

EFEKTIVITAS STERILISASI KIMIAWI EKSPLAN PUCUK *Artemisia annua* LINN. DENGAN BERBAGAI PROSEDUR STERILISASI PADA TAHAP INISIASI *IN VITRO*

Ivan Tjahja Pranata dan Maria Marina Herawati^{*)}

Departemen Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Kristen Satya Wacana, Indonesia
Jl. Diponegoro No.52-60, Salatiga, Kec. Sidorejo, Kota Salatiga, Jawa Tengah 50711, Indonesia

Coressponding author: marinakartika@gmail.com

Abstrak

Kultur *in vitro* adalah salah satu metode penting yang umum digunakan untuk perbaikan sifat agronomis *Artemisia annua* berupa peningkatan hasil artemisinin. Meskipun demikian, metode ini memiliki faktor penghambat utama yang sering dihadapi pada tahap perbanyakan awal yaitu masalah kontaminasi. Penelitian ini bertujuan untuk mencari prosedur sterilisasi yang paling efektif dalam menurunkan jumlah kontaminan pada eksplan pucuk *Artemisia annua* tanpa menyebabkan tingkat kematian eksplan yang tinggi. Perlakuan prosedur sterilisasi menggunakan kombinasi dari 8 jenis sterilan yaitu etanol, HgCl₂, Bayclin[®], Mama Lime[®], SOS[®], Ligent[®], Sunlight[®], dan Carex[®]. Penelitian dilakukan dengan rancangan acak lengkap dengan 25 perlakuan. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali, masing-masing 20 botol/ulangan. Pengamatan meliputi total kontaminasi, jumlah kontaminasi bakteri, jumlah kontaminasi jamur dan tingkat kematian eksplan hingga 28 hari setelah kultur (HSK). Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa sterilisasi dengan Carex[®] yang dicampur dengan SOS[®] selama 30 detik dilanjutkan dengan HgCl₂ selama 7 menit adalah prosedur sterilisasi yang paling optimal dalam menurunkan tingkat kontaminan eksplan pucuk dengan tingkat kematian eksplan terendah.

Kata kunci: *Artemisia annua*, eksplan pucuk, *in vitro*, kontaminasi, sterilisasi

THE EFFECTIVITY OF CHEMICAL STERILIZATION ON *Artemisia annua* LINN. SHOOT EXPLANT WITH VARIOUS STERILIZATION PROCEDURE IN THE *IN VITRO* INITIATION PHASE

Abstract

In vitro culture is one of important method generally used for improving agronomic traits in *Artemisia annua* such as enhancing artemisinin. However, the method has main inhibitor factor which often involved in early micropropagation stage, that is contamination. This research aimed to find the most effective sterilization procedure for diminishing the contamination rate of *Artemisia annua* shoot explant, without causing high mortality rate. sterilization procedure treatment in this research used 8 type of sterilant i.e. etanol, HgCl₂, Bayclin[®], Mama Lime[®], SOS[®], Ligent[®], Sunlight[®], dan Carex[®]. This research used completely randomized design with 25 treatments. Each treatment replicated 3 times, each 20 bottle/replication. The observation comprised total contamination rate, bacteria contamination rate, mold contamination rate, and mortality rate. The research result showed that sterilization step with Carex[®] mixed with SOS[®] in 30 seconds which continue with HgCl₂ in 7 minutes is the most optimal sterilization procedure to diminish the contaminant of shoot explant without enhance the mortality rate.

Keywords: *Artemisia annua*, shoot explant, *in vitro*, contamination, sterilization

PENDAHULUAN

Artemisia annua adalah salah satu jenis fitofarmaka yang sekarang ini terus dikembangkan. Spesies tersebut memiliki kandungan senyawa artemisinin, satu-satunya senyawa yang dapat mengobati penyakit malaria (WHO, 2017). Berdasarkan beberapa penelitian terakhir, disebutkan bahwa artemisinin juga berpotensi sebagai antiangiogenesis (Sagar *et al.*, 2006), antioksidan (Ferreira *et al.*, 2010), dan antikanker (Crespo-Ortiz & Wei, 2012; Efferth, 2017). Upaya-upaya peningkatan kandungan artemisinin pada *Artemisia annua*, seperti manipulasi genetik dan poliploidi, dapat dimediasi dengan teknik kultur *in vitro*. Salah

satu metode kultur *in vitro* yang paling sering digunakan pada *Artemisia annua* adalah kultur pucuk.

