

Teknik Sterilisasi Eksplan *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC. dengan Penambahan Asam Askorbat dan Natrium Hipoklorit (NaOCl) Secara *In Vitro*

Explant Sterilization Technique *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC. with the addition of Ascorbic Acid and Sodium Hypochlorite (NaOCl) *In Vitro*

Syifara Chika^{1,*}, Lily Ismaini², Dian Triastari Armanda^{1,3}

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang, Indonesia

²UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Cibodas-LIPI, Cipanas, Cianjur, Jawa Barat, Indonesia

³Ph.D Student, Department of Industrial Ecology, Leiden University, The Netherlands

*Corresponding Author: syifarachika_1908016030@student.walisongo.ac.id

Abstrak: *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC. mempunyai nama lokal saninten. Tumbuhan ini termasuk salah satu tumbuhan berkayu yang mempunyai potensi untuk dikembangkan karena bermanfaat bagi satwa liar untuk bersarang, dan digunakan dalam kegiatan reboisasi lahan. Biji tumbuhan ini dapat dimanfaatkan untuk bahan makanan dengan direbus dan dibakar. Banyaknya manfaat tumbuhan ini menjadikan harus ada upaya pelestarian agar tidak punah. Akan tetapi proses perbanyakannya membutuhkan waktu yang lama sehingga harus menggunakan teknik perbanyakan melalui kultur jaringan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui teknik sterilisasi terbaik dalam kultur *C. argentea* secara *in vitro*. Telah dilakukan delapan metode sterilisasi eksplan pada penelitian ini. Metode 1-4 dilakukan tanpa perendaman asam askorbat, sedangkan metode 5-8 dilakukan penambahan asam askorbat. Berdasarkan hasil pengamatan, diketahui bahwa sterilisasi terbaik adalah pada metode ke-8 karena tingkat kontaminasi dan *browning* yang lebih rendah dari metode lainnya yaitu pada hari kelima setelah penanaman hanya sebesar 20%. Metode ke-8 adalah sterilisasi bertingkat. Pada sterilisasi bertingkat, eksplan secara bertahap direndam dalam kadar NaOCl 10%, NaOCl 20% dan NaOCl 30% secara berturut-turut. Sterilisasi bertingkat adalah metode sterilisasi yang paling efektif untuk mengurangi kontaminasi dan *browning*. Pada reaksi pencoklatan (*browning*) secara enzimatis, asam askorbat berperan sebagai antioksidan dan mengurangi kontaminasi. Kombinasi zat sterilan, waktu, urutan, dan cara perendaman mempengaruhi sterilitas eksplan.

Kata kunci: sterilisasi; kultur tunas; natrium hipoklorit; asam askorbat.

Abstract: *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC. has the local name saninten. This plant is one of the woody plants that has the potential to be developed because it is beneficial for wildlife to nest and is used in reforestation. The seeds of this plant can be used for food by boiling and burning. This plant must be preserved so that it does not become extinct. However, the propagation, so it must use the technique of propagation through tissue culture. This study aims to determine the best sterilization technique for *in vitro* culture of *C. argentea*. Eight methods of explant sterilization have been carried out in this study. Methods 1-4 do not use ascorbic acid immersion, while methods 5-8 use the addition of ascorbic acid. Based on observations, it is known that the best sterilization is in the 8th method because the level of contamination and browning is lower than other methods, namely on the fifth day after planting only 20%. The 8th method is graded sterilization. In graded sterilization, explants were gradually immersed in 10% NaOCl, 20% NaOCl, and 30% NaOCl, respectively. Multilevel sterilization is the most effective method of sterilization to reduce contamination and browning. Ascorbic acid acts as an antioxidant and reduces contamination in the enzymatic browning reaction. The combination of sterile substances, time, sequence, and method of immersion affects the sterility of explants.

Keywords: ascorbic acid; shoot culture; sodium hypochlorite; sterilization

Dikirim: 30 Mei 2022

Direvisi: 15 Agustus 2022

Diterima: 23 Agustus 2022

Dipublikasi: 27 Agustus 2022

Pendahuluan

Castanopsis argentea (Blume) A.DC., atau dikenal dengan nama lokalnya saninten, merupakan anggota famili *Fagaceae* (Heriyanto, 2007). Jika ditinjau dari segi ekologi, tumbuhan ini adalah suatu tempat bagi satwa liar diantaranya berbagai burung dan mamalia untuk beristirahat, bersarang dan mencari makan (Heriyanto, 2007). Tumbuhan ini dimanfaatkan untuk kegiatan reboisasi lahan dengan kandungan batu yang tinggi (Wibowo, 2006). Biji tumbuhan ini dapat dimanfaatkan untuk bahan makanan dengan direbus dan dibakar. Saninten merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki potensi dalam kegiatan revegetasi pada

lahan bekas tambang (Mansur, 2013).

