

Pengembangan Metode Teknik Sterilisasi Eksplan Guna Meningkatkan Keberhasilan Kultur Jaringan Tanaman Stevia (Stevia Rebaudiana Bertoni)

Development of Explant Sterilization Technique Methods to Improve the Success of Tissue Culture of Stevia Plant (Stevia Rebaudiana Bertoni)

Eko Hadi Cahyono^{1*}, Riani Ningsih¹

¹ Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember

*eko_hadi@polije.ac.id

ABSTRAK

Stevia rebaudiana Bert adalah tanaman perdu yang berasal dari perbatasan Paraguay, Brazil dan Argentina. Daun tanaman ini menghasilkan glikosida steviol, suatu metabolit sekunder yang memiliki tingkat kemanisan 200-300 kali lebih manis dibandingkan sukrosa Tebu. Metode perkembangbiakan stevia konvensional tidak bisa memenuhi kebutuhan benih atau bibit stevia yang semakin hari semakin meningkat. Dengan Kultur jaringan diperkirakan mampu memenuhi kekurangan tersebut karena memiliki potensi untuk menghasilkan plantlet yang seragam dengan jumlah banyak. Teknik Kultur Jaringan merupakan perbanyakan tumbuhan secara vegetative. Kultur jaringan meliputi penanaman sel atau agregat sel, jaringan dan organ tanaman pada medium yang mengandung gula, vitamin, asam-asam amino, garam-garam organik, air, zat pengatur tumbuh, dan bahan pemat. Komposisi medium tumbuh tersebut ternyata sangat menguntungkan pula bagi pertumbuhan jamur dan bakteri. Oleh karena itu, sterilisasi eksplan menjadi faktor penting dalam menentukan keberhasilan program kultur jaringan. Permasalahannya hingga saat ini belum ada teknik sterilisasi eksplan yang optimal untuk kultur jaringan Stevia. Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah mengetahui metode sterilisasi eksplan terbaik dari kombinasi beberapa bahan desinfektan pada eksplan Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) yang dapat menghilangkan kontaminan pada eksplan. Parameter inti yang diamati yaitu Sumber Kontaminasi (deskriptif: bentuk dan warna), Persentase Hidup Eksplan, Persentase Kontaminasi, Persentase Pencokelatan (browning), dan Waktu pertama kali muncul kontaminasi (Kedinian). Hasil Penelitian menunjukkan bahwa Sterilisasi Metode F dengan menggunakan air mengalir, perendaman dalam detergen selama 10 menit, perendaman dalam larutan fungisida 1,5% dan bakterisida 1,5% selama 10 menit, perendaman alkohol 70% selama 1 menit, perendaman HgCl₂ 0,05% 3 menit serta perendaman dalam NaOCl masing-masing 10% dan 5% selama 5 menit memiliki persentase kontaminasi terendah yaitu 20 % dan presentasi hidup tertinggi yaitu 80 % dengan sumber kontaminan 80% jamur dan bakteri 20% serta awal terjadi kontaminasi pada minggu pertama pengamatan.

Kata kunci — Kultur jaringan, *Stevia rebaudiana*, Metode sterilisasi eksplan

ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bert is a shrub native to the borders of Paraguay, Brazil and Argentina. The leaves of this plant produce steviol glycosides, a secondary metabolite which has a sweetness level of 200-300 times sweeter than sugarcane sucrose. Conventional stevia propagation methods cannot meet the increasing need for stevia seeds or seedlings. Tissue culture is able to fulfill this deficiency because it has the potential to produce large amounts of uniform plantlets. Tissue Culture Technique is a vegetative propagation of plants. Tissue culture includes the cultivation of cells or cell aggregates, tissues and organs of plants in a medium containing sugar, vitamins, amino acids, organic salts, water, growth regulators and compacting agents. The composition of the growing medium is also very beneficial for the growth of fungi and bacteria. Therefore, explant sterilization is an important factor in determining the success of a tissue culture program. The problem is that until now there is no optimal explant sterilization technique for Stevia tissue culture. The aim of this research is to find out the best explant sterilization method from a combination of several disinfectants on Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) explants which can remove contaminants on the explants. The main parameters observed were Source of Contamination (descriptive: shape and color), Percentage of Explants Alive, Percentage of Contamination, Percentage of Browning, and Time when contamination first appeared (Early). The results showed that the sterilization method F used running water, immersion in detergent for 10 minutes, immersion in 1.5% fungicide solution and 1.5% bactericide for 10 minutes, 70% alcohol immersion for 1 minute, 0.05% HgCl₂ immersion 3 minutes and immersion in 10% and 5% NaOCl respectively for 5 minutes had the lowest.

