

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.) Varietas Mammoth

Bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) merupakan tanaman semusim (annual) yang tergolong dalam famili Asteraceae, dengan karakteristik bunga majemuk (*capitulum*) yang tersusun atas floret tepi (*ray florets*) berwarna kuning cerah dan floret cakram (*disc florets*) di bagian tengah. Genus *Helianthus* terdiri atas sekitar 50 spesies, dengan *H. annuus* sebagai satu-satunya spesies tahunan (diploid, $2n=34$) yang dibudidayakan secara luas untuk produksi minyak dan benih, berbeda dengan sebagian besar kerabat liarnya yang bersifat tahunan-menahun (Delen et al., 2024).

Secara struktural, biji bunga matahari sesungguhnya merupakan buah kariopsis kering tunggal biji (*achene*) yang terdiri atas kernel (embrio dan kotiledon) yang terbungkus oleh perikarp atau kulit luar (*hull/pericarp*). Perikarp ini tersusun atas beberapa lapisan jaringan, termasuk lapisan epidermis, hipodermis, sklerenkim, dan lapisan fitomelanin yang bersifat sangat keras, gelap, dan resisten secara mekanis (Jocković et al., 2020). Kekerasan perikarp sangat dipengaruhi oleh jumlah lapisan sklerenkim serta kandungan lignin di dalamnya, yang berperan penting dalam melindungi kernel dari kerusakan mekanis maupun infeksi biologis selama penyimpanan dan penanganan pascapanen (Jocković et al., 2020). Struktur perikarp yang keras dan berlapis inilah yang menjadikan biji bunga matahari tergolong sebagai biji berkulit keras (*hard-coated seed*), yang secara langsung berimplikasi pada tantangan tersendiri dalam proses sterilisasi permukaan untuk keperluan kultur in vitro.

Berdasarkan deskripsi umum produsen benih, varietas 'Mammoth Grey Stripe' dikenal sebagai kultivar bunga matahari tipe raksasa (*giant type*) bersifat *open-pollinated* (OP) pusaka (*heirloom*), dengan karakteristik tinggi tanaman yang dapat mencapai 2,5–3,6 meter, diameter kepala bunga hingga 30 cm, serta biji berukuran besar dengan corak garis abu-abu keputihan yang khas. Perlu ditegaskan bahwa deskripsi ini bersumber dari informasi umum produsen/penyalur benih komersial, bukan dari publikasi ilmiah terverifikasi,

sehingga data agronomis kuantitatif yang lebih presisi (misalnya kadar karbohidrat biji atau uji viabilitas embrio secara laboratoris) tetap memerlukan verifikasi lebih lanjut melalui sumber akademik primer atau pengujian langsung oleh peneliti. Ukuran biji yang relatif besar pada varietas ini berpotensi memengaruhi efisiensi penetrasi bahan sterilan ke permukaan biji, sehingga optimasi protokol sterilisasi menjadi relevan untuk dikaji secara khusus pada varietas ini.

2.2 Kultur In Vitro dan Masalah Kontaminasi

Kultur jaringan atau perbanyakan tanaman secara in vitro merupakan teknik budi daya sel, jaringan, atau organ tanaman dalam kondisi aseptik pada media buatan yang mengandung nutrisi, vitamin, dan zat pengatur tumbuh yang sesuai, sehingga memungkinkan regenerasi tanaman utuh dari eksplan berukuran kecil (George et al., 2008). Prinsip dasar teknik ini bertumpu pada totipotensi sel tanaman, yaitu kemampuan setiap sel hidup untuk beregenerasi menjadi individu tanaman lengkap apabila ditumbuhkan pada kondisi lingkungan dan nutrisi yang sesuai.