Tumbuhan ini memiliki daun lanset (lancip memanjang) yang berukuran panjang 7-12 cm dan lebar 2-3,5cm. Permukaan daunnya licin berlilin dan pada bagian bawah daun berwarna abu-abu dengan sedikit bulu. Tumbuhan ini memiliki daun tunggal yang tersusun spiral dan berseling, memiliki daun penumpu yang mudah luruh (Holtum, 1964; Rugayah & Sunarno, 1992). Tumbuhan ini memiliki ciri khas pada organ vegetatif yaitu saat daun dilipat maka terdapat suatu garis lilin berwarna putih yang memanjang pada sebelah atas daun (Prawira, 1990).



Gambar 1. Pohon, bunga, dan buah Saninten (Surya & Ismaini, 2021).

Distribusi *C. argentea* (Blume) A.DC. menurut (Whitmore TC, 1986) dapat ditemukan di Pulau Sumatera dan Jawa. Tumbuhan ini secara alami tumbuh pada hutan lindung. Akan tetapi saat ini jumlah *C. argentea* (Blume) A.DC. semakin menurun karena tingkat pertumbuhan yang lama, adanya pembalakan dalam pengambilan kayunya dan permudaan alami yang sedikit (Wulandari, Arum Sekar, 2017). Banyaknya manfaat tanaman ini menjadikan tanaman ini harus dilakukan perbanyakan agar tidak punah. Perbanyakan generatif dengan cara permudaan alami sulit dilakukan karena buah dari tanaman ini menjadi makanan satwa (Heriyanto, 2007). Pertumbuhan yang lama ini menjadikan harus ada metode alternatif yang lebih efektif dan cepat yaitu melalui teknik kultur

jaringan. Beberapa kelebihan kultur jaringan yaitu waktu yang dibutuhkan singkat, mampu menghasilkan tanaman dalam jumlah yang banyak dan memiliki sifat genetik yang sama dengan induknya. Keberhasilan pada teknik kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh yang ditambahkan (Lestari EG, 2011). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui teknik sterilisasi eksplan terbaik dalam kultur *C. argentea* (Blume) A.DC. secara *in vitro* untuk meminimalisir kontaminasi.

Bahan dan Metode

Penelitian ini dilakukan pada Januari sampai Februari 2022 di Laboratorium Kultur Jaringan, Kebun Raya Cibodas-BRIN. Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu autoklaf listrik dan konvensional, *laminar air flow* (LAF),

kompot, panci, oven, cawan petri, gelas beaker, mikropipet, botol kultur dengan ukuran sedang dan kecil, pinset, scalpel, baki plastik, gunting biasa, dan gunting stek. Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu eksplan tunas *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC., media WPM (*Woody Plant Medium*), sukrosa, bubuk agar, akuades, BAP (*6-Benzylaminopurime*), IAA (*Indole-3-Acetic Acid*), PPM (*Plant Preservative Mixture*), arang aktif, detergen (*sungliht*), *tween 80*, fungisida (*dithane*), bakterisida (*agrept*), NaOCl (*bayclin*), asam askorbat (vitamin C), alkohol 70%, plastik anti panas, plastik zip, tisu, kertas alumunium, dan karet.

Persiapan eksplan *C. argentea* (Blume) A.DC.

Pengambilan eksplan dilakukan di Kebun Raya Cibodas-BRIN. Tunas dipotong sekitar 1-2 cm dari pohonnya.

Sterilisasi Alat

Botol kultur direndam ke dalam air dengan campuran natrium hipoklorit selama 20 menit. Kemudian, botol kultur dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 80°C selama 20 menit. Pinset, scalpel, dan cawan petri dimasukkan ke dalam plastik anti panas dan disterilisasi pada autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Pembuatan Media WPM

Pembuatan media WPM (*Woody Plant Medium*) sebanyak 1 liter dilakukan dengan 2 metode. Metode pertama dilakukan dengan cara ditimbang WPM sebanyak 2,58 gram, sukrosa 30 gram, bubuk agar 7 gram, dan arang aktif sebanyak 0,5 gram. Setelah itu, dicampur semua bahan dengan akuades sebanyak 1 liter ke dalam panci dan di masak di atas kompor hingga mendidih. Setelah mendidih, ditambahkan hormon BAP (*6-Benzylaminopurime*) sebanyak 1000µl, IAA (*Indole-3-Acetic Acid*) sebanyak 100µl, PPM (*Plant Preservative Mixture*) sebanyak 200µl. Selanjutnya, campuran dimasukkan pada botol kultur sedang sebanyak 36 botol dan ditutup. Pembuatan media WPM dengan metode kedua dilakukan dengan langkah dan bahan yang sama akan tetapi ditambahkan asam askorbat (Vitamin C) sebanyak 1 gram/L.

Sterilisasi Media

Media WPM yang sudah dimasukkan ke

dalam botol selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121°C. Setelah mencapai 121° C selama 20 menit. Media yang telah steril disimpan di ruang inkubasi hingga digunakan untuk tahap selanjutnya.

