



## Induksi Organogenesis Eksplan *Cauliflower* pada Media Cair dengan Beberapa Perlakuan Sterilisasi

Ratna Kartika Putri<sup>1\*</sup>, Habibi Firmansah<sup>1</sup>, Rika Miftakhul Jannah<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Corresponding Author: [ratnaratna@apps.ipb.ac.id](mailto:ratnaratna@apps.ipb.ac.id)

Info Artikel	Abstrak
<p>Kata Kunci: Kembang Kol, Sterilisasi, In Vitro, Murashige, Skoog</p>	<p>Sterilisasi merupakan salah satu faktor yang membantu dalam suksesi organogenesis. Instrumen sterilisasi dapat berbeda tergantung jenis eksplan dan genotipe tanaman. Penelitian bertujuan untuk mengetahui metode terbaik dalam sterilisasi tanaman kembang kol untuk mendukung organogenesis dalam media cair. Diantara metode sterilisasi berbeda yang diuji, perlakuan sterilisasi menggunakan perendaman clorox 30% selama 15 menit, pembilasan tiga kali air steril, perendaman clorox 10% selama 10 menit, dan pembilasan satu kali air steril adalah menunjukkan persentase eksplan hidup 100% pada 27 hari setelah inisiasi. Metode sterilisasi yang menggunakan clorox tersebut berpotensi untuk studi lebih lanjut dan menjadi protokol sterilisasi yang efektif dan efisien untuk tanaman kembang kol.</p>
<p>Diterima: 02 Mei 2024 Disetujui : 03 Juni 2024</p>	

### 1. PENDAHULUAN

Kembang kol (*Brassica oleracea* var. botrytis) dikenal berifat polimorfik dan memiliki hubungan kerabat dekat dengan kale, kubis, dan brokoli (Vinterhalter *et al.*, 2007). Kembang kol memiliki manfaat bagi kesehatan yaitu mengurangi resiko kanker dan menurunkan kolestrol darah, sistem regenerasi kembang kol banyak dikembangkan salah satunya melalui kultur *in vitro* (Spini & Kerr 2006). Organogenesis kembang kol telah dilaporkan berhasil menggunakan eksplan tunas maupun akar (Qin *et al.*, 2012). Keberhasilan organogenesis salah satunya ditentukan oleh jenis dan ukuran eksplan, media kultur serta kondisi lingkungan. Media cair dapat digunakan dalam organogenesis kembang kol dengan keunggulan persiapan media yang lebih mudah (pergantian dan penuangan), ukuran botol kultur dapat lebih besar dan seluruh permukaan eksplan terendam dalam media sehingga lebih optimal dalam penyerapan nutrisi di seluruh bagian eksplan (Etienne & Berthouly, 2002).

Keberhasilan sterilisasi merupakan faktor lain suksesnya organogenesis. Permukaan tanaman terutama yang tereskos di lapang secara inheren mengandung berbagai patogen, bakteri, jamur, dan kontaminan lain yang perlu dihilangkan untuk tujuan kultur *in vitro* (Webster *et al.*, 2003; Hiremath 2006). Selain itu kontaminan juga dapat berasal dari instrumen laboratorium, kondisi di laboratorium maupun laboran (Leifert & Cassells, 2001). Sifat proliferasi yang cepat dan kompetitif dalam nutrisi menyebabkan kontaminan menjadi ancaman utama kultur *in vitro*. Instrumen sterilisasi dapat berbeda tergantung jenis eksplan dan genotipe tanaman (Rezadost *et al.*, 2013). Beberapa faktor sterilisasi yang menentukan kesuksesannya diantaranya jenis bahan, konsentrasi, dan waktu pemaparan eksplan (Qin *et al.*, 2012).

Percobaan ini dilakukan untuk membandingkan bahan dan waktu paparan sterilan yang berbeda pada organogenesis kembang kol dalam media cair.