Keywords — Tissue culture, *Stevia rebaudiana*, Explant sterilization method

1. Pendahuluan

Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) dikenal sebagai tanaman pemanis alami non-kalori. Tanaman ini berasal dari dataran tinggi Paraguay di Amerika Selatan. Stevia termasuk famili Asteraceae, merupakan tanaman tahunan dengan habitus semi herba yang tingginya mencapai dua meter. Tanaman ini mengandung glikosida jenis steviosida terutama pada daun dengan tingkat kemanisan 100-300 kali lebih manis daripada gula pasir (Das et al. 2006; Madan et al. 2010). Rasa manis yang dihasilkan stevia dapat memiliki berbagai manfaat dalam kehidupan manusia. Sebagai pemanis, steviosida aman digunakan dan cocok untuk penderita diabetes karena secara klinis dapat mempertahankan kadar gula dalam darah. Selain itu, stevia juga berpotensi untuk dijadikan obat

hipoglikemik, kardiovaskular, anti mikroba, tonik pencernaan, serta perawatan gigi dan kulit (Geuns et al. 2004; Das et al. 2006; Gauchan et al. 2014). Manfaat stevia sebagai pemanis berpotensi untuk menyubstitusi sebagian penggunaan gula tebu di Indonesia. Hal ini dapat dilihat dari semakin berkembangnya pembudidayaan dan pengolahan tanaman stevia. Budidaya stevia secara komersial saat ini terdapat di Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah dan Kabupaten Bandung, Jawa Barat.

Pengembangan stevia dilakukan dengan perbanyakan tanaman secara generatif maupun vegetatif. Perbanyakan generatif dari stevia dapat dilakukan melalui benih sedangkan perbanyakan secara vegetatif dapat dilakukan melalui tunas, stek batang dan kultur jaringan (Sari, 2013). Penyediaan benih konvensional melalui benih memiliki tingkat keberhasilan rendah, sedangkan perbanyakan dengan stek batang dan pucuk

akan menghasilkan tanaman yang tidak identik pada kualitas tanaman yang diharapkan (Anisa Hadiyana, dkk. 2015). Teknik perbanyakan secara kultur jaringan dapat digunakan untuk menghasilkan bibit dan planlet mikro dalam jumlah banyak, seragam, *true of tipe*, dalam waktu relatif singkat, dan tidak tergantung musim (Ragapadmi, 2002). Kultur jaringan stevia dilaporkan melalui multiplikasi tunas, organogenesis dan embriogenesis somatik (Sumaryono dan Sinta, 2011).

Teknik Kultur Jaringan merupakan perbanyakan tumbuhan secara vegetatif. Kultur jaringan meliputi penanaman sel atau agregat sel, jaringan dan organ tanaman pada medium yang mengandung gula, vitamin, asam-asam amino, garam-garam organik, zat pengatur tumbuh, air dan bahan pematid (agar). Komposisi media tumbuh tersebut sangat menguntungkan bagi pertumbuhan jamur dan bakteri. Oleh karena itu, sterilisasi eksplan menjadi faktor penting dalam menentukan keberhasilan program kultur jaringan. Apabila eksplan yang kurang steril maka dimungkinkan 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 (Nur Asni Setiani, dkk.2018).

Pemilihan metode sterilisasi eksplan yang tepat didasarkan pada jenis desinfektan dan lamanya waktu perendaman. Desinfektan merupakan bahan kimia yang digunakan untuk membunuh atau menurunkan jumlah mikroorganisme. Desinfektan yang biasa digunakan dalam kultur jaringan diantaranya natrium hipoklorit, alkohol, bakterisida,

fungisida dan sublimat. Akan tetapi desinfektan dan waktu perendaman memberikan pengaruh yang berbeda pada setiap jenis tanaman (Nur Asni Setiani, dkk.2018). Sehingga pada penelitian ini dilakukan sterilisasi pada eksplan diantaranya menggunakan natrium hipoklorit, alkohol, bakterisida, fungisida dan atau sublimat pada eksplan stevia dengan teknik sterilisasi yang berbeda untuk mendapatkan metode sterilisasi terbaik yang dapat menurunkan kontaminasi.

2. Metodologi

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember, di Jember, Jawa Timur mulai bulan Juni sampai November 2022.