Tabel 1 menjelaskan delapan metode sterilisasi eksplan *C. argentea* (Blume) A.DC. Tahap pertama pencucian dengan detergen (*sunlight*) pada semua metode. Eksplan kemudian direndam dengan *tween 80* selama kurang lebih 5 menit pada semua metode. Tahap berikutnya, eksplan direndam larutan bakterisida dan fungisida selama 30 menit. Perbedaan kedelapan metode sterilisasi eksplan tersebut terletak pada tahap empat dan tahap delapan. Pada tahap empat, masing-masing metode direndam pada larutan NaOCl dengan berbagai konsentrasi dan waktu perendaman yang berbeda sesuai dengan yang tertera pada tabel. Pada tahap kelima, eksplan direndam asam askorbat kurang lebih 30 menit. Selanjutnya, direndam larutan PPM kurang lebih 30 menit. Pada tahap ketujuh, direndam alkohol 70% selama 30 detik. Pada tahap kedelapan, metode satu hingga metode keempat ditanam pada media WPM yang telah ditambah arang aktif, sedangkan pada tahap kelima hingga tahap kedelapan ditanam pada media WPM yang ditambah arang aktif dan asam askorbat 0,1gr/1L.

Penanaman Eksplan

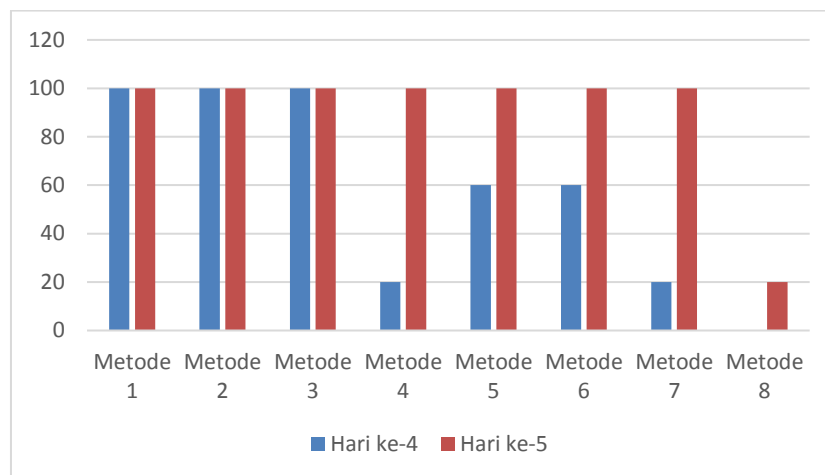
Pinset dan scalpel disemprot alkohol 70% kemudian dipanaskan di atas api bunsen selama beberapa menit. Selanjutnya, eksplan tunas dipotong hingga berukuran 1 cm. Botol kultur dibuka, pada bagian tutupnya dipanaskan di atas bunsen. Eksplan yang telah dipotong ditanam pada media WPM, dengan posisi tegak. Tutup botol kultur dipanaskan kembali, kemudian ditutup dengan rapat. Setiap botol dapat berisi 2 hingga 4 tunas.

Sterilisasi Eksplan

Tabel 1. Delapan metode sterilisasi eksplan tunas *C. argentea* (Blume) A.DC., mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh (Surya & Ismaini, 2021)

Tahapan	Metode 1	Metode 2	Metode 3	Metode 4	Metode 5	Metode 6	Metode 7	Metode 8
1	Pencucian dengan detergen (<i>sunlight</i>)							
2	Pencucian dengan <i>tween 80</i> ±5 menit							
3	Perendaman Bakterisida& Fungisida ±30 menit							
4	Perendaman NaOCl 10% ±20 menit	Perendaman NaOCl 20% ±15 menit	Perendaman NaOCl 30% ±10 menit	Sterilisasi bertingkat (Perendaman NaOCl 10% ±20 menit, NaOCl 20% ±15 menit dan NaOCl 30% ±10 menit).	Perendaman NaOCl 10% ±15 menit	Perendaman NaOCl 20% ±10 menit	Perendaman NaOCl 30% ±5 menit	Sterilisasi bertingkat (Perendaman NaOCl 10% ±15 menit, NaOCl 20% ±10 menit dan NaOCl 30% ±5 menit).
5	Perendaman Asam Askorbat ±30 menit							
6	Perendaman PPM (<i>Plant Preservative Mixture</i>) ±30 menit							
7	Perendaman Alkohol 70% ±30 detik							
8	Ditanam pada media WPM+arang aktif	Ditanam pada media WPM+arang aktif	Ditanam pada media WPM+arang aktif	Ditanam pada Media WPM+arang aktif	Ditanam pada media WPM+arang aktif dan asam askorbat 0,1 g/1L	Ditanam pada media WPM+arang aktif dan asam askorbat 0,1 g/1L	Ditanam pada media WPM+arang aktif dan asam askorbat 0,1 g/1L	

Hasil dan Pembahasan



Gambar 2. Persentase Kontaminasi dan *Browning* tunas *C. argentea* tanpa asam askorbat 1g/L (metode 1-4) dan tanpa penambahan asam askorbat 1g/L (metode 5-8) setelah 5 hari penanaman.