## 2. METODE PENELITIAN

### **Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada Oktober-November 2022 di Laboratorium Kultur Jaringan-3, Departemen Agronomi dan hortikultura, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

### **Bahan dan Alat**

Bahan tanam yang digunakan adalah kembang kol. Media yang digunakan adalah media MC (Media MS dengan tambahan 8 ppm IAA + 2,5 ppm KIN + 0,4 mg/L Thiamin, tanpa agar). Eksplan yang digunakan sebagai bahan perbanyakan adalah stek buku tunggal, dan dikulturkan selama 4 minggu. Bahan yang digunakan dalam pembuatan media antara lain *aquades*, larutan stok media MS, IAA, KIN, thiamin, dan gula. Bahan sterilan yang digunakan adalah alkohol 70%, Clorox 10-30%.

Alat yang digunakan yaitu alat untuk perbanyakan kultur adalah botol kultur, plastik dan karet, sprayer yang berisi alkohol 70%, pipet, timbangan, indikator pH/lakmus, sendok kaca, autoklaf, scalpel, gunting, *laminar air flow cabinet*, pinset, gunting, cawan petri, bunsen, rak kultur, termometer ruangan, gelas piala, dan pengaduk kaca. Peralatan pendukung lain adalah alat tulis dan buku yang digunakan untuk mencatat.

### **Metode Penelitian**

Eksplan kembang kol berupa bonggol bunga dari lapangan dicuci dibawah air mengalir dengan deterjen selanjutnya di *shaker* dengan fungisida dan selama 30 menit untuk menghilangkan kontaminan. Selanjutnya kembang kol ditiriskan dan dimasukkan kedalam *laminar air flow cabinet* (LAFC). Selanjutnya eksplan dipotong menjadi ukuran lebih kecil (5-6 cm) untuk disterilisasi pada perlakuan berbagai kombinasi bahan dan waktu sterilisasi (Tabel 1).

**Tabel 1. Perlakuan sterilisasi dengan tahapan dan waktu paparan berbeda**

Kode	Pre-Sterilisasi	Pre-Treatment	Perlakuan
A	Clorox dan air steril	Fungsida dan Bakterisida	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Direndam dengan Clorox 30% selama 15 menit.</li> <li>2. Dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali</li> <li>3. Direndam dengan Clorox 10% selama 10 menit</li> <li>4. Dibilas dengan air steril sebanyak 1 kali.</li> </ol>
B	Clorox dan air steril	Fungsida dan Bakterisida	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Direndam dengan Clorox 30% selama 15 menit.</li> <li>2. Dibilas dengan air steril sebanyak 2 kali</li> <li>3. Direndam dengan Clorox 20% selama 10 menit</li> <li>4. Dibilas dengan air steril sebanyak 2 kali.</li> <li>5. Direndam dengan Clorox 10% selama 10 menit.</li> <li>6. Dibilas dengan air steril sebanyak 1 kali.</li> </ol>
C	Clorox dan air steril	Fungsida dan Bakterisida	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Direndam dengan Clorox 20% selama 10 menit</li> <li>2. Dibilas dengan air steril sebanyak 2 kali.</li> <li>3. Direndam dengan Clorox 10% selama 10 menit</li> <li>4. Dibilas dengan air steril sebanyak 1 kali.</li> </ol>

Eksplan yang telah disterilisasi ditiriskan pada cawan petri selama 5 menit. Selanjutnya eksplan ditanam ke dalam tabung berisi media cair. Komposisi media cair yang digunakan yaitu

MS+IAA+Kinetin+Thiamin. Penanaman dilakukan dengan memasukkan eksplan ke dalam media cair dengan posisi bonggol bunga menghadap ke atas. Parameter yang diamati dalam penelitian adalah persentase eksplan yang steril dan tumbuh pada media induksi organogenesis setelah diberi perlakuan sterilisasi

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Perlakuan berbagai tahapan sterilisasi dalam induksi organogenesis pada *Cauliflower* dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Perlakuan berbagai tahapan sterilisasi dalam induksi organogenesis pada *Cauliflower*.**