Bahan yang digunakan dalam pelaksanaan penelitian ini adalah bahan tanam (eksplan) yang digunakan adalah eksplan satu ruas batang bibit tanaman Stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) umur 2 bulan. Klon diperoleh dari plasma Nutfah



Balai Penelitian Tanaman Obat dan Rempah Bogor.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bakterisida bactocyn, fungisida benlate, larutan stok MS, akuades, agar-agar swallow, alkohol 96%, spiritus, aluminium foil, plastic wrapping dan plastik tahan panas.

Alat yang digunakan adalah Erlenmeyer 1000 ml, gelas ukur 100 ml, beaker glass, pipet volume, petrisidh, disetting set, botol kultur, timbangan analitik, autoclave, laminar air flow cabinet, lampu Bunsen, rak kultur dengan lama penyinaran 16 hari, kulkas dan alat tulis

2.1. Metode Percobaan

Pada Percobaan ini menggunakan metode deskriptif eksplanatif untuk menggambarkan dan menjelaskan bagaimana kontaminasi stek setelah diberikan beberapa metode sterilisasi dengan 100 (serratus) sampel pada setiap metode. Pada Percobaan ini dilakukan inisiasi kultur stek

Stevia rebaudiana Bertoni dimana tahapannya meliputi:

- Pembuatan Media Inisiasi
- Sterilisasi eksplan dan dilanjutkan penanaman eksplan
- Pengamatan sterilitas eksplan

2.2. Pelaksanaan Percobaan Pembuatan Media Inisiasi

Media tanam *Murashige and Skoog (MS)* tanpa Zat Pengatur Tumbuh digunakan sebagai media inisiasi stek *Stevia rebaudiana* Bertoni. Untuk memudahkan pembuatan media tanam maka sebelumnya dibuat terlebih dahulu larutan stok MS. Media tanam dibuat dengan cara memipet larutan stok sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan. Kemudian media diukur menggunakan pH meter sekitar 5,8. Dalam 1 liter media membutuhkan agar sebanyak 8 gr/l, kemudian media dimasak bersama agar sampai mendidih diatas kompor. Selanjutnya, media dituang ke dalam botol kultur sebanyak 25 ml, dan ditutup dengan penutup botol. Kemudian media disterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 121⁰ C selama 30 menit. Media yang selesai disterilisasi disimpan dalam ruang kultur selama 3 hari sebelum digunakan.

2.3. Sterilisasi Eksplan Stek Satu Ruas Tanaman (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Setelah pembuatan media dilakukan proses sterilisasi terhadap eksplan berupa stek satu ruas *Stevia rebaudiana* Bertoni (umur 2 bulan). Metode Teknik Sterilisasi yang akan dilakukan antara lain:

2.3.1. Teknik Sterilisasi Metode A

Eksplan direndam dengan air steril terlebih dahulu selama kurang lebih 20 detik yang selanjutnya Selama 10 menit akan direndam dengan alkohol 70 %. Selanjutnya dibilas dengan akuades steril, kemudian direndam lagi dengan larutan HgCl₂ + *asam askorbat* (C₆H₈O₆) 10 menit. Lalu dibilas kembali dengan akuades steril, selanjutnya lakukan perendaman terakhir dengan larutan NaOCL + Fungisida konsentrasi 2% + 0,1 g/l selama 5 menit. Kemudian bilas eksplan dengan akuades steril 3-4 kali pembilasan.

2.3.2. Teknik Sterilisasi Metode B

Eksplan direndam dengan air steril terlebih dahulu selama kurang lebih 20 detik, selanjutnya direndam kembali dengan larutan NaOCL (*Natrium hipoklorit*) konsentrasi 10 % selama 10 menit. Setelahnya dibilas dengan akuades steril, lakukan kembali perendaman kedua dengan Alkohol konsentrasi 80% selama 5 menit. Bilas kembali menggunakan akuades steril, perendaman terakhir dengan larutan *mercury clorida* (HgCl₂) konsentrasi 0,1% selama 7 menit. Kemudian bilas eksplan dengan akuades steril 3- 4 kali pembilasan.

2.3.3. Teknik Sterilisasi Metode C

Eksplan direndam dengan air steril terlebih dahulu selama kurang lebih 20 detik, selanjutnya eksplan direndam dengan larutan *mercuryclorida* (HgCl₂) konsentrasi 0,03% selama 7 menit. Kemudian bilas dengan akuades steril, lakukan kembali perendaman dengan larutan NaOCL konsentrasi 2% selama 10 menit. Bilas kembali dengan akuades steril, lakukan perendaman terakhir dengan Alkohol konsentrasi 50% selama 10 menit. Kemudian bilas eksplan dengan akuades steril 3-4 kali pembilasan.



