



## PERBANDINGAN METODE STERILISASI UNTUK PERBANYAKAN *Rubus rosifolius* SECARA *IN VITRO*

### COMPARISON OF STERILIZATION METHODS FOR *IN VITRO* PROPAGATION OF *RUBUS ROSIFOLIUS*

Muhammad Imam Surya\*, Lily Ismaini

Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya - LIPI, Jl Ir. H. Juanda No.13 Bogor 16122

\*Corresponding author: [muhammad.imam.surya@lipi.go.id](mailto:muhammad.imam.surya@lipi.go.id)

Naskah Diterima: 1 Juli 2020; Direvisi: 21 Agustus 2020; Disetujui: 17 Desember 2020

#### Abstrak

*Rubus rosifolius* adalah salah satu jenis rasberi liar yang memiliki potensi cukup tinggi untuk dikembangkan sebagai tanaman buah. Selain itu, metode perbanyakan tanaman merupakan salah satu faktor yang berpengaruh dalam pembudidayaan. Lebih lanjut, informasi terkait upaya perbanyakan *R. rosifolius* secara *in vitro* masih sangat terbatas. Percobaan ini ditujukan untuk mengetahui metode sterilisasi yang tepat pada eksplan *R. rosifolius*. Sebanyak 17 metode sterilisasi telah diujicobakan di Laboratorium Kultur Jaringan BKT Kebun Raya Cibodas-LIPI. Bahan sterilisasi yang digunakan, yaitu detergen, tween 80, bakterisida, fungisida, *clorox*/pemutih (NaClO), alkohol 70%, larutan *Plant Preservative Mixture* (PPM), vitamin C/asam askorbat, dan *povidone iodine*/antiseptik. Hasil percobaan menunjukkan bahwa metode sembilan merupakan metode sterilisasi yang cukup optimum untuk sterilisasi eksplan *R. rosifolius*. Metode sembilan mampu menghambat munculnya mikroorganisme endofitik hingga 8 hari dan tidak menyebabkan warna eksplan menjadi cokelat/*browning*. Tahapan sterilisasi pada metode sembilan meliputi pencucian dengan detergen, perendaman dengan bakterisida + fungisida selama  $\pm 30$  menit, perendaman dengan *clorox* 10% + tween 80 selama  $\pm 15$  menit, pencucian dengan larutan PPM selama  $\pm 15$  menit.

**Kata kunci:** Eksplan; *In vitro*; Metode; *Rubus rosifolius*; Sterilisasi

#### Abstract

*Rubus rosifolius* is one of the species from wild raspberries, which is has high potential to develop as a fruit crops. In the other hand, the technique of plant propagation became an important factor for cultivation. Moreover, the information related to the *in vitro* propagation of *R. rosifolius* is very limited. This experiment was aimed to determine the best method to sterilize an explant of *R. rosifolius*. About 17 methods of sterilization have been tried in the laboratory of tissue culture at Cibodas Botanical Garden-Indonesian Institute of Sciences. The combination of detergent, tween 80, bactericide, fungicide, sodium hypochlorite (NaClO), alcohol 70%, plant preservative mixture (PPM), ascorbic acid, and povidone iodine were used during the experiment. The results show that the method of sterilization number nine could be inhibit the emergence of endophytic organisms for eight days and keep an explant in green with a little brownish compared by the others methods. The method of sterilization number nine was consist of several steps i.e. wash by detergent, soak in bactericide + fungicide for  $\pm 30$  minutes, soak in sodium hypochlorite 10% + tween 80 for  $\pm 15$  minutes, wash by PPM solution for  $\pm 15$  minutes.

**Keywords:** Explant; *In vitro*; Method; *Rubus rosifolius*; Sterilization

**Permalink/DOI:** <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v14i1.16325>

## PENDAHULUAN

*Rubus rosifolius* merupakan salah satu kelompok *wild raspberry* atau rasberi liar yang tumbuh di hutan pegunungan Indonesia (Surya, 2009). *R. rosifolius* termasuk ke dalam suku *Rosaceae*, sama seperti stroberi, apel, *pear*, *blackberry* maupun mawar. *R. rosifolius* merupakan tanaman buah yang memiliki potensi besar untuk dikembangkan dan dibudidayakan di Indonesia (Normasiwi & Surya, 2016). Lebih lanjut, pengembangan *R. rosifolius* dapat ditujukan ke arah buah segar, bahan baku makanan, minuman maupun industri serta berbagai jenis produk turunan lainnya. Namun, upaya pengembangan tersebut masih terkendala pada teknik pembudidayaan maupun perbanyakan bibit. Upaya perbanyakan bibit secara *in vitro* menjadi salah satu alternatif dalam pengembangan bibit *Rubus*. Kultur jaringan atau teknik perbanyakan *in vitro* merupakan salah satu teknik perbanyakan yang telah banyak digunakan baik untuk tanaman budi daya (Nofrianinda, Yulianti, & Agustina, 2018; Conger, 2018), hias (Dinarti, Sayekti, & Alitalia, 2010; Kulus & Woźny, 2020), perkebunan (Mariska & Suci, 2011; Harsanti, Dwimahyani, & Tarmizi, 2017; Kadir, Dahlia, & Darmawan, 2018) maupun hutan (Libby & Ahuja, 2013; Olivier, 2016; Akbar, Faridah, Indrioko, & Herawan, 2017). Kultur jaringan adalah cara perbanyakan dengan memanfaatkan bagian tanaman, seperti bagian tunas, daun, akar, sel, atau organ jaringan lainnya yang ditanam dalam botol dengan kondisi yang aseptik (Kumar & Loh, 2012). Perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan memberikan peluang yang besar untuk menghasilkan bibit tanaman sepanjang tahun dalam waktu relatif singkat, lebih ekonomis, dan berpotensi untuk dikomersialisasikan, seragam serta sifatnya yang identik dengan induknya (Hussain, Ahmed, Nazir, & Ullah, 2012).