Tantangan utama dalam pelaksanaan kultur pucuk adalah eliminasi kontaminasi pada tahap inisiasi. Mikroorganisme kontaminan dapat menjadi hambatan dalam proses kultur pucuk karena akan mengganggu pertumbuhan eksplan. Kontaminan dapat bersifat eksternal yaitu yang terbawa pada bagian luar permukaan tanaman artemisia atau bersifat sistemik yaitu pada bagian dalam jaringan artemisia. Hambatan kontaminasi sangat penting untuk diatasi sehingga pada tahap perbanyakan awal akan didapatkan eksplan-eksplan yang bebas dari kontaminan.

Sterilisasi eksplan pada umumnya menggunakan senyawa kimiawi. Ada banyak jenis senyawa disinfektan yang dapat digunakan sebagai bahan sterilisasi. Senyawa-senyawa dasar umum yang sering digunakan antara lain NaOCl, CaOCl₂, dan etanol (Hapsoro & Yusnita, 2018). NaOCl dapat digunakan dari senyawa pencuci lantai yang telah dilarutkan. Beberapa antibiotik bahkan digunakan untuk membantu membasmi kontaminan bakteri. Beberapa diantaranya yaitu bavistin dan streptomisin (Dangash *et al.*, 2015) serta cetrimide (Pandey *et al.*, 2016). Untuk tujuan penghematan, biasanya penggunaan antibiotik juga dapat digantikan dengan larutan sabun. hal ini pernah dicobakan dalam prosedur yang disarankan oleh Gopinath *et al.* (2014). Larutan Tween umumnya juga dapat ditambahkan sebagai surfaktan untuk meningkatkan efektivitas sterilisasi. Beberapa peneliti lain juga terkadang menambahkan HgCl₂ sebagai (Gopinath *et al.*, 2014; Pandey *et al.*, 2016; Herawati, 2006). Dengan sedemikian banyaknya prosedur yang ada, sangat perlu untuk dilakukan evaluasi terhadap beberapa prosedur sterilisasi sehingga efektivitas eliminasi

kontaminan yang berasal dari dalam eksplan maupun lingkungan dapat dicapai.

Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan prosedur sterilisasi kimiawi yang paling optimal dalam menurunkan tingkat kontaminasi pada tahap perbanyakan eksplan pucuk *Artemisia annua* dengan mempertimbangkan tingkat kematian eksplan.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian yang bersifat kajian eksploratif ini telah dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Departemen Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga. Pelaksanaan penelitian dilakukan mulai Maret 2019 hingga Juni 2019.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini tersusun dari 8 jenis sterilan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu etanol, HgCl₂, Bayclin[®], Mama Lime[®], SOS[®], Ligent[®], Sunlight[®], dan Carex[®]. Deskripsi sabun tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Deskripsi sabun yang digunakan untuk sterilisasi

Jenis sabun	Nama resmi produk	Kandungan*	Hasil tes laboratorium*
1. Mama Lime	Mama Lime Anti Bacteria [®]	21% (LAS Na, SLES, SLS, CAPB)	Membunuh kuman <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i>
2. SOS	SOS Anti Bacterial [®]	Surfaktan, Triclosan 0,05%	Membunuh kuman <i>S. Aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. Aeruginosa</i> , <i>S. Typhimurium</i>
3. Ligent	Ligent Antibacterial [®]	Biodegradable surfactants 19%, lime extract 1%, antibacterial agent 0,1%	(tidak ada)
4. Sunlight	Sunlight Jeruk Nipis 100 [®]	Total surfaktan 18%	(tidak ada)
5. Carex	Cussons Carex Antibacterial Hand Wash [®]	Aqua, Sodium Laureth Sulfate, Cocamidopropyl Betaine, Lactic Acid, Sodium Chloride, Sodium Benzoate, Polyquaternium-7, Glycerin, Tetrasodium Glutamate Diacetate, Benzotriazolyl Dodecyl p-Cresol, Parfum, Mel, Potassium Sorbate, CI 42051.	Membunuh kuman <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. Aeruginosa</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>S. flexneri</i>

Catatan: konsentrasi kelima jenis sabun yang digunakan untuk sterilisasi masing-masing sebanyak 2 sendok makan yang dilarutkan dalam 500 ml air. *seperti yang tertera pada kemasan.