Perlakuan	Ulangan	3 HSI		6 HSI		27 HSI		Waktu Organogenesis
		%Planlet hidup	%Planlet mati	%Planlet hidup	%Planlet mati	%Planlet hidup	%Planlet mati	
A	1	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	-
	2	100.00	0.00	80.00	20.00	100.00	0.00	6 HSI
	3	90.00	10.00	83.33	16.67	100.00	0.00	-
B	1	100.00	0.00	83.33	16.67	50.00	50.00	17 HSI
	2	100.00	0.00	83.33	16.67	60.00	40.00	17 HSI
	3	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	-
C	1	100.00	0.00	72.73	27.27	16.67	83.33	-
	2	100.00	0.00	100.00	0.00	83.33	16.67	-
	3	91.67	8.33	72.73	27.27	0.00	100.00	-

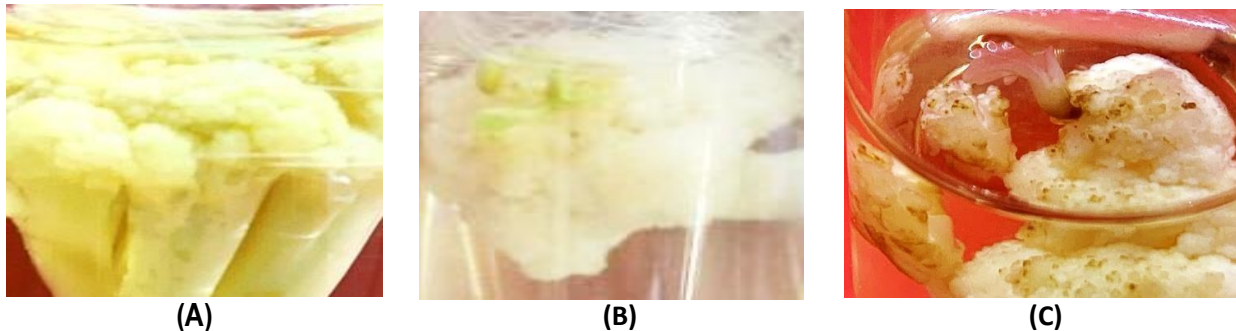
Keterangan: HSI= Hari Setelah Induksi

Berdasarkan Tabel 2, keberhasilan sterilisasi dengan berbagai kombinasi larutan steril dan waktu paparan. Diperoleh hasil terbaik pada metode sterilisasi dengan perlakuan A (Clorox 30% 15 menit, bilas 3 kali air steril, Clorox 10% 10 menit, bilas 1 kali air steril) yaitu persentase hidup plantlet 100% sampai 27 Hari Setelah Induksi (HSI). Perlakuan A juga menunjukkan kejadian organogenesis paling cepat yaitu 6 HSI. Bertolak belakang dengan hasil yang didapat pada perlakuan C (Clorox 20% 10 menit, bilas air steril 2 kali, Clorox 10% 10 menit, bilas air steril 1 kali) yaitu teramati persentase hidup terendah dengan persentase sebesar 16.67% pada 27 HSI. Perlakuan C tidak menunjukkan terjadinya organogenesis meski terdapat satu unit percobaan dengan presentase hidup 83.3%. Perlakuan B juga belum menunjukkan hasil yang memuaskan dengan waktu munculnya organogenesis pada 17 HSI dan presentase hidup plantlet cukup baik.

Hasil percobaan menunjukkan adanya pengaruh perbedaan metode sterilisasi yang digunakan terhadap keberhasilan sterilisasi. Satish *et al.* (2012) melaporkan terdapat perbedaan keberhasilan sterilisasi ketika menggunakan zat dalam sterilisasi yang berbeda. perlakuan A (Clorox 30% 15 menit, bilas 3 kali air steril, Clorox 10% 10 menit, bilas 1 kali air steril) ditemui lebih baik dari perlakuan lain. Natrium hipoklorit banyak dilaporkan sukses sebagai agen sterilan dalam sterilisasi eksplan yang efisien dan tidak melukai eksplan pada berbagai tanaman (Hippolyte, 2000; Maqbool *et al.*, 2010; Bakhsh *et al.*, 2012). Penelitian Nasmin & Indulekha (2019) melaporkan keberhasilan penggunaan *mercuri chloride* sebagai agen sterilan untuk induksi organogenesis *Cauliflower*. Hasil yang memuaskan pada perlakuan A berpotensi untuk dilakukan studi lanjutan mengingat agen sterilan yang digunakan lebih mudah didapatkan dan harga lebih terjangkau.

