

JURNAL METAMORFOSA

Journal of Biological Sciences

eISSN: 2655-8122

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

Pengaruh Sterilisasi Tunggal dan Kombinasi pada Kultur *In Vitro* Nodus Kepel (*Stelechorcarpus burahol* Hook F. & Thomson)

The Effect of Single and Combination Sterilization on In Vitro Culture of Kepel (*Stelechocarpus burahol* Hook F. & Thomson) Nodes

Cindy Talenta Hutabarat¹, Ratih Restiani^{2*}, Aniek Prasetyaningsih²

Program studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana

Jl. Dr. Wahidin Sudirohusodo No.5-25 Daerah Istimewa Yogyakarta 55224 Indonesia

*Email: ratih.restiani@staff.ukdw.ac.id

INTISARI

Tanaman kepel termasuk dalam kategori *conservation dependent*. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mencegah kelangkaan tanaman kepel adalah melalui kultur *in vitro*. Hal utama yang menentukan keberhasilan kultur *in vitro* ialah sterilisasi eksplan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh sterilisasi tunggal dan kombinasi pada berbagai durasi perendaman terhadap waktu kontaminasi, persentase kontaminasi, persentase jenis kontaminan, dan persentase pertumbuhan eksplan. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dan ulangan sebanyak 3 kali untuk setiap perlakuan. Eksplan yang digunakan adalah eksplan nodus kepel *ex-vitro*. Perlakuan sterilisasi tunggal menggunakan klorox 10% dengan durasi perendaman 10, 15 dan 20 menit, etanol 70% dengan durasi perendaman 1, 3 dan 5 menit dan carbendazim 5% dengan durasi perendaman 10, 15, dan 20 menit sedangkan perlakuan sterilisasi kombinasi menggunakan (klorox 10% + etanol 70% + carbendazim 5%) dengan durasi perendaman 1 menit 30 detik, 3 menit 30 detik dan 5 menit 30 detik. Parameter yang diamati meliputi waktu kontaminasi, persentase kontaminasi, persentase jenis kontaminan, dan persentase pertumbuhan eksplan setelah 30 hari pengamatan. Hasil penelitian menunjukkan sterilisasi kombinasi dengan durasi 5 menit 30 detik lebih optimal dibandingkan sterilisasi tunggal dalam menurunkan persentase kontaminasi pada eksplan nodus tanaman kepel, dengan waktu kontaminasi selama 8-29 HST, persentase kontaminasi 66%, persentase jenis kontaminan terbanyak adalah jamur sebesar 66,66% dan eksplan yang tumbuh membentuk kalus sebesar 100%. Hasil penelitian ini dapat bermanfaat dalam mendukung keberhasilan perbanyak tanaman Kepel secara *in vitro*.

Kata kunci: sterilisasi, klorox, etanol, carbendazim, nodus Kepel

ABSTRACT

Kepel is categorized as a conservation-dependent plant. One of the solutions to conserve this plant is propagation through in vitro culture. The main factor that determines the success of in vitro culture is explant sterilization. Therefore, the present study aims to determine the effect of single and combined sterilization at various treatment duration. This research uses a completely randomized design. The explants used were Kepel plant nodes ex-vitro. There are, 3 groups consisting control, 10% chlorox single sterilant with an immersion time of 10, 15, and 20 minutes, 70% ethanol with an immersion time of 1, 3, and 5 minutes, carbendazim 5% with an immersion time of 10, 15, and 20 minutes and a combination sterilant (10% chlorox + 70% ethanol + 5% carbendazim) with treatment duration of 1 minute 30 seconds, 3 minutes 30 seconds and 5 minutes 30 seconds. Parameters observed

were the time of contamination, percentage of contamination, and type of contamination, also percentage of growth of explant after 30 days of observation. The results showed combination sterilant of 5 minutes 30 seconds was more optimal than a single sterilant in suppressing contamination of the nodal explants of the Kepel plant, with contaminants appearing time of 8-29 DAI (Days After Inoculation), the percentage of contamination 66%, contaminant type (fungi) 66.66% and growth of explant (callus) 100%. This result is beneficial for the establishment of propagation of Kepel nodes using *in vitro* culture.

Keyword: sterilization, chlorox, ethanol, carbendazim, Kepel nodes

PENDAHULUAN

Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook F. & Thomson), spesies dari famili Annonaceae merupakan tanaman buah asli Indonesia dan menjadi flora identik Daerah Istimewa Yogyakarta karena memiliki nilai filosofi bagi masyarakat dan lingkungan Keraton Yogyakarta (Angio & Firdiana, 2021; Handayani *et al.*, 2020). Masyarakat memanfaatkan tanaman Kepel khususnya bagian buahnya sebagai *oral deodorant* untuk mencegah bau badan (Angio & Firdiana, 2021; Darusman *et al.*, 2012). Penelitian oleh Darusman *et al.*, (2012) telah membuktikan secara empiris bahwa ekstrak buah dan biji Kepel secara signifikan menurunkan bau feses dan urine serta dapat mengaktifkan probiotik *Bifidobacter sp*. Selain itu, buah Kepel juga bermanfaat untuk mencegah peradangan pada ginjal, peluruh air seni, alat kontrasepsi alami (pencegah kehamilan) (Suparmi *et al.*, 2015). Bagian daun tanaman Kepel juga bermanfaat sebagai *antihyperuricemic* (menurunkan kadar asam urat), pencegah kanker dan sebagai sumber antioksidan alami (Hatmi & Widyayanti, 2011; Sunarni *et al.*, 2016). Meskipun memiliki banyak manfaat dalam bidang kesehatan, namun budidaya tanaman Kepel oleh masyarakat masih relatif rendah. Hal ini disebabkan buah Kepel memiliki ukuran biji yang relatif lebih besar (27%) dibandingkan ukuran buahnya yang dapat dikonsumsi yaitu sebesar 49% sehingga hal ini menurunkan nilai ekonomi dari buah tersebut (Hatmi & Widyayanti, 2011; Tisnadjaja *et al.*, 2006). Selain itu, kendala utama dalam budidaya tanaman Kepel adalah perbanyakan secara generatif melalui biji membutuhkan waktu

perkecambahan yang relatif lama hingga 4- 6 bulan karena masa dormansi yang cukup panjang serta perbanyakan melalui stek atau cangkok menghasilkan anakan yang lebih sedikit (Angio & Firdiana, 2021; Isnaeni & Habibah, 2014).