Gambar 1 menunjukkan persentase kontaminasi dan *browning* tunas *C. argentea* tanpa menggunakan tambahan asam askorbat pada metode 1 hingga metode 4 setelah 5 hari penanaman. Berdasarkan gambar tersebut, diketahui bahwa waktu munculnya kontaminasi terlama yaitu pada metode 4 karena pada hari keempat persentase kontaminasi hanya 20%. Pengamatan hari kelima menunjukkan bahwa semua metode sterilisasi eksplan mengalami kontaminasi dan *browning* dengan persentase 100%. Metode 4 adalah metode sterilisasi bertingkat yaitu perendaman NaOCl 10% selama ± 20 menit, NaOCl 20% selama ± 15 menit dan NaOCl 30% selama ± 10 menit secara berturut-turut. Sementara itu, waktu tercepat mulai muncul kontaminasi dan *browning* adalah pada metode 1, metode 2 dan metode 3, hal ini disebabkan karena kadar NaOCl yang rendah. Menurut penelitian yang dilakukan oleh (Farooq et al., 2002) menjelaskan bahwa jika NaOCl diberikan pada konsentrasi dan lama waktu perendaman yang rendah maka tidak terlalu efektif untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada eksplan.

Gambar 1 menunjukkan tingkat persentase kontaminasi dan *browning* tunas *C. argentea* dengan menggunakan penambahan asam askorbat pada metode 5 hingga metode 8 setelah 5 hari penanaman. Berdasarkan gambar tersebut, diketahui bahwa sterilisasi terbaik adalah pada metode 8 karena tingkat

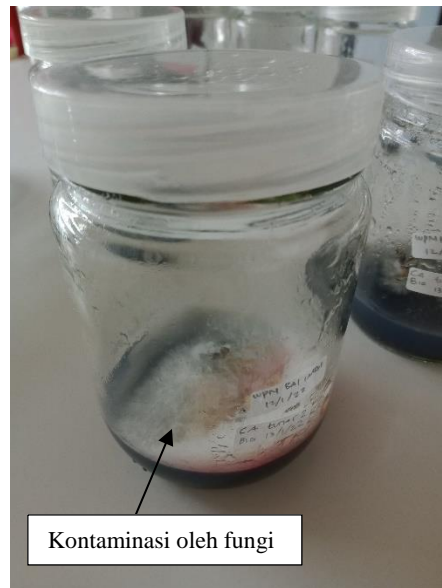
kontaminasi dan *browning* yang lebih rendah dari metode lainnya yaitu pada hari kelima setelah penanaman, yaitu hanya sebesar 20%. Penggunaan asam askorbat pada metode 5 sampai metode 8 menunjukkan tingkat kontaminasi dan pencokelatan memerlukan waktu yang lebih lama jika dibanding dengan metode 1 sampai metode 4 media yang tidak ditambahkan asam askorbat. Pada reaksi pencokelatan (*browning*) secara enzimatik, asam askorbat memiliki peranan sebagai antioksidan dan menghasilkan oksigen di bagian permukaan (Zawistowski & Biliaderis, 1991). Hal ini sesuai dengan percobaan yang telah dilakukan bahwa penambahan asam askorbat dapat mengurangi tingkat kontaminasi dan *browning*.

Penggunaan Natrium Hipoklorit (NaOCl) dalam proses sterilisasi permukaan eksplan telah banyak dilaporkan (Badoni & Chauhan, 2010; H. Colgecen, 2011; Maina et al., 2010; Morla et al., 2011; Sulistiyo et al., 2018; Vejsadova, 2006). NaOCl memiliki kemampuan untuk membunuh berbagai macam jamur, bakteri, dan virus (Al-Amodi, 2016; Surya & Ismaini, 2021; Yildiz et al., 2012). Jika NaOCl diberikan pada konsentrasi dan lama waktu perendaman yang rendah, maka tidak terlalu efektif untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada eksplan (S. Farooq, 2002). Semakin rendah konsentrasi NaOCl, maka semakin rentan pula eksplan terserang pathogen. Tetapi apabila konsentrasi NaOCl

yang diberikan terlalu tinggi maka perkembangan eksplan menjadi terhambat (Rismayani & F. Hamzah, 2010). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan bahwa kadar NaOCl 10%, NaOCl 20%, dan NaOCl 30% lebih rentan terhadap patogen jika dibanding dengan sterilisasi bertingkat. Pada sterilisasi bertingkat, eksplan secara bertahap direndam dalam kadar NaOCl 10%, NaOCl 20% dan NaOCl 30% secara berturut-turut. Berdasarkan hasil pengamatan, sterilisasi bertingkat adalah metode sterilisasi yang paling efektif untuk mengurangi kontaminasi dan *browning*.