2.3.4. Teknik Sterilisasi Metode D

Eksplan direndam dengan Alkohol 70% selama $\pm$ 3 detik. Selanjutnya bilas dengan akuades steril sebanyak 3 x, dengan masing-masing pengulangan pembilasan selama 1 menit. Rendam kembali dengan Bayclin konsentrasi 10% selama 10 menit, dilanjutkan dengan perendaman Bayclin konsentrasi 20% selama 10 menit. Terakhir lakukan pembilasan dengan akuades steril sebanyak 3 x, dengan masing-masing pengulangan pembilasan selama 1 menit.

2.3.5. Teknik Sterilisasi Metode E

Eksplan dibersihkan di bawah air mengalir, kemudian dicuci sampai bersih dengan detergen cair dengan konsentrasi 2 ml/l selama 10 menit kemudian eksplan dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali, lalu eksplan direndam dalam larutan fungisida benlate + bakterisida bactocyn + antibiotik erythromycin dengan konsentrasi 2 gr/l + 2 gr/l + 4gr/l selama 20 menit, selanjutnya dibilas dalam akuades steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya eksplan direndam alkohol 70% selama 1 menit dan dibilas kembali menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Setelah itu, eksplan direndam dalam larutan HgCl₂ dengan konsentrasi 0,05 % selama 5 menit, kemudian eksplan direndam NaOCl + tween20 dengan konsentrasi 10% + 10 tetes/l selama 5 menit, selanjutnya eksplan direndam NaOCl + tween20 dengan konsentrasi 20 % + 10 tetes/l selama 5 menit. Kemudian eksplan dicuci dengan akuades steril 3 kali lalu ditanam langsung pada media.

2.3.6. Teknik Sterilisasi Metode F

Eksplan dibersihkan di bawah air mengalir, kemudian dicuci sampai bersih dengan detergen cair dengan konsentrasi 2 ml/l selama 10 menit dan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali, lalu eksplan direndam dalam larutan fungisida benlate + bakterisida bactocyn dengan konsentrasi 1,5% + 1,5% selama 10 menit dan selanjutnya dibilas dalam akuades steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya eksplan direndam alkohol 70% selama 1 menit dan dibilas kembali menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Setelah itu, eksplan direndam dalam larutan HgCl₂ dengan konsentrasi 0,05 % selama 3

menit, kemudian eksplan direndam NaOCl + tween 20 dengan konsentrasi 10% + 10 tetes/l selama 5 menit, selanjutnya eksplan direndam NaOCl + tween20 dengan konsentrasi 5 % + 10 tetes/l selama 5 menit. Kemudian eksplan dicuci dengan akuades steril 3 kali lalu ditanam langsung pada media.

Botol media kembali ditutup dengan penutup botol dan disimpan dalam ruang kultur dengan suhu (23 + 1)°C. Semua kegiatan Teknik Sterilisasi eksplan di atas dilakukan secara aseptik di dalam Laminar Air Flow Cabinet

2.4. Pengamatan sterilitas eksplan (selama 8 minggu)

Parameter yang diamati adalah:

2.4.1. Sumber Kontaminasi (*deskriptif: bentuk dan warna*)

Pengamatan terhadap sumber kontaminasi pada percobaan ini menunjukkan bahwa sumber kontaminan pada eksplan disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Kontaminasi terdiri dari kontaminasi eksternal baik berupa jamur maupun bakteri, begitu pula kontaminasi internal yang tumbuh di dalam jaringan tanaman umumnya berasal dari jamur dan bakteri.

2.4.2. Persentase Hidup Eksplan

Yaitu jumlah eksplan yang dapat hidup dan aseptik, dengan kriteria memiliki pertumbuhan tunas dan/atau akar dibandingkan jumlah seluruh eksplan.