Nilai ekonomi buah Kepel yang rendah dan kendala dalam perbanyakan tanaman Kepel menyebabkan status konservasi tanaman Kepel saat ini berada dalam *conservation dependent* (CD) yang artinya tanaman Kepel sudah jarang (*rare*) ditemui. Upaya yang dapat dilakukan untuk mencegahnya dari kelangkaan adalah melalui kultur *in vitro* (Habibah *et al.*, 2013; Handayani *et al.*, 2022; Handayani *et al.*, 2021; Isnaeni & Habibah, 2014). Kultur *in vitro* merupakan teknik perbanyakan bagian tanaman dalam medium yang dilengkapi dengan nutrisi serta zat pengatur pertumbuhan (ZPT) yang dibutuhkan untuk regenerasi eksplan dalam kondisi aseptis dan lingkungan yang terkontrol (Bhojwani & Dantu, 2013). Oleh karena itu, kultur *in vitro* dapat digunakan untuk mengatasi kendala perbanyakan tanaman Kepel secara generatif dan vegetatif.

Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan perbanyakan melalui kultur *in vitro* adalah tahap sterilisasi eksplan. Sterilisasi merupakan salah satu tahap persiapan eksplan yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran dan mikrobia yang menempel pada permukaan maupun dalam jaringan eksplan sehingga eksplan yang dikulturkan dalam kondisi steril atau aseptis (Anggoro *et al.*, 2022; Handayani *et al.*, 2021). Tahap sterilisasi yang tidak optimal menyebabkan tingginya kontaminasi pada kultur, eksplan mengalami browning dan berakhir pada kematian eksplan (Anggoro *et al.*,

2022; Hesami *et al.*, 2019). Optimasi tahap sterilisasi setiap jenis tanaman atau bahkan bagian tanaman yang sama dapat berbeda satu dengan yang lain. Selain itu, asal eksplan baik berasal dari kultur *in vitro* maupun *ex vitro* (lapangan) serta perbedaan jenis eksplan membutuhkan teknik sterilisasi yang berbeda (Bhojwani & Dantu, 2013; Handayani *et al.*, 2022; Handayani *et al.*, 2021).

Dalam upaya meningkatkan keberhasilan kultur *in vitro*, maka diperlukan teknik sterilisasi yang optimal. Sterilisasi eksplan umumnya dilakukan dengan mencuci eksplan menggunakan detergen cair dan membilasnya di bawah air mengalir kemudian dilanjutkan dengan perendaman dalam bahan sterilan kimiawi yaitu klorox (NaOCl), alkohol (ethanol) hidrogen peroksida (H₂O₂), merkuri klorida (HgCl₂), bakterisida, fungisida, dan antibiotik (Anggoro *et al.*, 2022; Handayani *et al.*, 2021; Hesami *et al.*, 2019; Sen *et al.*, 2013). Diantara beberapa jenis fungisida, Carbendazim merupakan salah satu jenis fungisida yang efektif menghambat pertumbuhan jamur pada eksplan khususnya yang berasal dari tanaman berkambium (Anggoro *et al.*, 2022; Sen *et al.*, 2013).

Beberapa penelitian terdahulu telah berhasil membuktikan bahwa penggunaan sterilisasi kombinasi lebih efektif dibandingkan sterilisasi tunggal dalam menekan persentase kontaminasi. Anggoro *et al.* (2022) melaporkan bahwa kombinasi klorox 100% selama 15 menit + Carbendazim 2g/L selama 20 menit merupakan sterilisasi kombinasi terbaik dalam mengurangi tingkat kontaminasi jamur pada eksplan nodus bambu petung sebesar 33,33% dan mendukung pertumbuhan tunas pada 6 HST sebesar 33,33%. Selain itu, Jan *et al.* (2013) juga melaporkan bahwa kombinasi Sodium hipoklorit 1,5% selama 20 menit + alkohol 70% selama 30 detik menghasilkan kultur nodus strawberi aseptis sebesar 78,33% namun eksplan yang hidup relatif rendah sebesar 21,66%. Hal ini menunjukkan efektivitas pemilihan jenis sterilisasi tunggal atau kombinasi perlu mempertimbangkan konsentrasi sterilan dan durasi perendaman. Teknik sterilisasi yang efektif sebaiknya dapat

mengurangi kontaminasi namun tidak bersifat toksik bagi jaringan eksplan dan menyebabkan eksplan mengalami nekrosis bahkan mati (Hesami *et al.*, 2019).

Beberapa penelitian mengenai optimasi sterilisasi eksplan *Stelechocarpus burahol* telah dilakukan. Habibah *et al.* (2013) melaporkan bahwa kombinasi perendaman fungisida selama 24 jam dilanjutkan bakterisida dan fungisida selama 30 menit, dilanjutkan dalam alkohol 70% dan klorox 10% selama 10 menit merupakan sterilan yang optimal dalam menekan kontaminasi pada eksplan daun *S.burahol*. Selain itu, Handayani *et al.* (2021) juga berhasil mengoptimasi sterilisasi eksplan endosperm kepel secara *in vitro* menggunakan NaOCl (klorox) 10% selama 10 menit dan menghasilkan eksplan hidup sebesar 44,44% serta tidak terjadi kontaminasi dan browning. Pada penelitian lanjutan, Handayani *et al.*, (2022) juga berhasil melaporkan sterilan yang optimal pada kultur embrio *S.burahol* menggunakan NaOCl (klorox) 5% selama 5 menit dan menghasilkan eksplan hidup sebesar 88,89 %, browning sebesar 11,11% serta tidak terjadi kontaminasi. Sejauh ini, belum ada informasi mengenai optimasi sterilisasi eksplan nodus *S.burahol* secara *in vitro*. Oleh karena itu penelitian ini penting untuk dilakukan sehingga dapat dijadikan informasi bagi metode perbanyak tanaman Kepel secara *in vitro* menggunakan eksplan nodus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui teknik sterilisasi eksplan yang optimal untuk mengurangi kontaminasi namun tetap dapat mempertahankan pertumbuhan eksplan nodus *Stelechorcarpus burahol* dalam kultur *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Dasar Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta pada bulan Maret hingga Mei 2021.