Kontaminasi adalah gangguan sekaligus permasalahan yang sering dijumpai pada kultur jaringan. Kontaminasi dapat disebabkan oleh bakteri, jamur, atau virus (Mariska & Sukmadjaja, 2003). Kontaminasi (Gambar 3) merupakan kontaminasi yang disebabkan oleh jamur. Penelitian ini menggunakan beberapa jenis bahan untuk dapat mensterilkan eksplan dengan tujuan mencegah kontaminasi, antara lain detergen (*sunlight*), *tween 80*, bakterisida, fungisida, natrium hipoklorit, alkohol 70%, larutan PPM, dan asam askorbat (vitamin C). Kontaminasi dapat dicegah dengan menggunakan teknik sterilisasi yang sesuai baik pada alat maupun bahan yang digunakan serta lingkungan kerja yang tepat. Sterilisasi berfungsi untuk menghilangkan cendawan atau patogen yang terbawa pada saat pengambilan eksplan, dan dapat memicu terjadinya kontaminasi yang dapat menghambat pertumbuhan eksplan untuk dapat menjadi tanaman yang utuh. Beberapa disinfektan yang digunakan untuk proses sterilisasi pada kultur jaringan adalah natrium hipoklorit (NaOCl), hidrogen peroksida (H₂O₂) dan HgCl₂ (Aziz et al., 2014; Ernawati & Gunawan, 1992).

Eksplan hasil kerja kultur jaringan sangat sering ditemukan berubah warna menjadi coklat (*browning*). Hal tersebut dapat menghambat pertumbuhan dan dapat menyebabkan kematian pada jaringan tumbuhan (Hutami, 2008). Pencoklatan pada eksplan lebih sering ditemukan pada spesies tumbuhan berkayu, terutama apabila eksplan berasal dari pohon dewasa. *C. argentea* (Blume) A.DC.



Gambar 3. Kontaminasi yang terjadi pada tunas *C. argentea* (Blume) A.DC.

merupakan salah satu jenis tumbuhan yang berkayu dan berumur dewasa, hal tersebut mengakibatkan eksplan rentan mengalami *browning*. Beberapa jenis tumbuhan tropika memiliki kandungan fenol yang tinggi dan akan teroksidasi saat sel dilukai (George & Sherrington, 1984). Hal tersebut mengakibatkan jaringan yang diisolasi akan mengalami pencoklatan atau gagal tumbuh. Pencoklatan pada eksplan terjadi karena adanya aktivitas enzim oksidase yang terdapat kandungan tembaga seperti tirosinase dan polifenol oksidase yang disintesis atau dilepaskan dan terdapat pada kondisi oksidatif saat jaringan dilukai (Lerch, 1981).

Penelitian (Winarno, 1986) menyatakan bahwa asam askorbat adalah suatu senyawa reduktor dan dapat bekerja sebagai prekursor untuk membentuk warna coklat non-enzimatis. Asam askorbat berada dalam keseimbangan dengan asam dehidroaskorbat. Pada suasana asam, cincin lakton asam dehidroaskorbat akan terurai secara irreversibel dengan terbentuknya senyawa diketoglukonat dan terjadi reaksi pencoklatan. Asam askorbat akan mereduksi o-quinon dengan 2 gugus hidroksilnya (pada C2 dan C3), sehingga o-quinon yang berfungsi sebagai oksidator yang baik, asam askorbat sebagai pereduksi mengakibatkan reaksi oksidasi-reduksi terjadi secara cepat. Reaksi tersebut akan mencegah

terjadinya pembentukan polimer oquinon. Oksigen dapat mengoksidasi asam askorbat menghasilkan hidrogen peroksida dan asam dehidroaskorbat. Oksigen yang telah bereaksi dengan asam askorbat akan mencegah oksidasi o-difenol. Dengan tidak terbentuknya oquinon sebagai hasil oksidasi o-diphenol menandakan bahwa terjadinya pencoklatan dapat dicegah (Schuler, 1990). Vitamin C atau asam askorbat adalah bahan yang digunakan pada kegiatan sterilisasi eksplan tunas *C. argentea* (Blume) A.DC. Penelitian (Babaei et al., 2013) menyatakan bahwa pra-perlakuan dengan penambahan asam askorbat sebanyak 10 g/100 mL dapat menurunkan angka kontaminasi dan pencoklatan secara efektif. Berdasarkan delapan teknik sterilisasi yang dicoba, metode yang paling baik adalah metode ke-8 yaitu teknik sterilisasi bertingkat dan penambahan asam askorbat pada media WPM. Hal ini dibuktikan dengan hasil pengamatan yang menunjukkan bahwa terjadinya kontaminasi dan *browning* lebih lama dibandingkan dengan metode sterilisasi lainnya.