2.4.3. Persentase Kontaminasi

Yaitu jumlah eksplan yang mengalami kontaminasi bakteri dan/atau jamur dibandingkan dengan seluruh jumlah eksplan

2.4.4. Persentase Pencokelatan (*browning*)

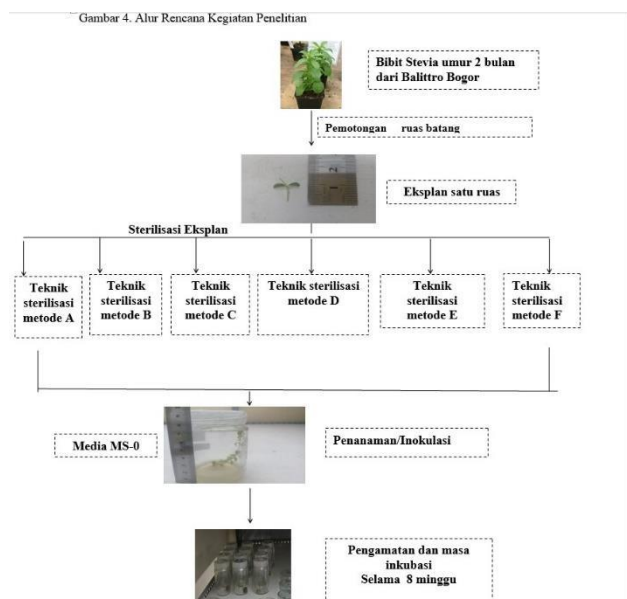
Yaitu jumlah eksplan yang mengalami pencokelatan dibandingkan dengan jumlah seluruh eksplan

2.4.5. Waktu pertama kali muncul kontaminasi

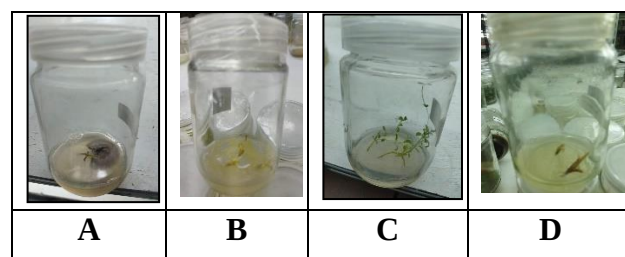
Yaitu waktu dari awal tanam/inokulasi eksplan sampai muncul pertama kali kontaminan.



Gambar 1. Alur Kegiatan Penelitian



Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri ditandai dengan munculnya cairan berupa lendir lengket berwarna putih kekuningan pada bagian pangkal eksplan satu ruas stevia dan kemudian menyebar di permukaan media dapat dilihat pada Gambar 4.1B, sedangkan gambar 4.1 C memperlihatkan eksplan tidak mengalami kontaminasi.



Kontaminasi pada eksplan, A) kontaminasi jamur; B) kontaminasi bakteri dan C) eksplan tidak kontaminasi D) Browning

3. Pembahasan

Tabel 1. Teknik sterilisasi terhadap eksplan satu ruas Stevia

No.	Metode Sterilisasi	Bahan Sterilisasi	Kosentrasi	Waktu
1	Metode A	Alkohol	70%	10 menit
		HgCl ₂ + asam askorbat (C ₆ H ₈ O ₆)	0,1 % + 2g/l	10 menit
		NaOCL + fungisida	2 % + 0,1 g/l	5 menit
		NaOCL (Natrium Hipoklorit)	10%	10 menit
2	Metode B	Alkohol	80%	5 menit
		Mercury Clorida (HgCl ₂)	0,1 %	7 menit
		Mercury Clorida (HgCl ₂)	0,03%	7 menit
3	Metode C	NaOCL (Natrium Hipoklorit)	2%	10 menit
		Alkohol	50%	10 menit
		Akohol	70%	3 detik
4	Metode D	Bayclin	10%	10 menit
		Bayclin	20%	10 menit
5	Metode E	Fungisida + bakterisida + Antibiotik	2 g/l+2 g/l+4g/l	20 menit
		Alkohol	70%	1 menit
		HgCl ₂	0,05%	5 menit
		NaOCL + tween 20	10%+10tetes/l	5 menit
		NaOCL + tween 20	20%+10tetes/l	5 menit
		NaOCL + tween 20	20%+10tetes/l	5 menit
6	Metode F	Fungisida + bakterisida	1,5%+1,5%	10 menit
		Alkohol	70%	1 menit
		HgCl ₂	0,05%	3 menit
		NaOCL + tween 20	10%+10tetes/l	5 menit
		NaOCL + tween 20	5%+10tetes/l	5 menit
		NaOCL + tween 20	5%+10tetes/l	5 menit

3.1. Pengamatan Visual Sumber Kontaminasi

Salah satu permasalahan yang menghambat keberhasilan kultur jaringan adalah adanya kontaminasi dan browning. Pengamatan terhadap sumber kontaminasi pada percobaan ini menunjukkan bahwa sumber kontaminasi pada eksplan disebabkan oleh jamur dan bakteri (gambar 4.1).