Salah satu tantangan utama dalam keberhasilan kultur in vitro adalah kontaminasi mikroba, yang menjadi salah satu kendala paling signifikan dalam praktik kultur jaringan tanaman secara global, baik pada skala penelitian maupun produksi komersial (Reed & Bryce, 2014). Sumber kontaminasi secara umum dapat dikategorikan menjadi kontaminasi eksogen (permukaan), yang berasal dari lingkungan kerja, peralatan, maupun permukaan eksplan itu sendiri, serta kontaminasi endogen atau laten, yang bersumber dari mikroorganisme yang telah berada di dalam jaringan tanaman sejak awal namun tidak terdeteksi pada tahap awal kultur (Reed & Bryce, 2014). Kontaminasi laten menjadi tantangan tersendiri karena mikroorganisme tersebut dapat tetap tidak menunjukkan gejala pada periode awal kultur, namun kemudian bermanifestasi setelah kondisi nutrisi media khususnya kandungan sukrosa dan garam mineral pada media Murashige dan Skoog menjadi lebih mendukung pertumbuhan mikroba dibandingkan kondisi awal jaringan tanaman itu sendiri (Izarra et al., 2020). Berbagai mikroorganisme telah dilaporkan sebagai kontaminan pada kultur jaringan tanaman, meliputi

cendawan filamentous, khamir, dan bakteri, yang dapat menunjukkan gejala segera maupun tetap laten dalam periode waktu yang lama sehingga menyulitkan identifikasi sumber kontaminasi secara pasti (Reed & Bryce, 2014). Temuan ini sejalan dengan hasil penelitian pada biji bunga matahari secara spesifik, di mana infeksi bakteri internal yang bersifat persisten dilaporkan sulit diatasi hanya dengan sterilisasi permukaan konvensional, sehingga memerlukan kombinasi metode sterilisasi yang lebih menyeluruh (Taški-Ajduković & Vasić, 2005).

Pada biji-bijian secara khusus, struktur kulit biji yang berlapis dan berpori berpotensi menjadi tempat persembunyian spora cendawan maupun sel bakteri, baik pada permukaan luar maupun pada celah mikroskopis di antara lapisan perikarp, sehingga memerlukan protokol sterilisasi yang mampu menjangkau seluruh permukaan secara efektif tanpa merusak viabilitas embrio di dalamnya.

2.3 Prinsip Sterilisasi Eksplan Permukaan (*Surface Sterilization*)

Sterilisasi permukaan eksplan merupakan tahap awal yang sangat menentukan keberhasilan keseluruhan proses kultur *in vitro*, khususnya untuk eksplan yang berasal dari kondisi lapang (Habibah et al., 2013; Shofiyani et al., 2019). Prinsip dasar sterilisasi permukaan adalah penggunaan bahan kimia disinfektan yang mampu menonaktifkan mikroorganisme kontaminan pada permukaan eksplan tanpa menimbulkan kerusakan berlebihan pada jaringan hidup di baliknya. Keseimbangan ini menjadi tantangan utama, karena efektivitas sterilisasi secara umum berbanding lurus dengan risiko fitotoksisitas terhadap jaringan eksplan itu sendiri (Bui et al., 2025).

Pada eksplan berkulit keras seperti biji bunga matahari, pendekatan sterilisasi bertahap (*double disinfestation*) menjadi strategi yang relevan diterapkan. Pendekatan ini melibatkan aplikasi lebih dari satu jenis bahan sterilan secara berurutan dan/atau pengulangan tahap perendaman dengan bahan sterilan yang sama, dengan tujuan meningkatkan daya jangkauan bahan kimia ke seluruh permukaan eksplan yang memiliki tekstur tidak rata maupun berpori, sekaligus memberikan jeda waktu bagi jaringan eksplan untuk memulihkan diri dari paparan kimiawi sebelum menerima tahap sterilisasi berikutnya. Kombinasi bahan sterilan dengan mekanisme kerja yang berbeda dapat saling melengkapi dalam

menjangkau berbagai jenis mikroorganisme kontaminan dengan karakteristik dinding sel yang berbeda-beda (McDonnell & Russell, 1999).

2.4 Peran Alkohol sebagai Agen Sterilan

Alkohol, khususnya etanol, merupakan salah satu bahan sterilan yang paling umum digunakan dalam laboratorium kultur jaringan karena kemampuannya bekerja cepat dan efektif terhadap berbagai jenis mikroorganisme. Secara mekanistik, alkohol bekerja melalui dua jalur utama, yaitu denaturasi protein struktural dan enzimatis mikroorganisme, serta pelarutan komponen lipid pada membran dan dinding sel mikroba, sehingga menyebabkan kebocoran isi sel dan kematian mikroorganisme (McDonnell & Russell, 1999). Mekanisme ganda inilah yang menjadikan alkohol efektif terhadap spektrum mikroorganisme yang luas, termasuk bakteri Gram-positif, Gram-negatif, maupun sebagian cendawan.