Detergen yang digunakan untuk sterilisasi eksplan tunas *C. argentea* (Blume) A.DC. dalam penelitian ini adalah *Sunlight*. Detergen ini memiliki peranan untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada eksplan dan dapat membunuh jamur dan bakteri yang berada pada permukaan eksplan yang digunakan dalam proses sterilisasi. Selanjutnya, eksplan tunas direndam dengan *tween 80*. *Tween 80* berfungsi sebagai zat pembasah, peningkat kelarutan dan emulgator (Rowe et al., 2009). Pada kegiatan kultur jaringan, *tween 80* sering dicampurkan dengan detergen dan dimanfaatkan untuk perendaman eksplan sebelum proses sterilisasi dilakukan.

Bakterisida merupakan jenis pestisida yang berfungsi untuk membunuh bakteri. Bakterisida juga memiliki peranan dalam menghambat perkembangan penyakit pada tumbuhan. Bakterisida memiliki bahan aktif antara lain forantharacnose thiram 50% dan streptomisin sulfat 20%. Lebih lanjut, fungisida adalah jenis pestisida yang dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan fungi. Pada umumnya, fungisida dibagi menjadi dua golongan, yaitu fungisida selektif dan fungisida non-selektif. Fungisida selektif berfungsi membunuh jenis-jenis jamur tertentu). Pada

kegiatan sterilisasi, bakterisida dan fungisida mempunyai peranan yang sangat penting, terutama untuk eksplan yang diambil dari lapangan seperti pucuk maupun daun (Surya & Ismaini, 2021).

Alkohol adalah salah satu jenis senyawa kimia dengan gugus -OH. Alkohol yang sering digunakan kegiatan sterilisasi berbentuk etanol (C₂H₅OH). Etanol 70% dan etanol 90% sering dimanfaatkan untuk antiseptik pada kegiatan sterilisasi pada kegiatan kultur jaringan. Alkohol 70% dapat menurunkan tingkat kontaminasi yang berasal dari jamur ataupun bakteri (Lukmana & Rahmawati, 2018). Larutan *Plant Preservative Mixture* (PPM) adalah salah satu larutan yang digunakan pada kegiatan sterilisasi eksplan pada penelitian ini. Larutan PPM memiliki peranan sebagai antimikroba dan antibakteri. Larutan PPM relatif tahan oleh suhu panas dalam penggunaannya, sehingga dapat efektif untuk mengurangi tingkat kontaminasi pada kegiatan kultur jaringan. PPM dengan dosis yang optimal, dapat efektif menghambat terjadinya kontaminasi yang berasal dari udara, kontak manusia dan air. Selain itu PPM dengan dosis optimal tidak merusak proses perkecambahan biji secara *in vitro*, regenerasi maupun proliferasi kalus. Penelitian lain menyebutkan bahwa PPM bermanfaat untuk mengurangi tingkat kontaminasi endogen (Yam & Arditti, 2017). Vitamin C atau asam askorbat adalah bahan yang digunakan pada kegiatan sterilisasi eksplan tunas *C. argentea* (Blume) A.DC. Penelitian (Babaei et al., 2013) menyatakan bahwa pra-perlakuan dengan penambahan vitamin C sebanyak 10 g/100 mL dapat menurunkan angka kontaminasi dan pencoklatan secara efektif.

Semua media WPM dalam penelitian ini diberi campuran arang aktif. Penelitian (Kumar et al., 2005) menyatakan bahwa arang aktif berperan untuk menstimulasi difusi gas, nutrisi, dan respirasi dari tunas, dapat melakukan penyerapan eksudat yang tidak bermanfaat dan senyawa fenolik yang berbahaya. Arang aktif juga memiliki kemampuan untuk memacu proses embriogenetik somatik dan inisiasi pada akar (George & Sherrington, 1984). Arang aktif juga berfungsi untuk melakukan penyerapan cahaya pada permukaan media sehingga tidak

menembus hingga bagian bawah media, dengan demikian cahaya tidak dapat menstimulasi yang dapat mengoksidasi fenol.