Alat-alat yang digunakan adalah gelas beaker, cawan petri, botol kultur, bunsen, pinset, scalpel, botol limbah, magnetic stirrer, autoklaf, dan LAF.

Analisis Data

Jenis-jenis perlakuan yang digunakan dideskripsikan pada Tabel 1. Percobaan menggunakan rancangan acak kelompok dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Tiap 1 ulangan terdiri dari 20 satuan percobaan. Tiap satuan

percobaan terdiri dari satu botol balsem ukuran tanggung dengan diameter 4 cm yang diisi dengan satu eksplan pucuk *Artemisia annua*. Eksplan pucuk yang dimaksudkan disini menggunakan semua bagian tajuk atas tanaman. Parameter pengamatan meliputi persentase kontaminasi jamur (eksternal dan internal), persentase kontaminasi bakteri, dan persentase eksplan yang tumbuh. Setiap parameter diamati selama 1 bulan dengan pengambilan data per minggu. Data dianalisis secara deskriptif parametrik.

Tabel 1. Deskripsi jenis prosedur sterilisasi yang digunakan pada setiap perlakuan

Kode Perlakuan	Sterilan 1		Sterilan 2		Sterilan 3	
	Senyawa	Durasi	Senyawa	Durasi	Senyawa	Durasi
P1	Etanol 70%	1'				
P2	Etanol 70%	2'				
P3	Etanol 96%	2'				
P4	Bayclin 1%	2'				
P5	Bayclin 5,25%	2'				
P6	Bayclin 2,5%	2'	Etanol 70%	45''		
P7	Etanol 70%	45''	HgCl ₂ 0,005%	5'		
P8	Etanol 70%	45''	HgCl ₂ 0,005%	10'		
P9	Etanol 70%	45''	HgCl ₂ 0,03%	7'		
P10	Sunlight	45''	HgCl ₂ 0,005%	7'		
P11	Sunlight	45''	HgCl ₂ 0,03%	7'		
P12	Sunlight	45''	Etanol 70%	45''	HgCl ₂ 0,03%	10'
P13	SOS	45''	HgCl ₂ 0,03%	10'		
P14	SOS	30''	HgCl ₂ 0,03%	7'		
P15	Mama Lime + SOS	3'	Etanol 70%	45''	HgCl ₂ 0,03%	10'
P16	Mama Lime + SOS	1'	Etanol 70%	45''	HgCl ₂ 0,03%	10'
P17	Mama Lime + SOS	1'	HgCl ₂ 0,03%	10'		
P18	Mama Lime + SOS	45''	HgCl ₂ 0,03%	7'		
P19	Mama Lime + SOS + Ligent	1'	HgCl ₂ 0,03%	7'		
P20	Carex	45''	HgCl ₂ 0,03%	7'		
P21	Carex	30''	HgCl ₂ 0,03%	7'		
P22	Carex + SOS + Mama Lime + Ligent	45''	HgCl ₂ 0,03%	7'		
P23	Carex + SOS	45''	HgCl ₂ 0,03%	7'		
P24	Carex + SOS	45''	HgCl ₂ 0,03%	10'		
P25	Carex + SOS	30''	HgCl ₂ 0,03%	7'		
P26	Carex + SOS	20''	HgCl ₂ 0,03%	7'		

Catatan: Semua prosedur perlakuan di atas dilakukan di dalam LAF. Setiap prosedur perlakuan didahului dengan pencucian eksplan pada air mengalir selama kurang lebih 15 menit dan diakhiri dengan pencucian dengan akuades steril di LAF sebanyak 3x (masing-masing kraung lebih 15 detik). Khusus HgCl₂ dikombinasikan dengan penambahan 2 tetes larutan Tween