Dalam perbanyakan kultur jaringan, terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan dari teknik

perbanyakan tersebut, di antaranya yaitu faktor lingkungan, stabilitas genetik, seleksi, sterilisasi terhadap bahan eksplan, cara mentransfer tanaman hasil teknik kultur jaringan, sifat totipotensi dari eksplan, dan nilai ekonomis kegiatan tersebut (Hendaryono & Wijayani, 1994). Lebih lanjut, dalam pelaksanaan kultur jaringan tanaman, salah satu gangguan yang sering terjadi disebabkan oleh kondisi dari bahan eksplan yang digunakan. Pada umumnya, tumbuhan yang berasal dari lapang mengandung debu, kotoran, hama, penyakit, dan berbagai kontaminan baik pada permukaan maupun bagian dalam jaringan. Oleh karena itu, mencegah dan menghindari kontaminasi merupakan hal mutlak yang perlu dilakukan dalam kegiatan kultur jaringan. Hal tersebut sangat menentukan untuk proses keberhasilan dalam perbanyakan tanaman dengan kultur jaringan. Untuk mencegah dan menghindari terjadinya kontaminasi perlu dilakukan proses sterilisasi. Kegiatan sterilisasi tidak hanya dilakukan pada bahan eksplan, tetapi juga terhadap bahan dan peralatan, serta ruangan yang digunakan. Proses sterilisasi bahan eksplan merupakan salah satu kegiatan penting dalam kultur jaringan. Kegiatan sterilisasi eksplan bertujuan untuk mengeliminasi mikroorganisme yang mungkin terbawa saat pengambilan eksplan, yang dapat menimbulkan kontaminasi sehingga menghambat pertumbuhan eksplan menjadi tanaman utuh. Sterilisasi bahan tanaman (eksplan) merupakan langkah awal yang cukup penting dan dapat menentukan keberhasilan penanaman secara *in vitro*. Eksplan yang akan ditanam pada media tumbuh harus bebas dari mikroorganisme kontaminan. Tahap sterilisasi sering menjadi kendala utama keberhasilan perbanyakan secara *in vitro*. Terlebih iklim tropis seperti Indonesia yang memungkinkan kontaminan seperti cendawan dan bakteri terus tumbuh sepanjang tahun (Balitbiogen, 2003). Kondisi tumbuhan yang terserang penyakit atau terkontaminasi mikroba tidak mudah

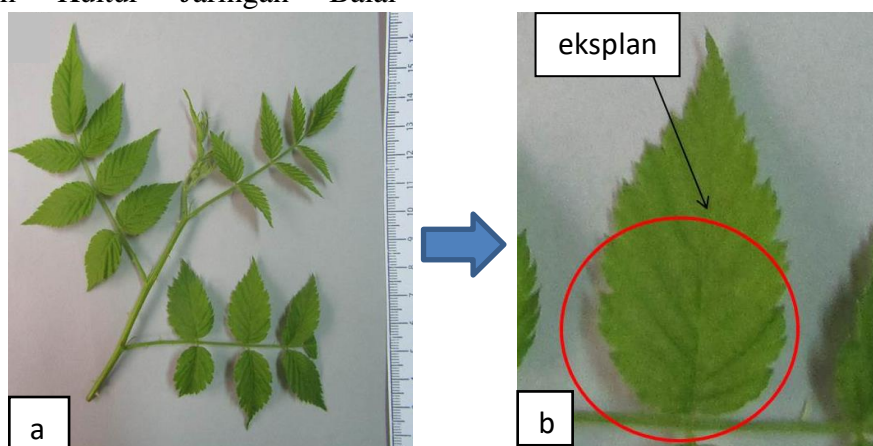
untuk digunakan dalam kegiatan pengkulturan. Selain itu faktor morfologi dari bahan eksplan yang digunakan seperti banyaknya bulu atau duri pada eksplan, tingkat kekerasan eksplan, kandungan air, tipe, usia maupun ukuran eksplan juga dapat menjadi hambatan dalam proses sterilisasi eksplan.