Penelitian (Wulandari, Arum Sekar, 2017) menyatakan bahwa terjadinya kontaminasi pada eksplan yang telah dilakukan proses sterilisasi diduga dikarenakan proses sterilisasi yang kurang optimal. Menurut (Zulkarnain, 2009), kontaminasi mikroorganisme yang terjadi berasal dari berbagai faktor diantaranya alat yang digunakan pada proses sterilisasi tidak sempurna, tempat kerja yang masih kurang steril, berasal dari eksplan ataupun proses pengerjaan yang kurang teliti. Kontaminasi yang terjadi juga dapat berasal dari eksplan dari dalam jaringan yang tidak dapat hilang jika hanya dengan dilakukan sterilisasi pada permukaan, seperti bakteri endofit di dalam jaringan (Zulkarnain, 2009). Eksplan menyerap unsur hara yang terkandung pada media sehingga akan memicu bakteri endofit pada jaringan tanaman akan keluar dan berkembang di media. Lingkungan *in vitro* dengan kandungan sukrosa dan unsur hara yang tinggi, suhu hangat dan kelembaban tinggi akan mendorong mikroorganisme tumbuh dengan cepat, hal tersebut mengakibatkan perkembangan dan pertumbuhan eksplan akan terganggu bahkan bisa menyebabkan kematian. Jamur adalah salah satu jenis mikroorganisme yang memiliki waktu pertumbuhan yang cepat. Saat dalam kondisi aseptis, spora akan mudah tumbuh, bahkan pada media yang mengandung banyak nutrisi akan lebih menimbulkan jamur dapat tumbuh. Penelitian ini menunjukkan bahwa pada semua perlakuan kontaminan didominasi oleh jamur.

Kesimpulan

Teknik sterilisasi yang dilakukan memiliki pengaruh pada jumlah kontaminasi dan *browning* pada eksplan *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC. Telah dilakukan delapan metode sterilisasi eksplan pada penelitian ini. Berdasarkan hasil pengamatan, diketahui bahwa sterilisasi terbaik adalah pada metode ke-8 karena tingkat kontaminasi dan *browning* yang lebih rendah dari metode lainnya yaitu pada hari kelima setelah penanaman hanya sebesar 20%. Metode ke-8 adalah sterilisasi bertingkat dengan

penambahan asam askorbat. Pada sterilisasi bertingkat, eksplan secara bertahap direndam dalam kadar NaOCl 10%, NaOCl 20% dan NaOCl 30% secara berturut-turut. Sterilisasi bertingkat adalah metode sterilisasi yang paling efektif untuk mengurangi kontaminasi dan *browning*. Pada reaksi pencoklatan (*browning*) secara enzimatik, asam askorbat berperan sebagai antioksidan dan mengurangi kontaminasi. Kombinasi zat sterilan, waktu, urutan, dan cara perendaman mempengaruhi sterilitas eksplan.

Ucapan terima kasih

Terima kasih kepada Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Cibodas-BRIN dan Prodi Biologi Universitas Islam Negeri Walisongo yang telah mendukung dan memberikan fasilitas untuk melakukan penelitian ini.

Referensi

- Al-Amodi, M. O. (2016). Fungi associated with seeds of Ashford variety of groundnut grown in Yemen and its disinfection *in vitro* using sodium hypochlorite. *Journal of Global Biosciences*, 5(1), 3414–3422.
- Aziz, M. M., Ratnasari, E., & Rahayu, Y. S. (2014). Induksi Kalus Umbi Iles-Iles (*Amorphophallus muelleri*) dengan Kombinasi Konsentrasi 2,4-D dan BAP Secara *In Vitro* Callus. *LenteraBio*, 3(2), 109–114.
- Babaei, N., Abdullah, N. A. P., Saleh, G., & Abdullah, T. L. (2013). Control of contamination and explant browning in *Curculigo latifolia in vitro* cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(8), 448–454.
- Badoni, A., & Chauhan, J. S. (2010). *In vitro* sterilization protocol for micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. "Kufri Himalini." *Academia Arena*, 2 (4), 24–27.
- Ernawati, A., & Gunawan, L. W. (1992). *Penyediaan Bibit Pisang Tanduk (Musa paradisiaca L. AAB Grup) secara Kultur Jaringan*.
- Farooq, S. A., Farooq, T. T., & Rao, T. V. (2002). Micropropagation of *Annona squamosa* L. using nodal explants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*,