.HASIL DAN PEMBAHASAN

Prosedur-prosedur yang ditentukan dalam penelitian ini sebenarnya adalah evaluasi ulang dari beberapa penelitian sebelumnya yang menggunakan *Artemisia annua* dalam penelitiannya. Penggunaan etanol diterapkan dari penelitian Jamaledine *et al.* (2011). Penggunaan Bayclin diterapkan dari penelitian Koobkokkrud *et al.* (2008) dan Inthima *et al.* (2014). Penggunaan HgCl₂ diterapkan dari penelitian. Penggunaan larutan sabun diterapkan dari penelitian Gopinath *et al.* (2014) dan Herawati (2016). Beberapa modifikasi gabungan dari senyawa-senyawa tersebut juga pernah didasarkan pada penelitian sebelumnya yakni Gopinath *et al.* (2014), Dangash *et al.* (2015), Pandey *et al.* (2016).

Semua parameter kontaminasi diamati menurut visualisasi keberadaan koloni bakteri dan koloni jamur yang tampak mata. Tujuan diadakan pengamatan hingga 4 minggu adalah untuk mengikutsertakan faktor kontaminasi sistemik sebagai salah satu bentuk kontaminasi. Dari data 4 minggu tersebut dapat diperkirakan

prosedur yang paling efektif dalam menekan tingkat kontaminasi di luar permukaan ataupun kontaminasi sistemik. Jumlah kontaminasi pada semua perlakuan yang telah dicoba selama 4 minggu pengamatan dapat diamati pada Tabel 3.

Semua perlakuan dengan etanol tidak dapat mensterilisasi kontaminan secara efektif. Hal ini diperlihatkan dari perlakuan P1, P2, dan P3, dimana tingkat kontaminasinya hingga lebih dari 86%. Molekul etanol mungkin tidak dapat membersihkan kontaminan yang berada pada bulu-bulu di permukaan eksplan pucuk *Artemisia annua*. Hasil ini serupa dengan yang ditemukan oleh Setiani dkk. (2018), bahwa etanol tidak mampu mensterilisasi kontaminan pada eksplan daun sukun. Eksplan yang diberi perlakuan etanol juga cenderung mengalami kematian karena memutihnya jaringan akibat bereaksi dengan etanol, meskipun dalam jumlah kecil. Penggunaan etanol baik jika dilakukan pada durasi di atas 15 menit, seperti yang dilakukan dalam penelitian Shofiyani & Hajoeningtjas (2010) dengan tingkat kontaminasi 35%. Meskipun demikian, teknik ini dapat dikatakan

tidak terlalu *reproducible*. Penggunaan etanol dalam penelitian yang dilakukan oleh Haris dkk. (2009) pada eksplan tunas aksiler karet hanya

mempertahankan eksplan sebanyak kurang dari 50% eksplan pada durasi sterilisasi 20 menit.

Tabel 3. Peningkatan jumlah kontaminasi selama 4 minggu pengamatan

Perlakuan	Satuan percobaan	Jumlah Kontaminasi				Persentase Kontaminasi
		7 HSK	14 HSK	21 HSK	28 HSK	
P1	60	42	43	47	54	90.00%
P2	60	39	50	57	56	93.33%
P3	60	39	49	50	52	86.67%
P4	60	40	49	51	54	90.00%
P5	60	35	37	45	48	80.00%
P6	60	36	42	47	52	86.67%
P7	60	30	32	45	53	88.33%
P8	60	23	37	40	48	80.00%
P9	60	28	29	40	47	78.33%
P10	60	30	46	51	53	88.33%
P11	60	26	39	41	45	75.00%
P12	60	21	27	40	42	70.00%
P13	60	1	5	7	11	18.33%
P14	60	3	6	7	12	20.00%
P15	60	1	1	1	2	3.33%
P16	60	2	2	2	3	5.00%
P17	60	6	7	9	12	20.00%
P18	60	1	2	3	5	8.33%
P19	60	2	3	5	6	10.00%
P20	60	2	2	3	5	8.33%
P21	60	4	4	7	8	13.33%
P22	60	3	3	6	6	10.00%
P23	60	1	4	7	7	11.67%
P24	60	3	3	6	7	11.67%
P25	60	1	1	5	5	8.33%
P26	60	7	9	10	13	21,67%