Metode sterilisasi dalam teknik kultur jaringan sangat bervariasi serta tergantung pada jenis tanaman, eksplan yang digunakan dan lingkungan tumbuhnya. Penggunaan eksplan tangkai anak daun dalam penelitian ini didasarkan pada hasil dari Lenz, Magnusson, dan Dai (2016) serta Lozinschii (2017) yang menyatakan bahwa perbanyakan secara *in vitro* pada spesies *Rubus* lebih efektif menggunakan eksplan yang berasal dari daun. Dengan diketahuinya bahan dan metode sterilisasi eksplan yang tepat, maka hal ini akan mempermudah proses perbanyakan bibit dan pengembangan tanaman *R. rosifolius*. Penelitian ini bertujuan untuk mencari bahan dan metode sterilisasi eksplan daun *R. rosifolius* yang tepat dalam perbanyakan tanaman secara *in vitro*.

## MATERIAL DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai

Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Cibodas, Cianjur - Jawa Barat. Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), autoklaf, oven, pisau, pinset, *scalpel*, gunting stek, timbangan digital, botol kaca, cawan petri, erlenmeyer, bunsen, kompor, gelas ukur. Bahan yang digunakan sebagai eksplan dalam penelitian yaitu tangkai anak daun *R. rosifolius* (Gambar 1) yang berasal dari tanaman koleksi Kebun Raya Cibodas, media Murashige & Skoog (MS), detergen, tween 80, bakterisida, fungisida, *clorox* (NaHClO)/pemutih, alkohol 70%, larutan *Plant Preservative Mixture* (PPM), vitamin C, *povidone-iodine*/antiseptik. Proses sterilisasi alat dilakukan dengan metode sterilisasi basah menggunakan autoklaf yang dilanjutkan dengan pengeringan di oven. Sterilisasi bahan tanam atau eksplan dibagi atas 17 metode sterilisasi (Tabel 1). Setiap tahapan dalam proses sterilisasi terdiri atas proses pencucian, pembilasan atau perendaman. Lebih lanjut, setiap metode sterilisasi minimal di ulang sebanyak tiga kali. Setelah proses sterilisasi, eksplan ditanam ke dalam botol kultur yang berisi media MS. Botol kultur disimpan pada ruang kultur dengan suhu  $\pm 20$  °C dan lama peyinaran 16:8 (*light:dark*) jam.



**Gambar 1.** Pucuk daun *R. rosifolius* (a) dan tangkai anak daun yang digunakan sebagai eksplan (b)

**Tabel 1.** Tujuh belas metode sterilisasi eksplan daun *Rubus rosifolius*

Tahapan	Metode 1	Metode 2	Metode 3	Metode 4	Metode 5	Metode 6	Metode 7	Metode 8	Metode 9
1	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen
2	Tween 80 ±1 menit	Tween 80 ±5 menit	Tween 80 ±5 menit	Bakterisida + fungisida ±30 menit	Bakterisida + fungisida ±30 menit	Bakterisida + fungisida ±30 menit	Bakterisida + fungisida ±30 menit	Bakterisida + fungisida ±30 menit	Bakterisida + fungisida ±30 menit
3	Bakterisida ±1 jam	Bakterisida ±2 jam	Bakterisida & fungisida ± 2 Jam	Vitamin C ±5 menit	Clorox 10% + tween 80 ±10 menit	Clorox 10% + tween 80 ±10 menit	Clorox 5% + tween 80 ±30 menit	Clorox 10% + tween 80 ±10 menit	Clorox 10% + tween 80 ±15 menit
4	Fungisida ±16 jam	Fungisida ±1 jam	Clorox 10% ±2 menit	Larutan PPM ±15 menit	Vitamin C ±5 menit	Clorox 5% + tween 80 ±10 menit	Larutan PPM ±15 menit	Clorox 5% + tween 80 ±10 menit	Larutan PPM ± 15 menit
5	Clorox 20% ±15 menit	Clorox 20% ±1 menit	Alkohol 70% ±1 menit	Clorox 20% ±1 menit	Larutan PPM ±15 menit	Ditanam	Vitamin C ±15 menit	Larutan PPM ±15 menit	Ditanam
6	Alkohol 70% ±1 menit	Vitamin C ±15 menit	Ditanam	Larutan PPM ±15 menit	Ditanam	-	Ditanam	Ditanam	-
7	Ditanam	Larutan PPM ±15 menit	-	Ditanam	-	-	-	-	-
8	-	Alkohol 70% ±1 menit	-	-	-	-	-	-	-
9	-	Ditanam	-	-	-	-	-	-	-