Persiapan Eksplan

Eksplan nodus *Stelechocarpus burahol* diperoleh dari Pasar Tanaman Hias (Pasty), Yogyakarta (*ex-vitro*). Tanaman kepel yang dipilih sebagai sumber eksplan adalah tanaman

yang sehat, berumur 1 – 2 tahun ditandai dengan nodus yang masih berwarna hijau segar dan jaringannya tidak keras. Nodus yang digunakan dalam penelitian ini adalah nodus urutan ke-2 sampai ke-4 dari pucuk cabang tanaman kepel.

Sterilisasi Eksplan

Eksplan yang telah disiapkan selanjutnya dicuci di bawah air mengalir untuk menghilangkan debu dan kotoran yang menempel pada eksplan. Eksplan selanjutnya direndam dalam larutan antiseptik dan dibilas. Eksplan dicuci menggunakan detergen cair dan tween 80 sebanyak 3 tetes kemudian dibilas menggunakan akuades steril sampai bersih. Eksplan yang telah bersih disimpan dalam petridish steril dan dibawa ke dalam *Laminar Air Flow* (LAF) untuk dilanjutkan tahap sterilisasi. Sterilisasi eksplan dalam LAF menggunakan variasi perlakuan yang disajikan pada Tabel 1. Setelah eksplan disterilisasi selanjutnya dicuci dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Eksplan ditanam ke dalam botol kultur yang berisi media MS dan Kinetin 2 ppm. Kultur dipelihara pada suhu 25⁰ C dan kondisi 24 jam terang selama 30 hari.

Pengamatan

Pengamatan kultur meliputi waktu kontaminasi, persentase kontaminasi, persentase jenis kontaminan dan persentase pertumbuhan eksplan. Pengamatan dilakukan setelah 30 hari setelah tanam (HST).

Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif dan kualitatif. Data selanjutnya dianalisis secara deskriptif untuk melihat pengaruh sterilisasi tunggal dan kombinasi terhadap beberapa parameter yang diamati. Perhitungan data kuantitatif adalah sebagai berikut:

Persentase Kontaminasi (%)

$$= \frac{\text{jumlah eksplan yang kontam}}{\text{total eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

Persentase pertumbuhan eksplan (%)

$$= \frac{\text{jumlah eksplan tumbuh (Kalus/Akar)}}{\text{total eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

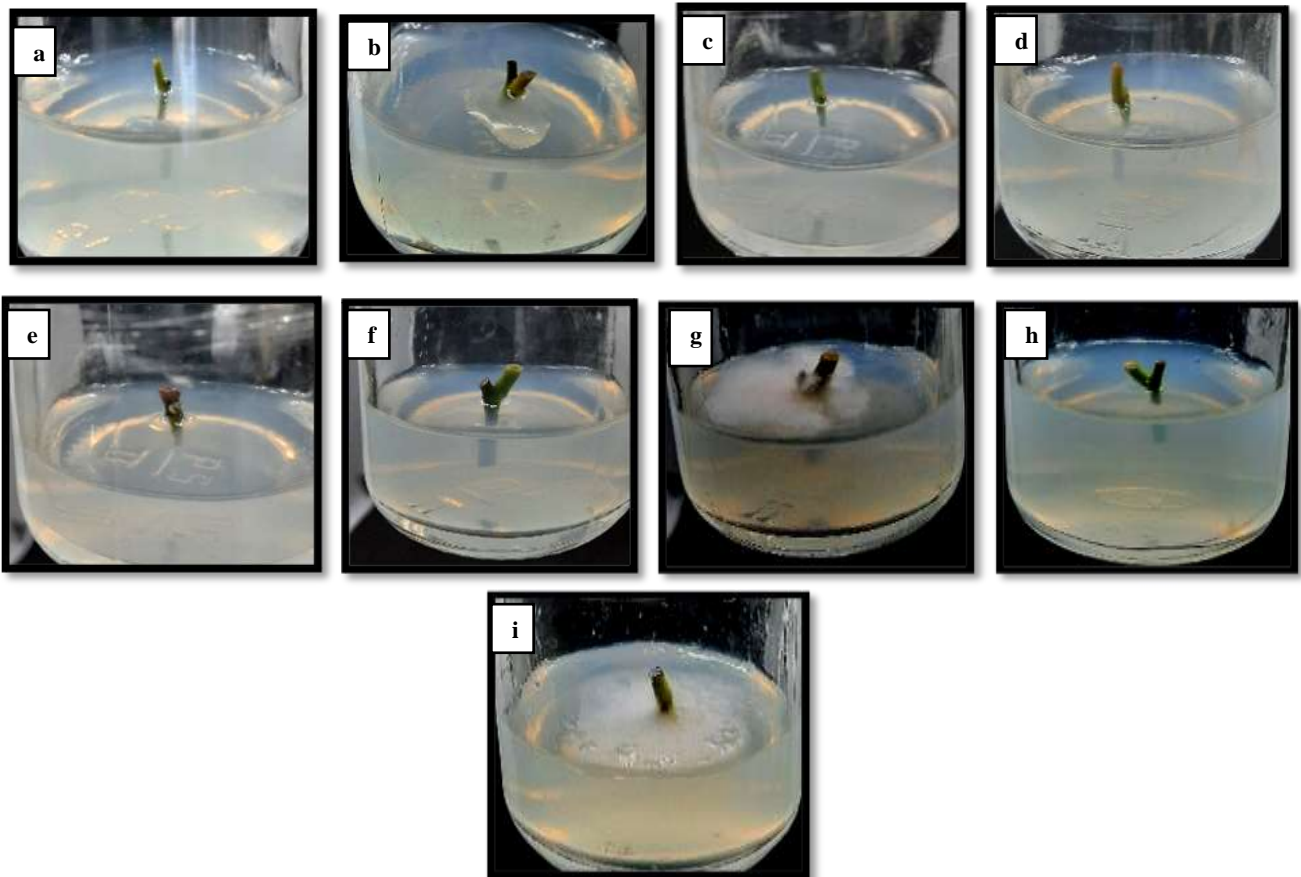
Persentase jenis kontaminan (%)

$$= \frac{\text{jumlah eksplan kontam (Bakteri/jamur)}}{\text{total eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