- 5(1), 43–46.
- George, E. F., & Sherrington, P. D. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture (Exegetics Ltd., Reading, UK)*.
- H. Colgecen, et al. (2011). Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turkish Journal of Biology*, 35(4), 513–520.
- Heriyanto, N. M. (2007). Kajian Ekologi Permudaan Saninten (*Castanopsis argentea* (Bl.) A. DC.) di Taman Nasional Gunung Gede Pangrango, Jawa Barat. *Buletin Plasma Nutfah*, 13 (1), 34–42.
- Holtum, R. E. (1964). *Flora Malaysiana. Government Printing Office Singapore*, 503–508.
- Hutami, S. (2008). Browning problems in tissue culture. *J. AgroBiogen.*, 4(2), 83–88.
- Kumar, M. B., Vakeswaran, V., & Krishnasamy, V. (2005). Enhancement of synthetic seed conversion to seedlings in hybrid rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(1), 97–100.
- Lerch, K. (1981). Tyrosinase kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates. *Metal Ions in Biology System*, 13, 143–186.
- Lestari EG. (2011). Peranan zat pengatur tumbuh dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan. *Jurnal AgroBiogen*, 7 (1), 63–68.
- Lukmana, M., & Rahmawati, L. (2018). Sterilization Effectiveness Of Rubber Leaf Explant (*Hevea brasiliensis*) In *In-Vitro* Culture. *Bioprospek: Jurnal Ilmiah Biologi*, 13(1), 19–25.
- Maina, S. M., Emongor, Q., Sharma, K. K., Gichuki, S. T., Gathaara, M., & de Villiers, S. M. (2010). Surface sterilant effect on the regeneration efficiency from cotyledon explants of groundnut (*Arachis hypogea* L.) varieties adapted to eastern and Southern Africa. *African Journal of Biotechnology*, 9(20).
- Mansur. (2013). *Silvikultur untuk Reklamasi Lahan Bekas Tambang*. SEAMEO BIOTROP.
- Mariska, I., & Sukmadjaja, D. (2003). *Perbanyak bibit abaka melalui kultur jaringan*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.
- Morla, S., Rao, C. S. V. R., & Chakrapani, R. (2011). Factors affecting seed germination and seedling growth of tomato plants cultured *in vitro* conditions. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences (JCBPS)*, 1(2), 328.
- Prawira, R. S. A. (1990). Organografi dan terminologi tumbuhan. *Pengenalan Suku Dan Marga Penting. Pusat Penelitian Dan Pengembangan Hutan, Bogor. Hlm*, 10.
- Rismayani & F. Hamzah. (2010). Pengaruh Pemberian Chlorox (NaOCl) pada Sterilisasi Permukaan untuk Perkembangan Bibit *Aglaonema* (*Donna Carmen*) secara *In Vitro*. *Prosiding Seminar Ilmiah Dan Pertemuan Tahunan PEI Dan PFI XX Komisariat Daerah Sulawesi Selatan*.
- Rowe, R. C., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*. Libros Digitales-Pharmaceutical Press.
- Rugayah, B. S., & Sunarno, B. (1992). *Flora Taman Nasional Gunung Gede Pangrango. Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Dan Pengembangan Biologi. Bogor*.
- S. Farooq, T. R. (2002). Micropropagation of *Annona squamosa* L. using nodal explants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(1), 43–46.
- Schuler, P. (1990). Natural antioxidants exploited commercially. In *Food antioxidants* (pp. 99–170). Springer.
- Sulistiyo, R. H., Luthfiyyah, Z., Susilo, B., Dalimartha, L. N., Wiguna, E. C., Yuliana, N., & Prasetyo, E. N. (2018). The Influence of Sterilization Technique and Medium Composition on the Shoots Growth of The Soursop Explants Ratu Variety. *Jurnal Pendidikan Biologi*, 11, 1–5.
- Surya, M. I., & Ismaini, L. (2021). Perbandingan Metode Sterilisasi Untuk Perbanyakan *Rubus rosifolius* Secara *in Vitro*. *Al-Kauniah: Jurnal Biologi*, 14(1), 127–137. <https://doi.org/10.15408/kauniah.v14i1.16325>

- Vejsadova, H. (2006). Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured *in vitro*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48(1), 109–113.
- Whitmore TC, T. I. (1986). *Tree Flora of Indonesia Check List For Sumatra Compiled by K. Sidiyasa, U. Sutisna, Marfuah-Sutiyono, Titi Kalima-Sutrasno & T.C. Whitmore. Ministry of Forestry. Agency for Forestry Research and Development. Forest Research & Development Centre.*
- Wibowo, C. (2006). *Hubungan antara Keberadaan Saninten (Castanopsis argenta Blume) dengan Beberapa Sifat Tanah: Kasus di Taman Nasional Gunung Gede Pangrango, Jawa Barat*. Disertasi. IPB University.
- Winarno, F. G. (1986). Kimia Pangan dan Gizi, hal. 88-99. *Gramedia, Jakarta*.
- Wulandari, Arum Sekar, et al. (2017). Respon Pertumbuhan Tunas Saninten (*Castanopsis argentea* (Blume) A.DC.) terhadap Pemberian Zat Pengatur Tumbuh BAP dan IAA secara *In Vitro*. *Jurnal Silvikultur Tropika*, 08(3), 208–214.
- Yam, T. W., & Arditti, J. (2017). *Micropropagation of orchids*. John Wiley & Sons.
- Yildiz, M., Fatih Ozcan, S., T Kahramanogullari, C., & Tuna, E. (2012). The effect of sodium hypochlorite solutions on the viability and *in vitro* regeneration capacity of the Tissue. *The Natural Products Journal*, 2(4), 328–331.
- Zawistowski, J., & Biliaderis, C. G. (1991). In *DS Robinson, NAM Eskin (Editors), Oxidative Enzymes in Food*. Elsevier Science, New York.
- Zulkarnain, H. (2009). Solusi Perbanyak Tanaman Budidaya Kultur Jaringan Tanaman. *Jambi. Bumi Aksara*.