Penggunaan bayclin juga memberikan efektivitas sterilisasi yang cukup rendah. Hal ini dapat diamati dari tingkat total kontaminan pada perlakuan P4, P5, dan P6 yang secara keseluruhan mencapai di atas 80%. Hasil tersebut relatif sama dengan hasil yang ditemukan oleh Admojo & Prasetyo (2016) dimana penggunaan Bayclin hanya dapat mensterilisasi kontaminan hingga persentase 5% saja pada kultur petiol eksplan karet.



Gambar 1. Kondisi akhir eksplan yang diberi perlakuan Bayclin selama 2 menit

Penggunaan Bayclin juga mengakibatkan keputihan jaringan dalam jumlah yang besar. Pada konsentrasi 5,25% (tidak diencerkan) penggunaan Bayclin bahkan menyebabkan kontaminasi hingga 78,33%. Pada konsentrasi 2,5% (sudah diencerkan) dan dengan penambahan prosedur etanol 70%, didapati penurunan kontaminasi hingga 58,33%. Hasil ini masih sangat besar mengingat lebih dari separuh eksplan mati. Gejala kematian ini tidak diamati pada prosedur perlakuan yang lainnya. Prosedur P5 sebenarnya mirip dengan perlakuan yang dicoba oleh Putri dkk. (2017) yang juga mendapati persentase kontaminasi sangat tinggi pada level 92%. Berdasarkan hasil penelitian Barampuram et al. (2014) dan Hapsoro & Yusnita (2018), penggunaan Bayclin jika bahan kultur yang digunakan adalah eksplan biji.

Tabel 4. Jumlah kontaminasi bakteri, jamur, dan tingkat kematian eksplan

No	Jumlah kontaminasi	% kontaminasi	J	B	% J	% B	Mati			% mati
							hitam	layu	Putih	
1	54	90.00%	49	33	82	55	-	6	3	15.00%
2	56	93.33%	47	35	78	58	-	5	4	15.00%
3	52	86.67%	45	34	75	57	-	7	6	21.67%
4	54	90.00%	40	19	67	32	-	-	14	23.33%
5	48	80.00%	37	21	62	35	-	-	47	78.33%
6	52	86.67%	45	27	75	45	1	5	29	58.33%
7	53	88.33%	11	45	18	75	-	4	-	6.67%
8	48	80.00%	9	42	15	70	21	-	-	35.00%
9	47	78.33%	3	44	05	73	-	6	-	10.00%
10	53	88.33%	7	46	12	77	-	8	-	13.33%
11	45	75.00%	2	43	3	72	-	11	-	18.33%
12	42	70.00%	11	31	18	52	19	10	-	48.33%
13	11	18.33%	2	11	3	18	23	2	-	41.67%
14	12	20.00%	2	13	3	22	-	1	-	1.67%
15	2	3.33%	0	2	0	3	1	57	-	96.67%
16	3	5.00%	2	1	3	2	29	18	-	78.33%
17	12	20.00%	7	5	12	8	28	24	-	86.67%
18	5	8.33%	3	2	5	3	-	14	-	23.33%
19	6	10.00%	5	1	8	2	-	27	-	45.00%
20	5	8.33%	2	3	3	5	-	9	-	15.00%
21	7	11.67%	3	4	5	7	-	3	-	5.00%
22	6	10.00%	3	3	5	5	-	39	-	65.00%
23	7	11.67%	2	5	3	8	-	11	-	18.33%
24	7	11.67%	4	3	7	5	31	7	-	63.33%
25	5	8.33%	4	1	7	2	2	-	-	3.33%
26	13	21,67%	2	11	3	18	2	-	-	3.33%

Tabel 4 menunjukkan bahwa penggunaan HgCl₂ cenderung menurunkan persentase kontaminan jamur. Hal ini dapat dilihat pada perlakuan P8 hingga seterusnya jamur sudah mulai berkurang. Adapun penggunaan larutan sabun sebagai sterilant awal cenderung menurunkan persentase kontaminan bakteri. Hal ini diperlihatkan mulai perlakuan P15 hingga seterusnya.

