

Addition of Red Onion Extract and Sprouts Extract to the Growth of Stevia (*Stevia Rebaudiana* B) In Vitro Using MS Media and Simple Media
[Penambahan Ekstrak Bawang Merah dan Ekstrak Kecambah Terhadap Pertumbuhan Stevia (*Stevia Rebaudiana* B) Secara In Vitro Dengan Media MS dan Media Sederhana]

Ramadhan Ilham Aqsal Mollah¹⁾, Intan Rohma Nurmalasari^{*2)}

¹⁾Program Studi Agroteknologi, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia

²⁾ Program Studi Agroteknologi, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia

*Email Penulis Korespondensi: intan.rohma@umsida.ac.id

Abstract. *This study aimed to investigate the effects of red onion extract and mung bean sprout extract on the in vitro growth of Stevia (*Stevia rebaudiana* B). Stevia is a promising low-calorie natural sweetener plant, but conventional propagation is often limited. Tissue culture offers an effective solution, although commonly used MS media is relatively expensive. Therefore, this study also evaluates the potential of using a simple, low-cost medium as an alternative. The research consisted of three experimental trials. Results showed that red onion extract produced the highest number of shoots, up to 11 shoots, outperforming synthetic PGR Benzyl Amino Purine (BAP) and sprout extract treatments. The use of activated charcoal effectively reduced browning, while the simplified medium agar, gandasil B and water (without MS salts) demonstrated higher sterility levels. Although mung bean sprout extract showed some positive effects, its performance was inconsistent. The length of the explant and number of nodes also influenced shoot formation. Overall, the combination of red onion extract and simple medium was the most effective in promoting Stevia shoot development. This study highlights the potential of natural plant growth regulators as eco-friendly alternatives in tissue culture, though further optimization is needed to achieve consistent and contamination-free results.*

Keywords – Tissue Culture; *Stevia Rebaudiana* B; PGR; Red Onion; Sprout Extract; Simple Medium.

Abstrak. *Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh penambahan ekstrak bawang merah dan ekstrak kecambah kacang hijau terhadap pertumbuhan tanaman Stevia (*Stevia rebaudiana* B) secara in vitro. Stevia merupakan tanaman pemanis alami rendah kalori yang prospektif, namun sulit diperbanyak secara konvensional. Kultur jaringan menjadi solusi efektif, namun media MS yang umum digunakan tergolong mahal. Oleh karena itu, penelitian ini juga mengevaluasi potensi media sederhana sebagai alternatif ekonomis. Penelitian dilakukan dalam tiga percobaan. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak bawang merah menghasilkan jumlah tunas terbanyak, mencapai 11 tunas, mengungguli ZPT sintetis Benzyl Amino Purine (BAP) dan ekstrak kecambah. Penggunaan arang aktif terbukti mampu mengurangi browning, sedangkan media sederhana berupa agar, gandasil B dan air (tanpa MS) menunjukkan tingkat sterilitas lebih tinggi. Meskipun ekstrak kecambah menunjukkan hasil positif pada beberapa perlakuan, efektivitasnya cenderung tidak stabil. Faktor panjang eksplan dan jumlah ruas batang juga mempengaruhi jumlah tunas. Secara keseluruhan, ekstrak bawang merah dan media sederhana menjadi kombinasi terbaik dalam mendukung pertumbuhan tunas stevia. Penelitian ini menunjukkan bahwa ZPT alami berpotensi menjadi alternatif ramah lingkungan dalam kultur jaringan, namun tetap diperlukan optimasi lanjutan untuk hasil yang konsisten dan bebas kontaminasi.*

Kata Kunci – Kultur Jaringan; *Stevia Rebaudiana* B; ZPT; Bawang Merah; Kecambah; Media Sederhana.

I. PENDAHULUAN

Tumbuhan merupakan kebutuhan yang tidak bisa dipisahkan dari manusia. Banyak manfaat dan kegunaannya terutama kandungan antioksidan [1]. *Stevia rebaudiana* B, adalah semak abadi dari keluarga Compositae yang ditanam di banyak tempat di seluruh dunia karena kandungan antioksidan dan citarasanya yang khas. Steviol glikosida, yang memiliki rasa manis 100 hingga 300 kali lipat dari sukrosa, membuatnya terkenal dengan rasa manisnya [2]. Menurut banyak penelitian, ekstrak stevia lebih baik daripada gula dan pemanis buatan [3]. Stevia tumbuh dengan baik pada suhu 15°C hingga 35°C dan pada pH optimalnya yaitu 5,5 hingga 6 dengan kelembapan tanah hingga 70% [4]. Seskuitерpen lakton, diterpen, longipinan, dan flavonoid adalah fitokimia utama dari anggota genus ini. Sebagian besar aktivitas farmakologis ekstrak stevia dan senyawanya telah dijelaskan; yang paling umum adalah sifat antioksidan, antiparasit, antivirus, anti-inflamasi, dan antiproliferatif [5]. Stevia di dataran sedang mampu beradaptasi dengan baik dan dengan laju fotosintesis yang tinggi, lahan menengah mempunyai potensi sebagai lahan baru untuk pengembangan stevia di iklim tropis [6].