**Tabel 1.** (lanjutan)

Tahapan	Metode 10	Metode 11	Metode 12	Metode 13	Metode 14	Metode 15	Metode 16	Metode 17
1	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen + Tween 80	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen	Pencucian dengan detergen
2	Tween 80 ±5 menit	Tween 80 ±5 menit	Bakterisida + fungisida ±1 jam	Bakterisida + fungisida ±1 jam	Bakterisida + fungisida ±1 jam	Tween 80 ±15 menit	Tween 80 ±15 menit	Tween 80 ±15 menit
3	Bakterisida + fungisida ±30 menit	Bakterisida + fungisida ±45 menit	Clorox 10% ±5 menit	Clorox 10% ±5 menit	Clorox 15% ±5 menit	Bakterisida + fungisida ±30 menit	Bakterisida + fungisida ±30 menit	Bakterisida + fungisida ±30 menit
4	Clorox 10% + tween 80 ±10 menit	Clorox 10% ±5 menit	Clorox 5% ±20 menit	Clorox 5% ±20 menit	Larutan PPM ±15 menit	Clorox 10% ±10 menit	Clorox 25% ±5 menit	Clorox 10% ±10 menit
5	Clorox 5% + tween 80 ±5 menit	Clorox 5% ±3 menit	Larutan PPM ±15 menit	Larutan PPM ±15 menit	Vitamin C ±15 menit	Larutan PPM ±15 menit	Alkohol 70% ±1 menit	Clorox 25% ±5 menit
6	Ditanam	Ditanam	Vitamin C ±15 menit	<i>Povidone-iodine</i> ±1 menit	Ditanam	Ditanam	Larutan PPM ±15 menit	Larutan PPM ±15 menit
7	-	-	Ditanam	Ditanam	-	-	Ditanam	Alkohol 70% ±1 menit
8	-	-	-	-	-	-	-	Ditanam
9	-	-	-	-	-	-	-	-

**HASIL**

Berdasarkan hasil percobaan yang dilakukan dengan menggunakan 17 metode sterilisasi, diketahui bahwa waktu munculnya kontaminasi terlama ditunjukkan oleh metode sembilan selama delapan hari setelah tanam dan diikuti oleh metode delapan selama tujuh

hari setelah tanam. Sedangkan waktu kontaminasi tercepat ditunjukkan oleh metode satu dan metode tiga, yaitu selama tiga hari setelah tanam. Dari 17 metode sterilisasi tersebut diketahui rata-rata waktu kontaminasi berkisar antara 4–6 hari setelah tanam (Tabel 2).

**Tabel 2.** Rekapitulasi hasil perbandingan 17 metode sterilisasi

Metode sterilisasi	Lama waktu kontaminasi	Warna eksplan
Metode 1	3 hari setelah tanam	Cokelat
Metode 2	4 hari setelah tanam	Cokelat kehijauan
Metode 3	3 hari setelah tanam	Hijau kecokelatan
Metode 4	4 hari setelah tanam	Hijau
Metode 5	4 hari setelah tanam	Hijau kecokelatan
Metode 6	6 hari setelah tanam	Hijau kecokelatan
Metode 7	6 hari setelah tanam	Hijau kecokelatan
Metode 8	7 hari setelah tanam	Hijau kecokelatan
Metode 9	8 hari setelah tanam	Hijau kecokelatan
Metode 10	5 hari setelah tanam	Hijau kecokelatan
Metode 11	4 hari setelah tanam	Hijau
Metode 12	5 hari setelah tanam	Hijau
Metode 13	5 hari setelah tanam	Coklat kehijauan
Metode 14	5 hari setelah tanam	Hijau kecokelatan
Metode 15	5 hari setelah tanam	Hijau kecokelatan
Metode 16	5 hari setelah tanam	Cokelat kehijauan
Metode 17	6 hari setelah tanam	Cokelat kehijauan

**Gambar 2.** Kontaminasi yang terjadi pada eksplan daun *Rubus rosifolius***Gambar 3.** Hasil sterilisasi eksplan daun *Rubus rosifolius* dengan hasil akhir berwarna hijau kecokelatan

Kontaminasi (Gambar 2) yang terjadi pada eksplan tersebut dikelompokkan ke dalam dua jenis yaitu kontaminasi yang disebabkan

oleh jamur atau kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri. Untuk mencegah dan menanggulangi hal tersebut, dalam penelitian

ini telah digunakan beberapa bahan untuk mensterilkan eksplan di antaranya, detergen, tween 80, bakterisida, fungisida, pemutih, alkohol 70%, larutan PPM, vitamin C, dan *povidone-iodine*. Berdasarkan dari warna eksplan yang dihasilkan pasca sterilisasi, terlihat bahwa dari 17 metode tersebut dapat dikelompokkan menjadi empat kategori yaitu hijau, hijau kecokelatan, coklat kehijauan, dan coklat. Dari 17 metode tersebut, terdapat tiga metode yang tetap menghasilkan eksplan dengan warna hijau yaitu metode 4, 11, dan 12. Hal tersebut menunjukkan bahwa bahan dan waktu yang digunakan dalam proses sterilisasi sangat berpengaruh terhadap kualitas jaringan eksplan *R. rosifolius*. Lebih lanjut, Gambar 3 menunjukkan salah satu kategori warna eksplan pasca proses sterilisasi.