Konsentrasi HgCl₂ dalam penelitian ini berada dalam rentang rendah yaitu di bawah 0,1%. Konsentrasi ini menghindari konsentrasi yang digunakan oleh Sulistiyo dkk. (2017) yang membuktikan bahwa konsentrasi HgCl₂ sebesar 0,1% mengakibatkan browning dalam jumlah besar yaitu sebanyak 15,78%. Pemilihan konsentrasi 0,03% mengikuti taraf yang digunakan dalam penelitian Herawati (2016) dan Pandey et al. (2016).



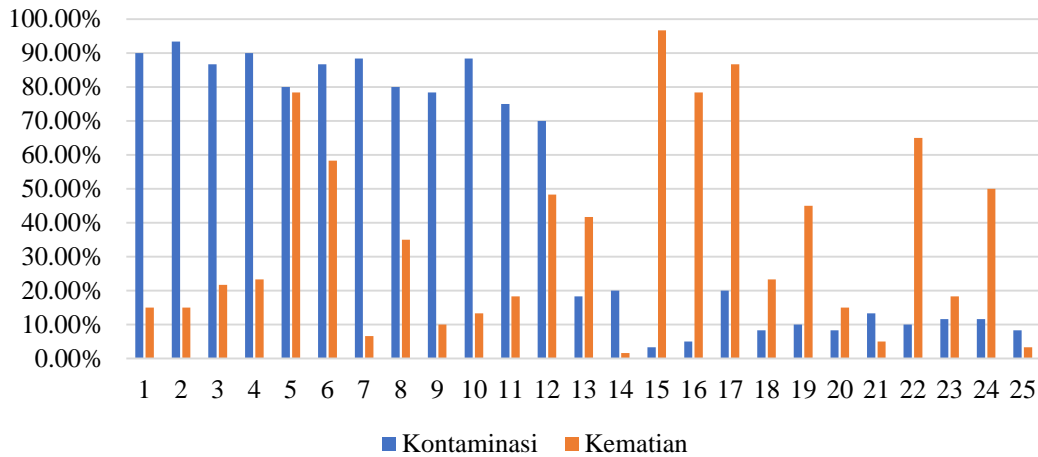
Gambar 2A. Perbandingan eksplan yang diberi perlakuan HgCl₂ selama 7 menit (kiri) dan 10 menit (kanan) pada botol yang ditutup oleh aluminium foil. Gambar 2B. Perbandingan eksplan yang diberi perlakuan HgCl₂ selama 7 menit (kiri) dan 10 menit (kanan) pada botol yang ditutup oleh aluminium foil

HgCl₂ pada 7 menit sudah terbukti dapat mengatasi jamur, tetapi pada taraf tersebut bakteri

masih dapat tumbuh pada media kultur. Hal ini diperlihatkan dari hasil sterilisasi perlakuan P9

dan P11. Keduanya menunjukkan hasil sterilisasi yang cukup efektif pada jamur yaitu kurang dari 4 kontaminan, tetapi masih mengandung bakteri yang terlalu tinggi. Penelitian yang dilakukan oleh Das *et al.* (2012) memperlihatkan, bahwa pada dosis tersebut HgCl₂ efektif membunuh mikroba jika diperlakukan dengan durasi lebih dari 15 menit. Namun, berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan, penggunaan HgCl₂ selama 10 menit ternyata menyebabkan tingkat kematian yang sangat tinggi pada eksplan

pucuk *Artemisia annua*. Eksplan pada perlakuan P8, P12, P13, P15, P17, dan P24 yang diberi HgCl₂ selama 10 menit menunjukkan tingkat kematian eksplan hingga lebih dari 60%. Hal ini menunjukkan HgCl₂ pada dosis 0,03% hanya efektif untuk membersihkan kontaminan berupa jamur tetapi tidak efektif membersihkan kontaminan berupa bakteri pada dosis tersebut. Pemberian etanol pada P12 sebagai modifikasi dari P11 ternyata juga tidak memberikan dampak terhadap kontaminan bakteri.