Stevia (*Stevia rebaudiana* B) merupakan tanaman yang dikenal memiliki kadar pemanis alami tinggi, khususnya steviosida, yang hingga 300 kali lebih manis dibandingkan sukrosa namun rendah kalori [5]. Permintaan akan stevia meningkat seiring dengan minat masyarakat terhadap pemanis alami sebagai alternatif pengganti gula untuk gaya hidup sehat. Namun, pertumbuhan dan perbanyakannya stevia sering menghadapi tantangan, terutama dalam

skala komersial. Kultur *in vitro* telah banyak digunakan untuk mengatasi kendala tersebut, di mana media pertumbuhan dapat dikendalikan untuk memperoleh hasil yang optimal [7].

Media sederhana merupakan formulasi yang disusun dari agar-agar sebagai agen pematat, Gandasil B sebagai sumber nutrisi makro dan mikro esensial, serta air yang berfungsi sebagai pelarut sekaligus medium pencampuran bahan aktif yang digunakan pada tiap perlakuan. Kombinasi sederhana ini mampu menyediakan kondisi dasar yang cukup untuk menopang pertumbuhan eksplan, meskipun tidak sekompleks media MS yang umumnya digunakan dalam kultur jaringan. Agar-agar berperan menjaga kestabilan tekstur media, sehingga eksplan tetap berada dalam posisi yang sesuai untuk penyerapan nutrisi. Sementara itu, Gandasil B mengandung unsur hara seperti nitrogen, fosfor, kalium, serta unsur mikro yang mendukung pembelahan sel dan pembentukan tunas. Air berfungsi melarutkan semua komponen tersebut agar dapat tersedia dalam bentuk yang mudah diserap oleh jaringan tanaman. Dengan susunan yang lebih sederhana, media ini menjadi alternatif ekonomis yang tetap mampu menunjang keberhasilan awal pertumbuhan tanaman *Stevia rebaudiana* secara *in vitro* [8].

Auksin eksogen adalah zat pengatur tumbuh yang bisa mempercepat proses pembentukan akar. Pembentukan akar ini membantu tanaman menyerap unsur hara dan air dari tanah lebih cepat. Dengan penyerapan yang lebih efisien, pertumbuhan dan hasil panen tanaman akan meningkat karena peran auksin yang mampu merangsang perpanjangan sel di bagian meristem pucuk [9]. Fitohormon yang terdapat dalam bawang merah adalah auksin, allithiamin, dan giberelin. Auksin berperan dalam meningkatkan tinggi tanaman, mempercepat pembelahan sel, pertumbuhan diferensiasi, percabangan biji, perkembangan kuncup, pemanjangan batang, pertumbuhan daun, serta mempengaruhi pertumbuhan percabangan [10]. Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai bahan dasar pupuk organik adalah bawang merah dan kecambah. Kedua tanaman ini mengandung mineral, kalium, fosfor, dan vitamin B yang berfungsi sebagai katalis dalam proses penyerapan nutrisi. Selain itu, bawang merah juga mengandung hormon auksin dan giberelin, yang merupakan zat pengatur tumbuh alami [11]. Bawang merah juga bisa digunakan sebagai bahan pupuk karena mengandung kalsium, fosfor, dan besi yang merupakan unsur penting dalam pertumbuhan tanaman [12].

Penambahan ekstrak bawang merah dan ekstrak kecambah diketahui bisa mendorong pertumbuhan tanaman [13]. Bawang merah memiliki hormon alami seperti auksin dan giberelin yang mampu membantu pembentukan akar dan pertumbuhan sel [14], sedangkan kecambah kaya akan enzim dan hormon yang juga bisa mendukung pertumbuhan tanaman [15]. Karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melihat dampak penambahan ekstrak bawang merah dan ekstrak kecambah terhadap pertumbuhan *stevia* yang ditanam di dalam ruangan menggunakan media MS dan media sederhana [16].