Kontaminasi yang disebabkan oleh jamur ditandai oleh hifa-hifa berwarna putih keabu-abuan yang menyerang bagian atas eksplan dapat dilihat pada (Gambar 4.1A).

Kontaminasi yang disebabkan oleh fungi ditandai dengan munculnya koloni-koloni jamur yang menyebabkan media tanam ataupun eksplan berwarna abu-abu, putih, hijau, hitam maupun merah muda. Fungi dapat muncul dari eksplan ataupun dari spora yang berasal dari udara. Jamur dikenal dengan warna bervariasi dan struktur berhifa (Mastuti, 2017). Selain itu, kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri ditandai dengan munculnya cairan berwarna putih kekuningan. Pada penelitian ini kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri persentase 20% yaitu pada Teknik metode sterilisasi D.

Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri akan menyebabkan eksplan menjadi basah karena terdapat cairan berupa lendir sedangkan kontaminasi jamur ditandai dengan eksplan akan terlihat lebih kering dan muncul hifa jamur pada eksplan yang terserang dan dicirikan dengan garis-garis benang berwarna putih sampai abu (Asni et al., 2018). Bakteri tidak saja ada pada bahan tanaman di bagian permukaan tetapi kadang-kadang ada pada bagian dalam bahan tanaman. Biasanya bila ada di permukaan respons kontaminasinya sangat cepat, dalam tempo 24 jam sudah bisa terlihat. Tetapi bila bersifat internal responsnya muncul setelah beberapa hari bahkan sampai beberapa minggu sehingga hasilnya akan mengecewakan (Santoso dan Nursandi, 2003).

Fenomena terjadinya kontaminasi sangat beragam. Keragaman tersebut dapat dilihat dari jenis kontaminan yang lebih banyak di dominasi oleh jamur dibandingkan bakteri (Tabel 4.2). Tingkat serangan yang tinggi diakibatkan oleh sumber eksplan yang masih membawa kontaminasi dalam jumlah yang banyak sehingga sulit untuk ditanggulangi dengan keenam metode sterilisasi tersebut. Menurut Dwiyan (2015), Sumber kontaminasi berasal secara eksternal yaitu dari lingkungan kerja yang kurang steril sedangkan kontaminasi internal berasal dari dalam jaringan tanaman yang disebabkan prosedur sterilisasi permukaan eksplan kurang sempurna sehingga eksplan tidak terbebas dari mikroorganisme. Kontaminasi internal juga bersifat entogenus yang berada di dalam jaringan eksplan sehingga tidak dapat dimusnahkan hanya dengan sterilisasi permukaan.

Tabel 2. Hasil Metode Teknik sterilisasi eksplan satu ruas Stevia untuk persentase kontaminasi dan eksplan hidup sampai 8 minggu setelah kultur.

Metode Sterilisasi	Kontaminasi (%)				Eksplan Persentase Hidup pada Minggu Ke (%)							
	Bakteri	Jamur	Browning		1	2	3	4	5	6	7	8
A	0	100	0		80	60	40	0	x	x	x	x
B	0	100	0		40	0	x	x	x	x	x	x
C	0	100	0		40	0	x	x	x	x	x	x
D	20	80	0		0	0	x	x	x	x	x	x
E	0	0	100		0	x	x	x	x	x	x	x
F	0	20	0		100	100	100	80	80	80	80	80

Keterangan : (x) eksplan tidak ada yang hidup.

Keterangan : (x) eksplan tidak ada yang hidup.

3.2. Pengamatan Eksplan Hidup

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa sterilisasi Metode F dimana eksplan dibersihkan dibawah air mengalir, kemudian dicuci sampai bersih dengan detergen cair dengan konsentrasi 2 ml/l selama 10 menit dan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali, lalu eksplan direndam dalam larutan fungisida benlate + bakterisida bactocyn dengan konsentrasi 1,5% + 1,5% selama 10 menit dan selanjutnya dibilas dalam akuades steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya eksplan direndam alkohol 70% selama 1 menit dan dibilas kembali menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali. Setelah itu, eksplan direndam dalam larutan HgCl₂ dengan konsentrasi 0,05 % selama 3 menit, kemudian eksplan direndam NaOCl + tween 20 dengan konsentrasi 10% + 10 tetes/l selama 5 menit,

selanjutnya eksplan direndam NaOCl + tween20 dengan konsentrasi 5 % + 10 tetes/l selama 5 menit. Kemudian eksplan dicuci dengan akuades steril 3 kali lalu ditanam langsung pada media, memiliki persentase kontaminasi terendah yaitu 20 % dan presentasi hidup tertinggi yaitu 80 % dibandingkan dengan metode sterilisasi yang lain. Secara umum kontaminasi yang terjadi pada kultur jaringan Stevia adalah diakibatkan oleh kontaminasi jamur, hanya 20% kultur yang terkontaminasi oleh bakteri yaitu dari Teknik sterilisasi Metode D (Tabel 4.2).