## PEMBAHASAN

Detergen merupakan salah satu bahan berupa tepung atau cairan yang digunakan untuk pembersih pakaian. Umumnya detergen yang digunakan untuk proses sterilisasi dalam kultur jaringan berbentuk tepung. Secara umum detergen terdiri atas surfaktan, *filler*, aditif, dan *builder*. Adapun bahan aktif yang umum digunakan dalam detergen yaitu sodium alkil *benzene* sulfonat sebesar 20%. Fungsi utama penggunaan detergen dalam sterilisasi, yaitu untuk melepaskan kotoran-kotoran yang melekat atau menempel pada eksplan. Selain itu, detergen juga mampu untuk membunuh bakteri dan jamur yang ada di luar jaringan. yang digunakan dalam proses sterilisasi.

Tween 80 adalah ester asam lemak polioksietilen sorbitan, dengan nama kimia polioksietilen 20 sorbitan monooleat yang memiliki rumus molekul, yaitu  $C_{64}H_{124}O_{26}$ . Karakteristik tween 80, pada suhu 25 °C berwujud cair, berwarna kekuningan, dan berminyak, memiliki aroma yang khas, dan berasa pahit, larut dalam air dan etanol, tidak larut dalam minyak mineral. Kegunaan tween 80 antara lain sebagai zat pembasah, emulgator, dan peningkat kelarutan (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009). Selain itu tween 80 juga berfungsi sebagai peningkat penetrasi (Akhtar et al., 2011). Dalam proses kultur jaringan, tween 80 seringkali dicampurkan dengan deterjen atau digunakan untuk

merendam jenis-jenis eksplan sebelum dilakukan proses sterilisasi.

Bakterisida adalah jenis pestisida yang digunakan untuk membunuh bakteri. Selain itu, penggunaan bakterisida ditujukan untuk menghambat perkembangan penyakit pada tanaman. Bahan aktif yang umumnya digunakan dalam bakterisida di antaranya streptomisin sulfat 20% dan *forantharacnose thiram* 50%. Lebih lanjut, fungisida merupakan pestisida yang secara spesifik membunuh atau menghambat pertumbuhan dan perkembangan fungi. Secara umum fungisida dikelompokkan ke dalam dua golongan, yaitu fungisida selektif (fungisida yang membunuh jenis-jenis jamur tertentu) dan fungisida non-selektif. Selain itu, fungisida dapat juga dikelompokkan menjadi fungisida kontak dan sistemik. Berdasarkan bahan aktif yang digunakan dalam fungisida berasal dari kelompok mankozeb 80%, propineb 70% atau benomil 50% memiliki cakupan penggunaan yang cukup luas terhadap jamur/cendawan pada kelas *Basidiomycetes*, *Ascomycetes*, dan *Deuteromycetes* (George & Fox, 2014). Dalam proses sterilisasi, bakterisida, dan fungisida sangat diperlukan, khususnya untuk beberapa eksplan yang berasal dari lapangan seperti daun maupun pucuk. Sedangkan untuk penanaman yang berasal dari biji seperti anggrek maupun *Azalea*, tidak memerlukan proses sterilisasi dengan bakterisida maupun fungisida. Hal ini karena proses sterilisasi dilakukan dengan cara membakar bagian permukaan luar buahnya.

*Clorox*/sodium hipoklorit ( $NaClO$ ) merupakan salah satu cairan yang sering digunakan dalam sterilisasi eksplan. Hal ini karena  $NaClO$  dapat membunuh berbagai macam tipe bakteri, jamur, dan virus (Yildiz, Özcan, Kahramanogullari, & Tuna, 2012; Al-amodi, 2016). Lebih lanjut, Hesami, Daneshvar, dan Lotfi-Jalalabadi (2017) melaporkan bahwa  $NaClO$  mampu mengurangi persentase kontaminasi eksplan tanaman *Ficus religiosa*. Kesesuaian antara waktu perendaman eksplan dan konsentrasi  $NaClO$  perlu diperhatikan karena sifatnya yang fitotoksitas. Konsentrasi  $NaClO$  yang terlalu tinggi dapat menyebabkan permukaan eksplan terbakar dan mengalami *browning* saat penanaman (Afridi et al., 2015). Selain itu,

Jafari, Daneshvar, dan Lotfi-Jalalabadi (2016) melaporkan bahwa eksplan dengan waktu perendaman dalam NaClO yang lama pada konsentrasi yang rendah menghasilkan tingkat sterilisasi yang lebih baik.