Meskipun efektif, penggunaan alkohol sebagai sterilan eksplan memiliki risiko fitotoksisitas yang perlu dipertimbangkan secara cermat, karena alkohol pada dasarnya juga bersifat toksik terhadap jaringan tanaman hidup, sehingga eksplan umumnya hanya direndam dalam larutan alkohol selama beberapa detik hingga beberapa menit untuk menghindari kerusakan jaringan yang ireversibel (George et al., 2008). Tingkat toksisitas ini sangat dipengaruhi oleh interaksi antara konsentrasi bahan dan durasi paparan; semakin tinggi konsentrasi alkohol yang digunakan, semakin besar pula risiko kerusakan pada jaringan permukaan eksplan, meskipun daya bunuh mikrobanya turut meningkat (Bui et al., 2025). Sebaliknya, konsentrasi alkohol yang terlalu rendah berisiko tidak mampu menembus dan menonaktifkan seluruh populasi mikroorganisme kontaminan secara tuntas, sehingga menyisakan potensi kegagalan sterilisasi maupun kontaminasi laten yang muncul pada periode inkubasi lanjutan. Oleh karena itu, penentuan konsentrasi alkohol yang optimal yang mampu menyeimbangkan efektivitas antimikroba dengan keamanan jaringan menjadi aspek krusial dalam pengembangan protokol sterilisasi eksplan biji berkulit keras seperti bunga matahari.

2.5 Peran Natrium Hipoklorit (Bayclin) dalam Sterilisasi

Natrium hipoklorit (NaOCl) merupakan bahan aktif utama pada larutan pemutih komersial seperti Bayclin, dan menjadi salah satu bahan sterilan yang paling banyak digunakan dalam sterilisasi eksplan kultur jaringan karena efektivitasnya yang tinggi dan biayanya yang relatif terjangkau (Bui et al., 2025). Secara mekanistik, natrium hipoklorit bekerja melalui proses oksidasi, di mana senyawa aktif klorin dalam bentuk asam hipoklorit (HOCl) dan ion hipoklorit (OCl^-) menyerang berbagai komponen seluler mikroorganisme, termasuk gugus sulfhidril ($-\text{SH}$) pada enzim esensial, gugus amino pada protein, serta lapisan fosfolipid pada membran sel, sehingga menyebabkan inaktivasi enzimatik yang bersifat ireversibel dan gangguan metabolisme sel secara menyeluruh (Estrela et al., 2002). Bentuk asam hipoklorit yang tidak terionisasi (HOCl) memiliki daya penetrasi yang lebih baik terhadap membran lipid mikroorganisme dibandingkan bentuk ion hipoklorit (OCl^-), sehingga efektivitas antimikroba natrium hipoklorit turut dipengaruhi oleh pH larutan (Estrela et al., 2002).

Meskipun efektif terhadap berbagai jenis kontaminan permukaan, penggunaan natrium hipoklorit pada konsentrasi tinggi maupun durasi paparan yang berlebihan tetap berisiko menimbulkan kerusakan jaringan eksplan, sebagaimana dilaporkan pada penelitian yang membandingkan efektivitas sterilan pada regenerasi *in vitro* tanaman berkayu, di mana peningkatan konsentrasi sterilan secara konsisten menurunkan tingkat kontaminasi namun turut meningkatkan risiko kematian eksplan akibat efek fitotoksik (Bui et al., 2025). Dibandingkan dengan alkohol yang bekerja melalui pelarutan lipid dan denaturasi protein secara langsung, mekanisme oksidatif natrium hipoklorit cenderung bekerja lebih optimal pada permukaan eksplan dan kurang efektif menembus lapisan lipid yang lebih dalam, sehingga kombinasi kedua bahan sterilan ini alkohol yang mendahului aplikasi natrium hipoklorit diharapkan mampu saling melengkapi dalam mencapai efektivitas sterilisasi yang lebih menyeluruh pada eksplan biji berkulit keras seperti bunga matahari varietas Mammoth.