Metode sterilisasi F yang memiliki persentase kontaminasi paling rendah, yaitu 20% dan persentase eksplan hidup paling tinggi yaitu 80% sampai minggu ke 8 dibandingkan dengan perlakuan lainnya, sedangkan Metode F kontaminasi terjadi oleh jamur pada minggu ke 4.

Metode sterilisasi A, kontaminasi yang disebabkan oleh jamur dengan persentase kontaminasi mencapai 100% berturut-turut pada minggu ke 1, dan 2 mencapai 20%; 40%serta minggu ke 4 mencapai 60%. Pada Metode sterilisasi B dan C belum mampu mengatasi kontaminasi yang disebabkan oleh jamur, dengan kontaminasi masing-masing mencapai persentase 100%, pada minggu ke 1 masing-masing mencapai 60%.

Menurut Zulkarnain (2009), Pada Metode sterilisasi dengan menggunakan HgCl₂ menunjukkan tingkat kontaminasi yang lebih rendah dibandingkan dengan yang tidak menggunakan HgCl₂ penggunaan HgCl₂ telah terbukti efektif untuk sterilisasi bahan tanaman dari yang berasal dari lapang atau luar. Penggunaan HgCl₂ merupakan bahan terakhir yang digunakan apabila bahan-bahan lain ternyata tidak mampu untuk membunuh mikroorganisme seperti bakteri dan jamur yang menginfeksi bahan tanaman. Menurut Zulkarnain (2009), Penelitian dengan menggunakan HgCl₂ 0,5% sebagai bahan sterilisasi eksplan nodus tanaman nangka dengan hasil yang maksimal serta penggunaan HgCl₂ 0,05% untuk sterilisasi eksplan nodus tanaman lada dengan hasil yang baik. HgCl₂ bersifat antiseptik karena mampu

berkombinasi dengan protein selular dan mendenaturasikannya (Sandra, 2013). Metode F dan E, penggunaan HgCl_2 membutuhkan waktu yang lebih sedikit karena bersifat racun sedangkan sterilisasi menggunakan bahan HgCl_2 yang terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan pada eksplan sehingga eksplantidak akan mampu tumbuh (Hendaryono dan Wijayani,1994).

3.3. Pengamatan Browning

Selain kontaminasi, eksplan juga mengalami mati fisiologis. Ciri kultur mati fisiologis diawali dengan pencokelatan (browning). Browning (gambar 4 D) merupakan suatu karakter munculnya warna coklat atau hitam, sering kali membuat pertumbuhan dan perkembangan eksplan terhambat dan mengakibatkan kematian pada jaringan. Browning merupakan proses atau peristiwa teroksidasinya senyawa fenol menjadi quinon yang berasal dari eksplan. Pada percobaan ini persentase kulturbrowning paling besar diperoleh pada Metodesterilisasi E sebesar 100%, penyebab browning salah satunya adalah tindakan sterilisasi yang berlebihan (Santoso dan Nursandi, 2003). Faktor teknis juga mempengaruhi terjadinya browning, seperti penggunaan scalpel dan pinset yang masih panas danlamanya proses pengeringan eksplan yang sudah disterilisasi dari larutan sterilan pada saat penanaman di ruangan kultur.

3.4. Pengamatan Kedinian Kontaminasi

Munculnya kontaminasi dari semua Metode sterilisasi yang diterapkan dimulai hari ke 3 pada minggu ke 1 setelah dilakukan proses penanaman. Kontaminasi merupakan faktor yang dominan dalam mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan terutama pada eksplan. Eksplan dari jenis tanaman yang berbeda, kadang kala berbeda pula teknik dan bahan sterilannya, sehingga perlu pengkajian lebih dalam (Fitriani, dkk., 2019). Metode sterilisasi yangtepat sangat dibutuhkan dalam perbanyakan tanaman secara in vitro dan menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur (Lazo-Javalera et al., 2016).

