 74(17): 5285-5289.
- Caliskan, O., J. Radusiene, K.E. Temizel, Z. Staunis, C. Cirak, D. Kurt, and M.S. Odabas. 2017. The effects of salt and drought stress on phenolic accumulation in greenhouse-grown *Hypericum pruinatum*. *Italian Journal of Agronomy*. 12(918): 271-275.
- Cobrado, J.S., and A.M. Fernandez. 2016. Common fungi contamination affecting tissue-cultured Abaca (*Musa textiles* Nee) during initial stage of micropropagation. *Asian Research Journal of Agriculture*. 1(2):1–7.
- Eziashi, E.I., O. Asemota, C.O. Okwuagwu, C.R. Eke, N.I. Chidi, and E.A. Oruade-Dimaro. 2014. Screening sterilizing agents and antibiotics for the elimination of bacterial contaminants Journal of Applied Oral Science from oil palm explants for plant tissue e culture. *European Journal of Experimental Biology*. 4(4): 111-115.
- Fang, J.Y. and Y.R. Hsu. 2012. Molecular identification and antibiotic control of endophytic bacterial contaminants from micropropagated *Aglaonema* cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110(1): 53–62.
- Ibrahim, M.H., H.Z.E. Jaafar, A. Rahmat, and Z.A. Rahman. 2011. The relationship between phenolics and flavonoids production with total non structural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila* benth. under high co2 and nitrogen fertilization. *Molecules* 16: 162-174.
- Junairiah, N.I., Zuraidassanaaz, F.N. Izdihar, and Y.S.W. Manuhara. Callus induction of leaf explant *Piper betle* L. Var Nigra with combination of plant growth regulators indole-3-acetic acid (IAA), benzylamino purin (BAP) and kinetin. *AIP Conference Proceedings*. 1888: 020028-1–020028-7.
- Kane, M.E., P. Kauth, and T. Johnson. 2011. Culture indexing for bacterial and fungal contaminants. Di Dalam: *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. Editor : Trigiani, R.N., and D.J. Gray. Boca Raton (US): CRC Press.
- Kasnak, C. 2020. Effects of anti-browning treatments on the polyphenol oxidase and antioxidant activity of fresh-cut potatoes by using response surface methodology. *Potato Research* 1-14.
- Klayraung, S., P. Niamsup, P. Poonnoy, and N. Topoonyanont. 2017. Diversity and control of bacterial contamination of plants propagated in temporary immersion bioreactor system. *Acta Horticulturae* 1155: 439–446.
- Laukkanen, H., H. Häggman, S. Kontunen-Soppela, and A.Hohtola. 1999. Tissue browning of *in vitro* cultures of Scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiologica Plantarum* 106: 337-343.

- McDonnell, G., and A.D. Russell. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12(1): 147-179.
- McDonnell G. General mechanism of action. In: McDonnell GE, eds. *Antisepsis, Disinfection, and Sterilization*. 2nd ed. Washington DC: ASM Press; 2017;255-69.
- Modeste, K.K., M.T. Eliane, K. Daouda, S.A. Brahim, K. Tchoa, K.E. Kouablan, and K. Mongomake. 2017. Effect of antioxidants on the callus induction and the development of somatic embryogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Australian Journal of Crop Science* 11(1): 25-31.
- Nadha, H.K., R. Salwan, R.C. Kasana, M. Anand, and A. Sood. 2012. Identification and elimination of bacterial contamination during in vitro propagation of *Guadua angustifolia* Kunth. *Pharmacognosy Magazine*. 8(30): 93–97.
- Nakagarwara, S., T. Goto, M. Nara, Y. Ozawa, K. Hotta, and Y. Arata. 1998. Spectroscopic characterisation and the pH dependence of bacterial activity of the aqueous chlorine solution. *Analytical Sciences*. 14: 691-698.
- Odutayo, O.I., N.A. Amusa, O.O. Okutade, and Y.R. Ogunsanwo. 2007. Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 2: 67-72.
- Omamor, I.B., A.O. Asemota, C.R. Eke, and E.I. Eziashi. 2007. Fungal contamination of the oil palm tissue culture in Nigerian institute for oil palm research (NIFOR). *African Journal of Agricultural Research*. 2(10): 534-537.
- Onwubiko N.C., C.S. Nkogho, C.P. Anyanwu, and G.C. Onyeishi. 2013. Effect of different concentration of sterilant and exposure time on sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) explants. *International journal of current microbiology and applied sciences* 2(8): 14-20.
- Orlikowska, T., K. Nowak, and B. Reed. 2017. Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128(3): 487–508.
- Oyebanji, O.B., O. Nweke, O. Odebunmi, N.B. Galadima, M.S. Idris, U.N. Nnodi, A.S. Afolabi, and G.H. Ogbadu. 2009. Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology* 8(20): 5395-5399.
- Pádua, M.S., R.S. Santos, C.R.G. Labory, V.C. Stein, E.G. Mendonça, E. Alves, and L.V. Paiva. 2018. Histodifferentiation of oil palm somatic embryo development at low auxin concentration. *Protoplasma*. 255(1): 285-295.
- Pais, A.K., A.P. da Silva, J.C. de Souza, S.L. Teixeira, J.M. Ribeiro, A.R. Peixoto, and C.D. da Paz. 2016. Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of *Gerbera hybrida* cv. Essandre. *African Journal of Biotechnology* 15(36): 1995-1998.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht : Martinus Nijhoff.
- Ray, S.S. and N. Ali. 2016. Biotic contamination and possible ways of sterilization review with reference to bamboo micropropagation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 59: 1-10.
- RStudio Team. 2018. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Saad, A.I.M. and A.M. Elshahed. 2012. Plant tissue culture media. Di dalam: *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. Leva, A. and L.M.R. Rinaldi, editor. Available from: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-plant-in-vitro-culture/plant-tissue-culture-media>.
- Sun, R.Z., G. Cheng, Q. Li, Y.N. He, Y. Wang, Y.B. Lan, S.Y. Li, Y.R. Zhu, W.F. Song, X. Zhang, X.D. Cui, W. Chen, and J. Wang. 2017. Light-induced variation in phenolic compounds in cabernet sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) involves extensive transcriptome reprogramming of biosynthetic enzymes, transcription factors, and phytohormonal regulators. *Frontiers in Plant Science*. 8(547): 1-18.
- Yoo, Jin-Hong. 2018. Review of disinfection and sterilization – back to the basics. *Infection and Chemotherapy*. 50(2): 101-109.
- Zamir, R. and Abdur-Rab. 2014. Effect of exposure time and incubation period of various sterilants and antioxidants on the in vitro morphogenesis of guava explants. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science* 7(5): 81-86.