Tabel 1. Variasi Perlakuan Sterilisasi pada eksplan nodus *S. burahol*

Perlakuan	Sterilan	Durasi Perendaman
		10 menit
	Klorox 10%	15 menit
		20 menit
Sterilan Tunggal		1 menit
	Etanol 70%	3 menit
		5 menit
		10 menit
	Carbendazim 5%	15 menit
		20 menit
Sterilan Kombinasi	Klorox 10% + Etanol 70% + Carbendazim 5%	1 menit 30 detik
		3 menit 30 detik
		5 menit 30 detik

HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 1. Perkembangan waktu kontaminasi pada eksplan nodus tanaman kepel (a) Kontrol 1 HST (b) Kontrol 2 HST kontaminasi bakteri (c) Etanol 70% hari ke- 1 menit 7 HST (d) Etanol 70% 1 menit 14 HST (e) Etanol 70% 1 menit 21 HST (f) Carbendazim 5% 15 menit 1 HST (g) Carbendazim 5% 15 menit 5 HST kontaminasi jamur (h) Klorox 10% 15 menit hari ke- 1 HST (i). Klorox 10% 15 menit 3 HST kontaminasi jamur.
Keterangan : HST = Hari Setelah Tanam

Waktu Kontaminasi

Sterilisasi eksplan merupakan salah satu tahap penting dalam pelaksanaan kultur *in vitro*. Eksplan harus berada dalam kondisi aseptis bebas dari kontaminan sehingga dapat tumbuh dengan optimal. Tabel 2 menunjukkan pengaruh variasi sterilisasi terhadap waktu kontaminasi pada eksplan nodus selama 30 hari kultur. Berdasarkan hasil tersebut, waktu kontaminasi muncul pada eksplan bervariasi.

Pada eksplan yang tidak disterilisasi (kontrol) menunjukkan waktu kontaminasi eksplan nodus kepel berlangsung paling cepat yaitu 2-3 HST. Pada perlakuan sterilan tunggal

(etanol 70%) durasi perendaman 1 menit menunjukkan waktu munculnya kontaminasi yaitu 6-24 HST. Pada perlakuan sterilan kombinasi (klorox 10% + etanol 70% + carbendazim 5%) dengan lama perendaman eksplan 1 menit 30 detik menunjukkan waktu muncul kontaminasi paling lama yaitu 6-30 HST. Perkembangan waktu kontaminasi dapat dilihat pada Gambar 1.

Perbedaan waktu kontaminasi ini disebabkan jenis kontaminan eksternal maupun internal. Berdasarkan waktu kontaminasi pada eksplan nodus tanaman kepel dapat

dikategorikan sebagai kontaminan eksternal, dengan waktu kontam kurang dari 7 hari setelah tanam (HST). Kontaminasi eksternal atau kontaminasi permukaan tanaman umumnya tumbuh setelah 2 hari setelah tanam sedangkan kontaminasi internal atau kontaminasi yang bersumber dari jaringan eksplan tanaman muncul lebih lama dari 7 hari bahkan hingga satu bulan (Anggoro *et al.*, 2022; Handayani *et al.*, 2021). Selain itu, eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan nodus *ex-vitro* sehingga peluang kontaminasi eksternal maupun internal relatif lebih tinggi. Kontaminasi internal berasal dari kontaminan yang terbawa dari dalam jaringan tanaman

eksplan, sedangkan kontaminan eksternal berasal dari permukaan eksplan (Pratiwi *et al.*, 2021). Kontaminasi eksternal atau kontaminasi permukaan eksplan ini dapat di tangani melalui sterilisasi *mother plant*. Dalam penelitian ini *mother plant* dari tanaman kepel dikoleksi dari pasar tumbuhan yang kemudian dipelihara di lingkungan laboratorium. Habibah *et al.* (2013) menyatakan tindakan pengendalian tanaman yang tepat sewaktu di lapangan (*in vivo*) dapat mengurangi tingkat kontaminasi awal dan akan mengurangi kekuatan konsentrasi bahan sterilan yang digunakan, sehingga mengurangi efek kerusakan terhadap jaringan eskplan.

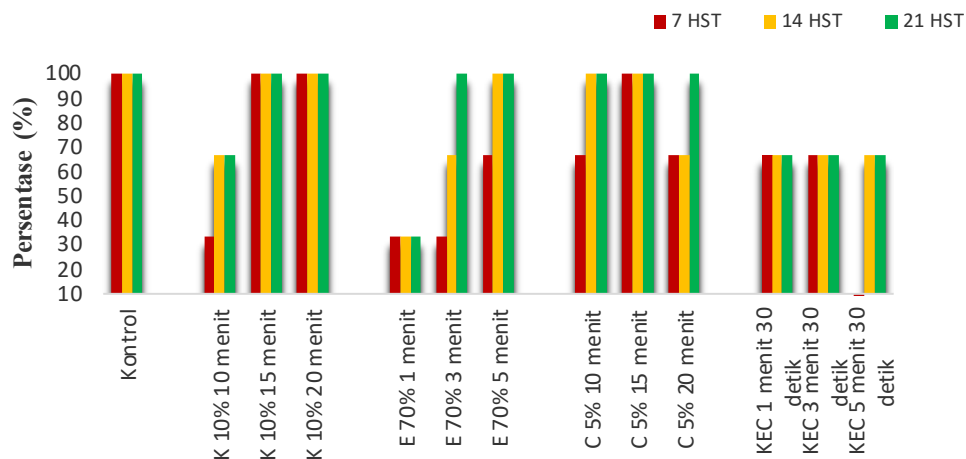
Tabel 2. Pengaruh variasi sterilisasi terhadap waktu kontaminasi eksplan nodus kepel selama 30 hari pengamatan