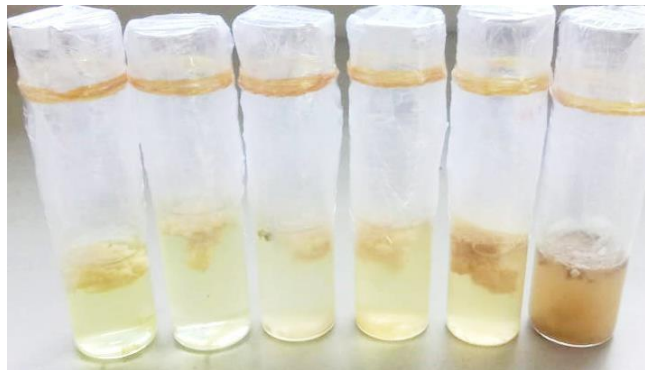
Organogenesis teramati pada eksplan ditampilkan Gambar 1. Gambar 1B dan 1C menunjukkan organogenesis yang ditunjukkan munculnya benjolan berwarna hijau dan tunas. Menurut Nasmin & Indulekha (2019), organogenesis pada *Cauliflower* dapat ditandai dengan terbentuknya struktur bagian

berwarna putih yang kemudian menghijau membentuk tunas pada 20-35 HSI. Selain itu dilaporkan juga organogenesis dapat terjadi melalui jalur tidak langsung (*indirect*) ditandai proliferasi kalus yang tinggi dari jaringan meristematik.



**Gambar 1. Keragaan eksplan *Cauliflower*: (A) tidak terjadi organogenesis; (B) organogenesis berupa benjolan hijau; (C) organogenesis berupa tunas putih.**

Durasi perendaman bisa saja berpengaruh terhadap kematian eksplan. George *et al.* (2008) menyebutkan durasi paparan bahan *sterilant* dapat mengurangi kontaminasi namun durasi tertentu dapat menyebabkan kehilangan eksplan yang cukup tinggi. Danso *et al.* (2011) juga melaporkan terdapat batas optimum durasi paparan bahan kimia sterilan. Durasi paparan Natrium hipoklorit yang terlalu lama dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan kematian eksplan (Colgecen *et al.*, 2011). Durasi paparan Clorox terpanjang adalah pada perlakuan A (terdapat perlakuan Clorox 15 menit). Durasi paparan untuk setiap perlakuan dianggap masih dalam ambang normal mengingat presentase hidup planlet A adalah yang paling tinggi sehingga kematian planlet dapat diduga akibat kontaminasi. Pada Gambar 2 menunjukkan kontaminasi yang terjadi pada percobaan, ditemui gejala teramati berupa media yang keruh dan adanya bakteri. Kontaminasi yang terjadi dapat berasal dari maupun muncul dari berbagai tahapan pekerjaan di laboratorium. Pencegahan kontaminasi dapat dengan menerapkan prosedur *aseptic* dengan benar dan menggunakan metode sterilisasi yang tepat untuk eksplan.



**Gambar 2. Kontaminasi pada eksplan perlakuan C ulangan 2**

#### 4. KESIMPULAN

Diantara metode sterilisasi berbeda yang diuji, perlakuan A yaitu perendaman Clorox 30% selama 15 menit, pembilasan tiga kali air steril, perendaman Clorox 10% selama 10 menit dan bilas satu kali air steril adalah yang paling berhasil ditandai dengan persentase hidup eksplan 100% pada 27 hari setelah inisiasi, kemunculan organogenesis tercepat yaitu 6 hari dan tidak adanya kontaminasi yang terdeteksi.