Alkohol merupakan salah satu senyawa kimia yang memiliki gugus -OH. Pada umumnya senyawa alkohol yang digunakan dalam proses sterilisasi dalam bentuk etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH). Dalam kultur jaringan, etanol dengan konsentrasi 70% dan 90% sering digunakan sebagai salah satu antiseptik dalam proses sterilisasi. Alkohol 70% mampu mengurangi tingkat kontaminasi yang disebabkan oleh jamur maupun bakteri (Lukmana & Rahmawati, 2018). Selain digunakan untuk sterilisasi eksplan, alkohol juga digunakan sebagai salah satu bahan untuk sterilisasi alat dan lingkungan kerja pada kegiatan kultur jaringan. Lebih lanjut, Wulandari dan Nasution (2014) melaporkan pada saat penanaman alat yang digunakan disterilisasi dengan mencelupkannya ke dalam alkohol 70% dan membakarnya dengan bunsen. Selain itu, meja kerja disemprot terlebih dahulu dengan alkohol 70%, dibersihkan dengan tisu dan kemudian *blower* dinyalakan untuk meniupkan udara steril secara kontinu melewati tempat kerja. Sterilisasi tangan pekerja juga dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% untuk menghindari kontaminan yang berasal dari pekerja.

Larutan *Plant Preservative Mixture* (PPM) merupakan salah satu jenis larutan yang digunakan dalam proses sterilisasi eksplan. Larutan PPM dapat berfungsi sebagai antibakteri dan antimikroba. Dalam proses penggunaannya, larutan PPM relatif tahan terhadap panas, sehingga cukup efektif untuk mencegah atau mengurangi kontaminasi mikroba dalam kultur jaringan. Pada dosis optimal, sangat efektif menghambat kontaminasi yang disebabkan oleh udara, air maupun kontak manusia dan tidak merusak proses perkecambahann biji secara *in vitro*, proliferasi kalus, maupun regenerasi. Lebih lanjut, dalam beberapa kasus juga dilaporkan bahwa PPM digunakan untuk mengurangi kontaminasi endogen (Yam & Arditti, 2017).

Vitamin C atau asam askorbat merupakan salah satu bahan yang digunakan

dalam proses sterilisasi suatu eksplan. Babaei, Ashikin, Abdullah, Saleh, dan Abdullah (2013) melaporkan bahwa pra-perlakuan dengan vitamin C 10 g/100 mL dapat mengurangi kontaminasi dan pencokelatan secara efektif. Dalam percobaan ini, penggunaan vitamin C pada metode 4 dan metode 12 terlihat dapat mengurangi pencokelatan, namun tidak terlihat secara signifikan pada metode 2, metode 5, dan metode 14 yang masih menunjukkan adanya pencokelatan pada eksplan pasca proses sterilisasi.

*Povidone-iodine* adalah salah satu antiseptik yang umum digunakan sebagai disinfektan pada kulit manusia dengan merek dagang betadine. *Povidone-iodine* merupakan bahan organik dengan berbahan aktif polivinil pirolidon yang merupakan kompleks *iodine* yang larut dalam air. *Povidone-iodine* berfungsi sebagai bakterisida yang juga membunuh spora, jamur, virus, dan sporozoa. *Povidone-iodine* diabsorpsi secara sistemik sebagai iodine, dengan jumlah yang tergantung konsentrasi, waktu pemberian, dan tipe jaringan. Hasni, Barus, Sitepu, dan Br.Hutabarat (2014) melaporkan efektivitas penggunaan *povidone-iodine* dengan konsentrasi 10% selama 5 menit dalam proses sterilisasi eksplan kentang.

Bakteri atau jamur endofitik merupakan organisme mikro yang berada di dalam eksplan, sehingga sulit untuk diatasi dengan metode sterilisasi permukaan. Pada beberapa kasus, telah dilaporkan bahwa terdapat mikroorganisme endofitik pada marga *Rubus* seperti *Hypoxylon submonticulosum* dan spesies *Phomosis* yang diisolasi dari daun (Shamoun & Sieber, 2000; Burgess, Ibrahim, Sørensen, & Sumarah, 2017) serta beberapa jenis bakteri yang di isolasi dari akar (Contreras, Loeza, Villegas, Farias, & Santoyo, 2016). Lebih lanjut, saat eksplan baru dikultur, umumnya koloni bakteri sering tidak muncul. Hal ini disebabkan mikroorganisme yang hidupnya memang secara endofit di dalam jaringan tanaman. Namun bakteri tersebut tetap ada dalam eksplan dan akan muncul setelah proses subkultur berkali-kali. Selain itu, juga dilaporkan bahwa beberapa jenis bakteri endofitik dalam eksplan telah terbukti tidak merugikan pertumbuhan kultur, tetapi justru memacu pertumbuhan tanaman yang



dikulturkan (Yusnita, 2003). Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat direkomendasikan bahwa tahapan sterilisasi untuk *R. rosifolius* dapat menggunakan metode sembilan dengan kombinasi dari detergen, bakterisida, fungisida, *clorox*, tween 80, dan larutan PPM. Namun, hasil tersebut masih dapat dimodifikasi lebih lanjut, khususnya dari waktu perendaman atau pengaplikasian agar dapat menghasilkan ekplan yang tetap berwarna hijau.