Perlakuan	Sterilan	Durasi Perendaman	Waktu Kontaminasi (HST)
Kontrol	-	-	2-3
	Klorox 10%	10 menit	7-20
		15 menit	3-6
		20 menit	4-6
Sterilan Tunggal	Etanol 70%	1 menit	6-24
		3 menit	7-15
		5 menit	5-9
	Carband azim 5%	10 menit	6-13
		15 menit	5-7
		20 menit	7-15
Sterilan Kombinasi	Klorox 10% + Etanol 70% + Carbend azim 5%	1 menit 30 detik	6-30
		3menit 30 detik	4-27
		5 menit 30 detik	8-29

Persentase Kontaminasi

Persentase kontaminasi menunjukkan efektivitas bahan sterilan yang digunakan dalam mengurangi kontaminasi. Persentase kontmaninasi disajikan pada Gambar 2. Kontrol menunjukkan persentase kontaminasi sebesar 100% selama 30 hari pengamatan. Perlakuan sterilasi tunggal dan kombinasi menunjukkan pengaruh yang bervariasi. Perlakuan sterilisasi tunggal etanol 70% selama 1 menit menunjukkan persentase kontaminasi sebesar 33,33%, sedangkan pada perlakuan sterilisasi kombinasi (klorox 10% + etanol 70% + carbendazim 5%) selama 5 menit 30 detik menunjukkan persentase kontaminasi sebesar 66,66%.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, durasi perendaman pada sterilasi tunggal maupun kombinasi tidak menunjukkan pengaruh terhadap persentase kontaminasi. Sterilisasi tunggal etanol 70% selama 1 menit menunjukan hasil yang lebih baik dibandingkan etanol 70% dengan durasi perendaman selama 5 menit.



Gambar 2. Persentase kontaminasi nodus kepel selama 30 hari pengamatan

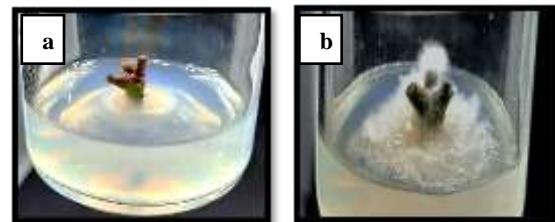
Sterilisasi tunggal klorox 10% selama 10 menit menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan durasi perendaman 20 menit. Hal ini dapat disebabkan karena durasi perendaman selama 10 menit merupakan kondisi optimal bagi eksplan nodus kepel dalam membunuh kontaminan. Hal ini juga dapat dipengaruhi jenis sterilan yang digunakan. Jenis sterilan yang digunakan adalah bahan kimia disinfektan yang memiliki mekanisme dalam menekan kontaminan yang berbeda.

Penggunaan klorox (NaOCl) sebagai sterilan permukaan berbagai jenis eksplan tanaman telah banyak dilaporkan (Anggoro *et al.*, 2022; Handayani *et al.*, 2022; Handayani *et al.*, 2021; Jan *et al.*, 2013; Pratiwi *et al.*, 2021; Oo *et al.*, 2018). NaOCl efektif menekan kontaminasi di bagian permukaan jaringan tanaman. Alkohol mengurangi terjadinya kontaminasi pada tahap sterilisasi dengan cara membunuh bakteri melalui mekanisme denaturasi protein sel bakteri penyebab kontaminasi (Setiani *et al.*, 2018). Carbendazim (*methyl 1H-benzimidazol-2-ylcarbamate*) merupakan fungisida sistemik dengan spektrum luas yang digunakan untuk mengendalikan jamur (Anggoro *et al.*, 2022; Koukouvinos *et al.*, 2021; Sen *et al.*, 2013).

Beberapa sterilan dapat menjadi toksik bagi jaringan eksplan apabila konsentrasi dan durasi perendaman tidak sesuai. Selain itu jenis eksplan yang digunakan juga mempengaruhi

efektivitas sterilisasi, berbeda jenis eksplan akan memberikan respon yang berbeda.

Persentase Jenis Kontaminan

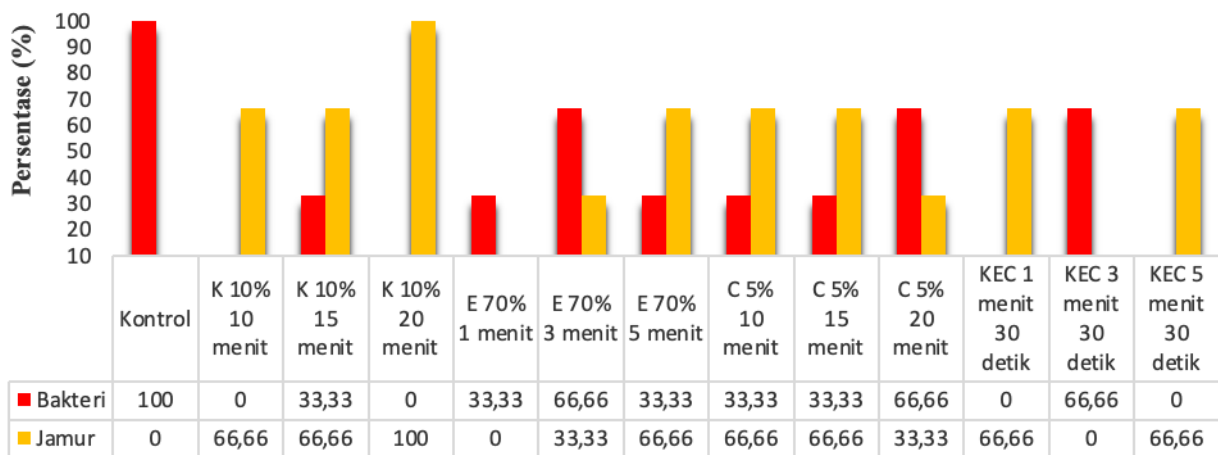


Gambar 3. Pertumbuhan jenis kontaminan pada eksplan nodus tanaman kepel (a) kontaminan bakteri (b) kontaminan jamur