Gambar 3. Jumlah kontaminasi dan kematian eksplan pada 25 perlakuan

Pada perlakuan P10 hingga P25 digunakan berbagai macam sabun yang dicampur menjadi satu. Diasumsikan bahwa setiap jenis sabun memiliki antibakteri dengan jenis spektrumnya tersendiri. Pencampuran beberapa jenis merk sabun disini diharapkan dapat memperluas spektrum antibakteri setelah didapatkan larutan campuran.

Dosis larutan sabun yang terlalu tinggi akan menyebabkan efek layu atau kekeringan yang kemudian menyebabkan kematian pada eksplan. Hal ini dapat diamati pada perlakuan P15, P16, P17, P19, P21, dan P22. Pada beberapa perlakuan seperti P15 dan P22, dosis tinggi yang disertai durasi sterilisasi dengan larutan sabun yang terlalu lama akan menyebabkan kematian dengan presentase sangat tinggi. Pada perlakuan P15 pencucian sabun dengan durasi 3 menit bahkan menyebabkan kematian hingga 96,67%. Kasus pada perlakuan P22 hampir sama dengan perlakuan P15, dimana durasi sterilisasi sabun yang terlalu lama diikuti dengan dosis yang terlalu tinggi yaitu berupa peningkatan konsentrasi sabun hingga hamper 2 kali lipat yang merusak jaringan luar eksplan.

Tingkat kematian eksplan terendah ditemukan pada perlakuan P7, P14, P21, dan P25. Pada perlakuan P7, durasi penggunaan senyawa HgCl₂ hanya 5 menit sehingga pada

taraf tidak merusak jaringan eksplan. Meskipun demikian, prosedur pada P7 tidak efektif dalam mengurangi kontaminasi. Pada perlakuan P14, P21, dan P25, ditambahkan penggunaan larutan sabun dengan durasi pencucian yang cukup singkat yaitu hanya 30 detik dan diimbangi dengan durasi penggunaan HgCl₂ yang juga cukup singkat yakni 7 menit. Durasi pada kedua jenis sterilan tersebut adalah yang paling cocok dengan anatomi jaringan luar dari eksplan pucuk *Artemisia annua*.



Gambar 4. Kontaminan bakteri sistemik yang muncul 4 minggu setelah kultur

Pada kedua durasi tersebut, sterilant hanya merusak kontaminan tanpa merusak

jaringan eksplan. Namun, untuk mencapai efektivitas tertinggi SOS harus dipadukan dengan Carex. Hal ini dimungkinkan spektrum kedua jenis sabun tersebut berbeda, sehingga keberadaan keduanya bersifat komplementer dalam reaksinya dengan mikroba.

Dalam praktiknya, eksplan yang digunakan untuk kultur pucuk lebih baik adalah eksplan pada ruas 1-5. Ruas-ruas tersebut kemungkinan belum terdiferensiasi sehingga tingkat kontaminasinya masih rendah. Selama penelitian berlangsung, eksplan yang sering terkena kontaminasi setelah minggu ke-3 pada umumnya adalah eksplan dari ruas yang telah terdiferensiasi. Oleh karena itu, penggunaan ruas 1-3 teratas sangat direkomendasikan oleh Herawati (2016) yang dibuktikan dalam penelitian disertasinya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Prosedur perlakuan yang paling efektif dalam menurunkan tingkat kontaminasi pada eksplan pucuk *Artemisia annua* adalah pada pencucian dengan campuran sabun SOS dan Carex dengan takaran masing-masing 2 sendok pada 500 ml selama 30 detik yang diikuti pencucian dengan HgCl₂ dosis 0,03% selama 7 menit. Pada prosedur perlakuan ini tingkat kematian eksplannya sangat rendah.