## SIMPULAN

Bahan dan tahapan dalam proses sterilisasi daun *R. rosifolius* sangat berpengaruh terhadap kualitas eksplan yang akan dikultur. Tahapan sterilisasi pada metode sembilan yang meliputi pencucian dengan detergen, perendaman dengan bakterisida + fungisida selama  $\pm 30$  menit, perendaman dengan *clorox* 10% + tween 80 selama  $\pm 15$  menit, pencucian dengan larutan PPM selama  $\pm 15$  menit, kemudian ditanam dalam botol kultur, tercatat mampu menghambat munculnya mikroorganisme endofitik hingga delapan hari dan tidak menyebabkan warna eksplan menjadi cokelat/*browning*. Sedangkan untuk metode 9, 11, dan 12 merupakan metode sterilisasi yang dapat mempertahankan warna dari eksplan anak daun *R. rosifolius*. Lebih lanjut, penentuan konsentrasi dan lama waktu penerapan perlakuan dapat memengaruhi kualitas akhir dari eksplan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fitria Astarini, selaku mahasiswi Politeknik Negeri Lampung yang telah membantu proses kegiatan di Laboratorium BKT Kebun Raya Cibodas-LIPI. Selain itu, penulis juga mengucapkan terima kasih kepada BKT Kebun Raya Cibodas-LIPI yang telah membantu proses pembiayaan kegiatan ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afridi, M. I., Ali, N., Shinwari, K. I., Hassan, M. A., Butt, A. A., Shah, A., ... Muhammad, A. (2015). Optimization of aseptic conditions for micropropagation of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivar Uslu. *Journal of Bio-Molecular Sciences (JBMS)*, 3(1), 35-43.
- Akbar, M. A., Faridah, E., Indrioko, S., & Herawan, T. (2017). Induksi tunas, multiplikasi, dan perakaran *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke secara *in vitro*. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 11(1), 1-13. doi: 10.20886/jpth.2017.11.1.155-158.
- Akhtar, N., Rehman, M. U., Khan, H. M. S., Rasool, F., Saeed, T., & Murtaza, G. (2011). Penetration enhancing effect of polysorbate 20 and 80 on the *in vitro* percutaneous absorption of L-ascorbic acid. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 281-288. doi: 10.4314/tjpr.v10i3.1.
- 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.
- Babaei, N., Ashikin, N., Abdullah, 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. doi: 10.5897/JMPR12.859.
- Balitbiogen. (2003). *Perbanyak bibit jati melalui kultur jaringan*. Bogor: Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.
- Burgess, K. M. N., Ibrahim, A., Sørensen, D., & Sumarah, M. W. (2017). Trienylfuranol A and trienylfuranone A-B: Metabolites isolated from an endophytic fungus, *Hypoxylon submoniticulosum*, in the raspberry *Rubus idaeus*. *Journal of Antibiotics*, 70(6), 721-725. doi: 10.1038/ja.2017.18.
- Conger, B. V. (2018). *Cloning agricultural plants via in vitro techniques*. New York: CRC Press.
- Contreras, M., Loeza, P. D., Villegas, J., Farias, R., & Santoyo, G. (2016). A glimpse of the endophytic bacterial diversity in roots of blackberry plants (*Rubus fruticosus*). *Genetics and Molecular Research*, 15(3), 1-10. doi: 10.4238/gmr.15038542.
- Dinarti, D., Sayekti, U., & Alitalia, Y. (2010). Kultur jaringan kantong semar (*Nepenthes mirabilis*). *Jurnal*