Berdasarkan data persentase jenis kontaminan pada Gambar 4 menunjukkan bahwa jenis kontaminan pada eksplan nodus kepel adalah jamur dan bakteri. Kontaminasi yang disebabkan oleh kontaminan jamur diamati dengan munculnya serabut hifa berwarna putih, koloni berwarna putih di sekitar eksplan. Selain itu, kontaminasi yang disebabkan bakteri ditandai dengan munculnya lendir di sekitar eksplan nodus. Lendir yang muncul diawali dengan warna bening dan kental, kemudian di hari berikutnya berwarna kuning keruh kecoklatan, untuk lebih jelas dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan hasil persentase jenis kontaminan eksplan nodus kepel, kontrol menunjukkan persentase jenis

kontaminan bakteri sebesar 100%. Sterilan klorox 10% dengan durasi perendaman 10, 15 dan 20 menit optimal dalam mengurangi pertumbuhan kontaminan bakteri, sebaliknya sterilan klorox belum optimal dalam mengurangi kontaminan jamur, dapat dilihat dari persentase jenis kontaminan yang dihasilkan. Hal tersebut dikarenakan masing-masing sterilan memiliki fungsi yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan mikrobia.

Sterilan seperti NaOCl, etanol dan *tween* diketahui menghambat pertumbuhan jamur dan bakteri pada media tumbuh (Omamor *et al.*, 2007). NaOCl bekerja dengan memasuki jaringan mikroba dan berperan dalam merubah biosintesis sel, memasuki metabolisme sel, merusak struktur fosfolipid, dan merusak jaringan organik pada sel-sel mikroba (Marion *et al.*, 2012).



Gambar 4. Persentase jenis kontaminan eksplan nodus kepel selama 30 hari pengamatan

Handayani *et al.* (2021) menjelaskan bahwa, NaOCl dikenal efektif membunuh bakteri karena bersifat hipertonis sehingga dapat menyebabkan mikrobia mengalami osmolisis bahkan dengan konsentrasi mikromolar sudah mampu menekan bakteri secara signifikan. Hal ini sejalan dengan penelitian Habibah *et al.* (2013) yang menggunakan klorox 15% dan 10% mampu mengeliminasi kontaminan bakteri namun tidak pada kontaminan jamur endofit pada eksplan daun tanaman kepel. Hal berbeda ditunjukkan sterilan tunggal etanol 70% dengan variasi durasi perendaman 1, 3 dan 5 menit, dan carbendazim 5% dengan variasi lama perendaman 10, 15 dan 20 menit. Sterilan etanol 70% lebih optimal menekan persentase jenis kontaminan jamur dibandingkan carbendazim 5%. Hal ini disebabkan alkohol berperan sebagai bakterisida dan sekaligus fungisida dengan mekanisme aksi denaturasi protein dari mikroorganisme kontaminan

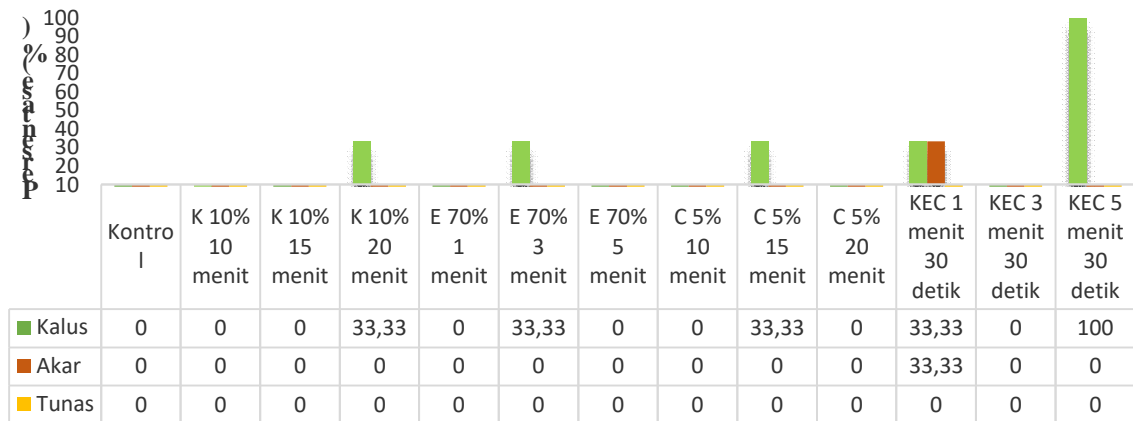
(Pratiwi *et al.*, 2021). Carbendazim merupakan fungisida belum optimal dalam mengurangi persentase jenis kontaminan jamur. Hal ini dapat dilihat dari persentase jenis kontaminan jamur yang masih tinggi (66,66%). Hal ini dapat disebabkan eksplan nodus tanaman kepel membutuhkan waktu perendaman eksplan yang lebih lama. Dalam penelitiannya, Habibah *et al.* (2013) melakukan perendaman eksplan daun kepel di dalam sterilan fungisida selama 24 jam. Selain itu kontaminan jamur memiliki spora yang kecil dan ringan sehingga mudah terbawa oleh udara, hal ini menyebabkan waktu kontaminasi lebih cepat dan berdampak pada persentase jenis kontaminan. Jenis eksplan yang digunakan juga berpengaruh dalam persentase jenis kontaminan. Hal tersebut dikarenakan nodus memiliki ruang antar sel berukuran besar sehingga rawan mengalami luka dan memberikan peluang masuknya spora jamur (Ray & Ali, 2017).