Saran

Pengujian prosedur perlakuan bagi eksplan pucuk *Artemisia annua* dapat lebih dipertajam lagi dengan menggunakan bahan-bahan sterilan lainnya, seperti cetrimide, antibiotik, insektisida, dan fungisida. Selama pengujian berlangsung, disarankan untuk menggunakan ruas atas yang masih muda karena kemungkinan kontaminasi sistemik lebih kecil.

DAFTAR PUSTAKA

- Admojo L & Prasetyo NE. 2016. Pengaruh sterilan terhadap tingkat kontaminasi pada kultur petiol dan midrib daun tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) klon PB 330. *Jurnal Penelitian Karet* 34(2):151-164.
- Barampuram S, Allen G, & Krasnyanski S. 2014. Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118(1):179-185.
- Crespo-Ortiz MP & Wei MQ. 2012. Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Article ID 247597, 18 pages.
- Dangash A, Ram M, Niranjana R, Bharillya A, Misra H, Pandya N, & Jain DC. 2015. In vitro selection and hormonal regulation in cell culture of *Artemisia annua* L. *Plant. JSM Cell & Developmental Biology* 3(1):1013.
- Das MP, Rebecca LJ, Sharmila S, & Chatterjee S. 2012. Study on the effect of mercury (II) chloride as disinfectant on mixed culture. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 4(12):4975-4978.
- Efferth T. 2017. From ancient herb to modern drug: *Artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* 46:65-83.
- Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, & Heyerick A. 2010. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules* 15:3135-3170.
- Gopinath B, Gandhi K, & Saravanan S. 2014. In vitro propagation of an important medicinal plant *Artemisia annua* L. from axillary bud explants. *Advances in Applied Science Research* 5(1):254-258.
- Hapsoro D & Yusnita. 2018. Kultur Jaringan – Teori dan Praktik. Yogyakarta. Penerbit Andi.
- Haris N, Sumaryono & Carron MP. 2009. Pengaruh bahan pra-sterilan, tutup tabung kultur, dan musim terhadap tingkat kontaminasi eksplan pada kultur microcutting karet. *Menara Perkebunan* 77(2):89-99.
- Herawati MM. 2016. Peningkatan hasil artemisinin melalui poliploidisasi dan kultur teknik *Artemisia cina* Berg ex Poljakov. *Disertasi*. Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Inthima P, Otani M, Hirano T, Hayashi Y, Abe T, dan Nakano M. 2014. Mutagenic effects of heavy-ion beam irradiation on in vitro nodal segments of *Artemisia annua* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 119(1):131-139.
- Jamaledine ZO, Lyam P, Fajimi O, Giwa A, Aina A, Lawyer EF, Okere AU & Odofoin WT. 2011. In vitro growth response of *Artemisia annua* seeds to different concentrations of plant growth regulators. *African Journal of Biotechnology* 10(77):17841-17844.

- Koobkokkrud T, Chochai A, Kirdmanee C, & De-Eknamkul W. 2008. Effects of low-dose gamma irradiation on artemisinin content and amorpha-4,11-diene synthase activity in *Artemisia annua* L. *International Journal of Radiation Biology* 84(11):878-884.
- Pandey N, Meena RP, Rai SK, Pandey-Rai S. 2016. In vitro generation of high artemisinin yielding salt tolerant somaclonal variant and development of SCAR marker in *Artemisia annua* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127:301-314.
- Putri AI, Herawan T, Prastyono, & Haryjanto L. 2017. Pengaruh teknik sterilisasi explan terhadap tingkat perolehan kultur jaringan aksenik ramin (*Gonystylus bancanus*). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan* 11(2):131-138.
- Sagar SM, Yance D, & Wong RK. 2006. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer—Part 1. *Current Oncology* 13(1):14-26.
- Setiani NA, 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.
- Shofiyani A & Hajoeningtjas OD. 2010. Pengaruh sterilan dan waktu perendaman pada eksplan daun kencur (*Kaempferia galanga* L.) untuk meningkatkan keberhasilan kultur kalus. *AGRITECH* 12(1):11-29.
- WHO. 2017. *World Malaria Report 2017*. Geneva: World Health Organization.