Bahan tanam atau eksplan yang digunakan dalam kultur jaringan harus bebas dari kontaminan, antara lain jamur dan bakteri. Selama proses sterilisasi, eksplan harus tetap hidup dan hanya kontaminan berupa jamur dan bakteri yang dihilangkan. Hal ini sesuai pernyataan Apriliyana & Wahidah (2021) bahwa prinsip sterilisasi eksplan adalah mematikan mikroorganisme kontaminan tanpa mematikan jaringan eksplan. Umur dan ukuran eksplan juga mempengaruhi proses sterilisasi yang dilakukan karena berkaitan dengan konsentrasi dan waktu dari bahan sterilan yang digunakan dalam kultur jaringan.

4. Kesimpulan

Sterilisasi Metode F menggunakan air mengalir, perendaman dengan detergen selama 10 menit, perendaman dengan larutan fungisida 1,5% dan bakterisida 1,5% selama 10 menit, perendaman alkohol 70% selama 1 menit, perendaman HgCl_2 0,05% 3 menit serta perendaman dalam NaOCl masing-masing 10% dan 5% selama 5 menit memiliki persentase kontaminasi paling rendah yaitu 20 % dan presentasi hidup paling tinggi yaitu 80 %.

5. Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Direktur Politeknik Negeri Jember, Ketua Pusat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (P3M), Ketua Jurusan Produksi Pertanian, Kepala Laboratorium dan teknisi laboratorium kultur jaringan, serta semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] Anisa Hadiyana, dkk. 2015. Iniasi Tunas Secara Kultur Jaringan Pada Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Dengan Konsentrasi IBA dan BAP Yang Berbeda. Universitas Sultan Ageng Tirtayasa. Serang
- [2] Bapat, V. A., M. Mhatre, and P. S. Rao. 1987. Propagation of *Morus Indica* L. (Mulberry.) by Encapsulated Shoot Buds. *Plant Cell Rep.* 6 : 393-395.
- [3] Bapat, 1993. Studies on synthetic seeds of sandalwood (*Santalum album* L.) mulberry (*Morus indica* L.). p. 381 – 407.
- [4] Das K, Dang R, Rajasekharan PE. 2006. Establishment and maintenance of callus *Stevia*



rebaudiana Bertoni under aseptic environment. Nat Product Radiance. 5(5):373-376.

- [5] Djajadi, 2014. Pengembangan Tanaman Pemanis Stevia rebaudiana B. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Malang
- [6] Ermayanti, T. D, dkk. 2017. Peningkatan Pertumbuhan Kultur Tunas Stevia rebaudiana Bertoni pada Media dengan Peningkatan Kadar Vitamin dan Glisin serta Penggunaan Jenis Tutup Tabung Berbeda. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Bogor
- [7] Fardiaz, D. 1989. Hidrokolid. Lab. Kimia dan Biokimia Pangan Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB. Bogor. Hal 360.
- [8] Gauchan DP, Dhakal A, Sharma N, Bhandari S, Maskey E, Shrestha N, Gautam R, Giri S, Gurung S. 2014. Regenerative callus induction and biochemical analysis of Stevia rebaudiana Bertoni. J Adv Lab Res Biol. 5(3):41-45.
- [9] Haris, N dan Mathius Toruan, N. 1995. Teknologi In Vitro Untuk Pengadaan Benih Tanaman Perkebunan. Warta Puslit Biotek Perkebunan I (1), 2 – 9.
- [10] Luwanska, A. et al. 2015. Application of in vitro stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) cultures in obtaining steviol glycoside rich material. Institute of Natural Fibres and Medicinal Plants. Poznan, Poland
- [11] Nower.2014. In vitro Propagation and Synthetic seeds Production : An Efficient Methods for Stevia rebaudiana Bertoni.Sugar Tech Volume 16.pages 100-108
- [12] Putri, Y. D, dkk. 2019. Formulasi dan Evaluasi Losion Tabir Surya Ekstrak Daun Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni). Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia. Bandung
- [13] Ragapadmi, P., 2002. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan beberapa Gen yang Mengendalikannya. Buletin Agrobio 5(2):51;58.
- [14] Sumaryono, Dan Sinta, M. M. 2018. Pertumbuhan, Produksi Biomassa, dan Kandungan Glikosida Steviol pada Lima Klon Stevia Introduksi di Bogor, Indonesia.
- [15] Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia. Bogor