Sterilan kombinasi lebih optimal menekan kontaminan jenis bakteri. Sterilisasi kombinasi terdiri dari beberapa jenis sterilant yang memiliki mekanisme berbeda dalam menghambat pertumbuhan mikrobia. Berdasarkan fungsi dan kekuatan setiap jenis sterilan ketika dikombinasikan tidak menjadi toksik bagi eksplan. Sterilisasi kombinasi memberikan hasil yang stabil, jika dilihat berdasarkan waktu kontaminasi, persentase kontaminasi dan persentase jenis kontaminan. Berdasarkan hasil pengamatan persentase jenis kontaminan pada eksplan nodus tanaman kepel didominasi oleh kontaminan jenis jamur. Hal ini mengindikasikan kontaminan jamur endofit pada eksplan nodus tanaman kepel. Putri *et al.*, (2017) menjelaskan adanya perbedaan potensi pertumbuhan dan status metabolik endogen jenis tanaman menjadi penyebab perbedaan tingkat interaksi dengan lingkungan makro maupun mikro sehingga menyebabkan adanya perbedaan diversitas kontaminan pada teknik kultur *in vitro*.

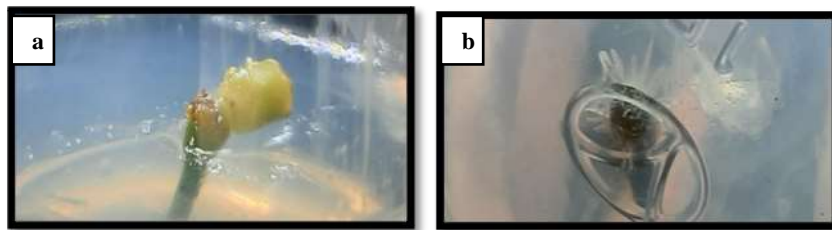
Persentase Pertumbuhan Eksplan

Pada perlakuan sterilasi kombinasi, persentase eksplan yang berhasil tumbuh lebih banyak dibandingkan dengan sterilan tunggal. Sterilan kombinasi dengan durasi perendaman 5 menit 30 detik mampu menghasilkan persentase eksplan yang tumbuh (kalus) sebesar 100% (Gambar 5). Respon pertumbuhan eksplan nodus kepel diawali dengan pembengkakan pada bagian nodus yang mengalami pelukaan. Dalam perkembangan selanjutnya, dari bagian yang mengalami pembengkakan tersebut berubah warna menjadi kuning (Gambar 6). Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Bhojwani & Dantu (2013) yang menyatakan bahwa adanya pertumbuhan eksplan dapat dilihat dari adanya perubahan

warna, pembengkakan eksplan hingga terbentuknya baik kalus, akar maupun tunas. Efektivitas sterilisasi eksplan juga ditentukan dari persentase eksplan yang dapat tumbuh. Perlakuan sterilisasi kombinasi menunjukkan waktu kontaminasi relatif lebih cepat dibandingkan dengan sterilisasi tunggal, namun pada persentase kontaminasi lebih stabil dan optimal dalam mengurangi persentase kontaminasi. Beberapa eksplan yang tidak mampu bertahan dan tidak tumbuh cenderung mengalami pencoklatan (*browning*), namun ada yang tidak mengalami kematian sama sekali hingga 30 HST. Hal ini diduga karena proses sterilisasi pada durasi perendaman yang relatif lama dan konsentrasi sterilan yang relatif tinggi sehingga menghambat pertumbuhan eksplan. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa perlakuan sterilisasi tunggal dan kombinasi berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan kontaminan pada eksplan nodus tanaman kepel dan tidak memberikan efek negatif terhadap pertumbuhan eksplan. Hal ini dapat dilihat dari persentase kontaminasi dan persentase pertumbuhan eksplan yang dihasilkan sterilisasi kombinasi (klorox 10% + etanol 70% + carbendazim 5%) dengan durasi perendaman 5 menit 30 detik. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan (Anggoro *et al.*, 2022; Habibah *et al.*, 2013) yang menyatakan bahwa sterilisasi kombinasi lebih efektif dibandingkan dengan sterilan tunggal pada eksplan nodus Bambu dan eksplan daun Kepel.



Gambar 5. Persentase pertumbuhan eksplan nodus kepel selama 30 hari pengamatan



Gambar 6. Perkembangan eksplan nodus Kepel (a) kalus 4 HST pada perlakuan sterilisasi kombinasi (Klorox+Ethanol+Carbandazim) 5 menit 30 detik (b) akar 5 HST pada perlakuan (Klorox+Ethanol+Carbandazim) 1 menit 30 detik

KESIMPULAN

Sterilisasi kombinasi (Klorox 10%+ Ethanol 70%+ Carbendazim 5%) dengan durasi perendaman eksplan 5 menit 30 detik merupakan teknik sterilisasi permukaan eksplan yang optimal dalam menghasilkan persentase kontaminasi sebesar 66,66% dan persentase pertumbuhan eksplan sebesar 100%.

DAFTAR PUSTAKA

Anggoro, H. D., Restiani, R., & Aditiyarini, D. 2022. Optimasi Sterilisasi Eksplan Pada Kultur *In Vitro* Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*). *Biotika*.19(2): 49–60

Angio, M. H., & Firdiana, E. R. 2021. Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook & Thompson), Buah langka khas keraton Yogyakarta: Sebuah koleksi kebun raya Purwodadi. *Warta Kebun Raya*. 19(2):7-13

Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. 2013. Plant tissue culture: An introductory text. In *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>

Darusman, H. S., Rahminiwati, M., Sadiyah, S., Batubara, I., Darusman, L. K., & Mitsunaga, T. 2012. Indonesian Kepel fruit