---

Perlakuan A berpotensi untuk studi lebih lanjut mengingat agen sterilant yang digunakan cukup terjangkau dan dapat diajukan sebagai protokol sterilisasi yang efektif dan efisien untuk kembang kol.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bakhsh, A., Siddiq, S., & Husnain, T. (2012). A Molecular Approach to Combat Spatio- temporal Variation in Insecticidal Gene (Cry1Ac) Expression in Cotton. *Euphytica*, 18(3): 65-74.
- Colgecen, H., Koca, U., & Toker, G. (2011). Influence of Different Sterilization Methods on Callus Initiation and Production of Pigmented Callus in *Arnebia Densiflora* Ledeb. *Turkish Journal of Biology*, 3(5): 513–520.
- Danso, K.E., Azu, E., Elegba, W., Asumeng, A., Amoatey, H.M., Klu, G.Y.P. (2011). Effective Decontamination and Subsequent Plantlet Regeneration of Sugarcane *Saccharum officinarum* L. in vitro. *International Journal of Integrative Biology*, 1(1): 90-96.
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary Immersion Systems in Plant Micropropagation. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 69(3): 215-231.
- George, E.F., Hall, M.A., Klerk, G.J.D. (2007). *Plant Propagation by In Vitro Culture. 3rd edition. Volume 1. The Background*. Exegetic. Basingtone, UK.
- Hippolyte, I. (2000). *In Vitro Rosmarinic Acid Production, Kintzios SE, ed. Sage: The Genus Salvia*. Amsterdam (ND): Harwood Academic Publishers.
- Hiremath, R.C. (2006). *Micropropagation of Ginger Zingiber officinale Rosc. M.Sc. Department of Horticulture College of Agriculture, Dharma University of Agricultural Sciences, Dharma*.
- Leifert, C., & Cassells, A.C. (2001). Microbial Hazards in Plant Tissue and Cell Cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37: 133-138.
- Maqbool, A., Abbas, W., Rao, A.Q., Irfan, M., Zahur, M., Bakhsh, A., Riazuddin, S., & Husnain, T. (2010). *Gossypium Arboreum* GHSP 26 Enhances Drought Tolerance in *Gossypium hirsutum* L. *Biotechnology Progress*. 1(1): 21-25.
- Nasmin, B., & Indulekha, P. (2019). Effect of Growth Regulators on In Vitro Organogenesis in Cauliflower (*Brassica oleracea* L.var botrytis). *International Journal of Botany Studies*, 4(2): 25- 27.
- Qin, Y., Zeng, F., Sun, X., Feng, Y., & Yang, C. (2012). Propagation of *Cleome spinosa* Jacq. Through Tissue Culture. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1(5): 1319-1327.
- Rezadost, H.M., Sohan, M.M., Hatamzadeh, A., & Mirzai, R.M. (2013). In Vitro Regeneration of Sour Orange (*Citrus aurantium* L.) Via Direct Organogenesis. *Plant Knowledge Journal*, 2(1): 150-156
- Satish, T., Arvind, A., Sandeep, K. (2012). Standardizing Sterilization Protocol and Establishment of Callus Culture of Sugarcane for Enhanced Plant Regeneration in vitro. *Research Journal of Botany*. 7(1): 1-7.
- Spini, V.M.B.G., & Kerr, W.E. (2006). Genetic Analysis of a Cross of Gaillon (*Brassica oleracea* var. alboglabra) with Cauliflower (*B. oleracea* var. botrytis). *Genetics and Molecular Biology*, 2(3): 221-222.

Vinterhalter, D., Sretenović-Rajičić, T., Vinterhalter, B., Ninković, S. (2007). Genetic Transformation of *Brassica oleracea* Vegetables. *Transgenic Plant Journal*, 1(2): 340–355.

Webster, S., Mitchell, S.A., & Ahmad, M.H. (2003). *A Novel Surface Sterilization Method for Reducing Fungal and Bacterial Contamination of Field Grown Medicinal Explants Intended for In Vitro Culture*. Proceedings of 17th SRC Conference Entitled Science and Technology for Economic Development: Technology Driven Agriculture and Agro Processing SRC Jamaica.