- Hortikultura Indonesia*, 1(2), 59-65. doi: <https://doi.org/10.29244/jhi.1.2.59-65>
- George, R. A., & Fox, R. T. (2014). *Diseases of temperate horticulture*. CABI. United Kingdom.
- Harsanti, L., Dwimahyani, I., & Tarmizi, T. (2017). Perbaikan produksi kapas (*Gossypium hirsutum*) varietas niab 999 dengan teknik mutasi radiasi. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*, 13(1), 59. doi: 10.17146/jair.2017.13.1.3962.
- Hasni, V. U., Barus, A., Sitepu, F. E. T., & Br.Hutabarat, R. (2014). Respons pemberian coumarin terhadap produksi mikro tuber planlet kentang (*Solanum tuberosum* L.) varietas granola. *Jurnal Agroekoteknologi Universitas Sumatera Utara*, 2(4), 1552-1562. doi: 10.32734/jaet.v2i4.8459.
- Hendaryono, D. P., & Wijayani, A. (1994). *Teknik kultur jaringan, pengenalan dan petunjuk perbanyakan tanaman secara vegetatif-modern*. Yogyakarta: Kanisius.
- Hesami, M., Daneshvar, M. H., & Lotfi-Jalalabadi, A. (2017). Effect of sodium hypochlorite on control of in vitro contamination and seed germination of *ficus religiosa*. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 7(4), 2157-2162. doi: 10.22034/ijpp.2017.537980.
- Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: Current status and opportunities. In A. Leva (Eds.), *Recent Advances in Plant in Vitro Culture* (pp. 1-28). London, United Kingdom: IntechOpen.
- Jafari, M., Daneshvar, M., & Lotfi-Jalalabadi, A. (2016). Control of in vitro contamination of *Passiflora Caerulea* by using of sodium hypochlorite. *Indo-American Journal of Agricultural and Veterinary Sciences*, 4(2), 8-15.
- Kadir, A., Dahlia., & Darmawan. (2018). Karakteristik produk dan kualitas minyak nilam hasil kultur *in vitro* pada budidaya tanaman sela kakao dan kelapa. *Jurnal Ilmiah Budidaya*, 53(9), 1689-1699.
- Kulus, D., & Woźny, A. (2020). Influence of light conditions on the morphogenetic and biochemical response of selected ornamental plant species under in vitro conditions: A mini-review. *Biotechnologia*, 101(1), 75-83. doi: 10.5114/bta.2020.92930.
- Kumar, P. P., & Loh, C. S. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. In A. Altman, & P. M. Hasegawa (Eds.), *Plant biotechnology and agriculture* (pp. 131-138). Netherlands: Elsevier Inc.
- Lenz, R. R., Magnusson, V. A., & Dai, W. (2016). Plant regeneration of “Amethyst” purple raspberry (*Rubus occidentalis* x *R. idaeus* 'Amethyst') from in vitro leaf tissues. *Acta Horticulturae*, 1133, 491-496. doi: 10.17660/ActaHortic.2016.1133.76.
- Libby, W. J., & Ahuja, M. R. (2013). Micropropagation and clonal options in forestry. In M. R. Ahuja (Eds.), *Micropropagation of woody plants* (pp. 425-442). Dordrecht, Netherlands: Springer.
- Lozinschii, M. (2017). In vitro morphogenesis of *Rubus* species. *Journal of Botany*, 9(2), 23-29.
- 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. doi: <https://doi.org/10.30872/bp/v13i2.418>
- Mariska, I., & Suci, R. (2011). Pengadaan bibit tebu melalui kultur jaringan. *Jurnal Litbang Pertanian*, 6(3413), 1-2.
- Nofrianinda, V., Yulianti, F., & Agustina, E. (2018). Pertumbuhan planlet stroberi (*Fragaria ananassa* D) var. dorit pada beberapa variasi media modifikasi *in vitro* di Balai Penelitian Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO). *Biotropic: The Journal of Tropical Biology*, 1(1), 32-41. doi: 10.29080/biotropic.2017.1.1.32-41.
- Normasiwi, S., & Surya, M. I. (2016). The potential fruit crop of Cibodas Botanical Garden. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 8(2), 206. doi: 10.15294/biosaintifika.v8i2.5235.
- Olivier, M. (2016). Micropropagation and production of forest trees. In Y. Park, J. M. Bonga, & H. Moon (Eds.), *Vegetative propagation of forest trees* (pp. 32-55). Seoul, Korea: NIFoS.

- Rowe, R. C., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*. London: Libros Digitales-Pharmaceutical Press.
- Shamoun, S. F., & Sieber, T. N. (2000). Colonisation of leaves and twigs of *Rubus parviflorus* and *R. spectabilis* by endophytic fungi in a reforestation site in British Columbia. *Mycological Research*, 104(7), 841-845. doi: 10.1017/S095375629900221X.
- Surya, M. I. (2009). Keanekaragaman dan potensi *Rubus* spp. koleksi Kebun Raya Cibodas. *Warta Kebun Raya* 9(1), 19-25.
- Wulandari, A. S., & Nasution, S. (2014). Pengaruh bahan sterilan terhadap keberhasilan inisiasi eksplan *Paulownia* (*Paulownia elongata* SY Hu) secara *in vitro*. *Jurnal Silvikultur Tropika*, 5(1), 1-6.
- Yam, T. W., & Arditti, J. (2017). *Micropropagation of orchids*. New Jersey, United States: John Wiley & Sons Ltd.
- Yildiz, M., Özcan, S. F., Kahramanogullari, C. T., & 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. doi: 10.2174/2210315511202040328.
- Yusnita. (2003). *Kultur jaringan tanaman: Cara memperbanyak tanaman secara efisien*. Jakarta: Agromedia Pustaka.