- (*Stelechocarpus burahol*) as oral deodorant. *Research Journal of Medicinal Plant*. 6(2) : 180–188
- Habibah, N. A., Sumadi, & Ambar, S. 2013. Optimization of Leaf Surface Sterilization and Endophytic Elimination on Burahol. *Biosaintifika*. 5(2): 95–98
- Handayani, E., Irsyadi, M. B., Alawiyah, R. L. M. N., & Aris, I. 2022. Effect of Explants Sterilization and Plant Growth Regulators on Embryo Culture of Kepel (*Stelechocarpus burahol*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 985(1): 1–8. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/985/1/012016>
- Handayani, E., Nandariyah, Cahyani, V. R., & Parjanto. 2020. Morphological characters of kepel (*Stelechocarpus burahol*) from Kulon Progo, Yogyakarta, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 458(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/458/1/012012>
- Handayani, Etty, Irsyadi, M. B., Aris, I., Alawiyah, R. L. M. N., Ayuningtias, N., Permatasari, F., & Rineksane, I. A. 2021. Optimasi Sterilisasi Endosperma Kepel (*Stelethocarpus burahol* [Bl] Hook F. & Th) Secara In Vitro. *BIO-EDU: Jurnal Pendidikan Biologi*. 6(2) : 113–121 <https://doi.org/10.32938/jbe.v6i2.1179>
- Hatmi, R. U., & Widyayanti, S. 2011. Potensi kepel (*Stelechocarpus burahol* [Blume] Hook.F & Th.) Sebagai Sumber Pangan Fungsional. *Prosiding Seminar Nasional Sumber Daya Genetik Pertanian*. 22 : 248–257
- Hesami, M., Naderi, R., & Tohidfar, M. 2019. Modeling and optimizing In vitro sterilization of *Chrysanthemum* via multilayer perceptron-non-dominated sorting genetic algorithm-II (MLP-NSGAI). *Frontiers in Plant Science*, 10(March) : 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00282>
- Isnaeni, E., & Habibah, N. 2014. Efektivitas Skarifikasi dan Suhu Perendaman terhadap Perkecambahan Biji Kepel [*Stelechocarpus Burahol* (Blume) Hook. F & Thompson] Secara *In Vitro* dan *Ex Vitro*. *Jurnal MIPA*.37(2): 105–114
- Jan, A., Bhat, K. M., Bhat, S. J. A., Mir, M. A., Bhat, M. A., Wani, I. A., & Rather, J. A. 2013. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown Strawberry explants intended for in vitro culture. *African Journal of Biotechnology*.12(39): 5749–5753. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12918>
- Koukouvinos, G., Karachaliou, C. E., Raptis, I., Petrou, P., Livaniou, E., & Kakabakos, S. 2021. Fast and sensitive determination of the fungicide carbendazim in fruit juices with an immunosensor based on white light reflectance spectroscopy. *Biosensors*.11(5):1–16. <https://doi.org/10.3390/bios11050153>
- Marion, J. J. C., Manhães, F. C., Bajo, H., & Duque, T. M. 2012. Efficiency of different concentrations of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Literature review. *Dental Press Endodontics*. 2(4) :32–37.
- Omamor, I. B., Asemota, A. O., Eke, C. R., & Eziashi, E. I. 2007. Fungal contaminants of the oil palm tissue culture in Nigerian institute for oil palm research (NIFOR). *African Journal of Agricultural Research*.2(10): 534–537. <http://www.academicjournals.org/AJAR>
- Oo, K. T., Oo, K. S., & Mon, Y. 2018. Establishment of Efficient Surface Sterilization Protocol on Different Types of Field Grown Strawberry Explants (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of Scientific and Innovative Research*. 7(3):70–74. <https://doi.org/10.31254/jsir.2018.7303>
- Pratiwi Rahma, Wening Sri, Nazri, Y. 2021. Penggunaan Alkohol dan Sodium Hipoklorit Sterilan Sterilisasi Eksplan Kelapa Sawit. *Kelapa Sawit*. 29(1):1–10.
- Putri, A. I., Herawan, T., Prastyono, P., & Haryjanto, L. 2017. Pengaruh Teknik Sterilisasi Explan Terhadap Tingkat Perolehan Kultur Jaringan Aksenik Ramin (*Gonystylus bancanus*). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*. 11(2): 131–138.

- <https://doi.org/10.20886/jpth.2017.11.2.13>
1-138
- Ray, S. S., & Ali, N. 2017. Biotic Contamination and Possible Ways of Sterilization: A Review with Reference to Bamboo Micropropagation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 60 (December): 1–12. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160485>
- Sen, M. K., Hassan, M., Nasrin, S., Mostofa, M. A. H., & Dash, B. K. 2013. In vitro sterilization protocol for micropropagation of *Achyranthes aspera* L . node. *International Research Journal of Biotechnology*. 4(5): 89–93. <http://www.interestjournals.org/IRJOB>
- Setiani, N. A., Nurwinda, F., & Astriany, D. 2018. Pengaruh Desinfektan dan Lama Perendaman pada Sterilisasi Eksplan Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson ex. F.A Zorn) Fosberg). *Biotropika Journal of Tropical Biology*. 6(3): 78–82. <https://doi.org/10.21776/ub.biotropika.2018.006.03.01>
- Sunarni, T., Leviana, F., Fidrianny, I., Immaculata, M., & Wirasutisna, K. R. 2016. Antihyperuricemic and xanthine oxidase inhibitory activities of fractions from ethanolic leaves extract of *Stelechocarpus burahol*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 9(6): 255–258. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9i6.14314>
- Suparmi, S., Isradji, I., Yusuf, I., Fatmawati, D., Hapsari Ratnaningrum, I., Fuadiyah, S., Indra Wahyuni1, I., & Amelia Rahmah, D. (2015). Anti-Implantation Activity of Kepel (*Stelechocarpus burahol*) Pulp Ethanol Extract in Female Mice. *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research*. 4(3): 94–99. <https://doi.org/10.21776/ub.jpacr.2015.004.03.220>
- Tisnadjaja, D., Saliman, E., Silvia, S., & Simanjuntak, P. 2006. Study of burahol (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook & Thomson) as an antioxidative compounds containing fruit. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 7(2): 199–202. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d070223>