Penggunaan ZPT sintetis berupa Benzyl Amino Purine (BAP) dengan kandungan sitokinin sintetis juga digunakan dalam penelitian ini dengan tujuan sebagai pembanding efektivitas antara ZPT alami dan ZPT sintetis. BAP dikenal mampu merangsang pembelahan sel, inisiasi tunas, serta mempercepat pertumbuhan jaringan tanaman dalam kultur *in vitro*. Dengan sifatnya yang lebih stabil dan konsentrasi yang terukur, BAP sering dijadikan standar dalam kultur jaringan untuk mengevaluasi sejauh mana ekstrak alami seperti bawang merah atau kecambah dapat menyaingi kinerja zat pengatur tumbuh sintetis [17]. Perbandingan ini penting dilakukan agar dapat diketahui potensi nyata ZPT alami dalam menggantikan penggunaan zat kimia sintetis, sehingga kultur jaringan dapat dikembangkan dengan cara yang lebih ramah lingkungan dan ekonomis.

Penelitian ini ingin menguji pengaruh penambahan ekstrak bawang merah dan ekstrak kecambah terhadap pertumbuhan tanaman *stevia* (*Stevia rebaudiana* B) secara *in vitro*. *Stevia* adalah tanaman yang menghasilkan pemanis alami dengan kalori rendah yang sangat potensial, tetapi dalam budidaya cara konvensional sering mengalami hambatan. Teknik kultur jaringan bisa menjadi solusi yang efektif untuk memperbanyak tanaman secara besar-besaran, tetapi penggunaan media standar seperti Murashige and Skoog (MS) biasanya mahal. Itu sebabnya, dalam penelitian ini juga dilihat peluang penggunaan media sederhana sebagai alternatif yang lebih murah. Tiga pertanyaan utama yang ingin dijawab adalah: (1) Bagaimana pengaruh penambahan ekstrak bawang merah terhadap pertumbuhan *stevia* secara *in vitro*? (2) Bagaimana pengaruh penambahan ekstrak kecambah terhadap pertumbuhan *stevia* secara *in vitro*? (3) Apakah ada perbedaan efek antara media MS dan media sederhana pada pertumbuhan *stevia* yang diberi ekstrak bawang merah dan kecambah? Berdasarkan pertanyaan-pertanyaan tersebut, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak bawang merah dan ekstrak kecambah, serta membandingkan efektivitas media MS dan media sederhana terhadap pertumbuhan *stevia* secara *in vitro*. Kami menduga bahwa penambahan kedua ekstrak tersebut akan berdampak positif pada pertumbuhan *stevia*, dan terdapat perbedaan efektivitas antara penggunaan media MS dan media sederhana.

II. METODE

Penelitian ini menggunakan metode kualitatif dan kuantitatif yang kemudian dijabarkan dengan studi deskriptif untuk memperkuat dugaan hasil pengamatan [18]. Pendekatan kuantitatif dilakukan melalui pencatatan parameter pertumbuhan seperti jumlah tunas, panjang eksplan, serta tingkat keberhasilan kultur, sedangkan pendekatan kualitatif dilakukan dengan mengamati kondisi fisiologis eksplan, seperti terjadinya browning, tingkat kontaminasi, maupun respon morfologis tanaman terhadap perlakuan media. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif untuk memberikan penjelasan menyeluruh [19] mengenai efektivitas penggunaan ZPT alami dibandingkan ZPT sintetis dengan konsentrasi yang sama 1 ZPT tiap perlakuan serta perbedaan antara media sederhana dan media MS. Dengan kombinasi metode tersebut, penelitian ini tidak hanya menghasilkan angka sebagai indikator keberhasilan, tetapi juga memberikan interpretasi yang lebih dalam mengenai faktor-faktor yang memengaruhi pertumbuhan stevia secara *in vitro*.

Lokasi penelitian di laboratorium rumahan Taman RinDuh yang berada di Desa Candinegoro, Kecamatan Wonoayu. Penelitian berlangsung selama 9 bulan, mulai dari November 2024 hingga Juli 2025. Alat yang digunakan termasuk pinset, pisau steril, bunsen, cawan petri, jar kultur, gelas, wadah sambal, kertas pH, batang pengaduk, gelas ukur, dan enkas. Bahan yang digunakan mencakup bibit tanaman stevia, agar-agar, media MS, gandasil B, arang aktif, air kelapa muda, sari tomat, air rebusan kentang, aquades, gula, alkohol, fungisida Antracol, bakterisida, betadine, sabun cuci piring, dan cairan pemutih pakaian [20].

Pada percobaan pertama media kultur dibuat dengan dua jenis formulasi, yaitu media MS sederhana (campuran sari tomat, air kelapa muda, air rebusan kentang, gula, gandasil B, serta campuran MS dengan agar-agar). Media tersebut disterilkan dengan direbus pada suhu 120°C selama 30 menit. Ekstrak bawang merah dan ekstrak kecambah disiapkan dengan cara membersihkan bahan baku, kemudian menghaluskan menggunakan blender dan menambahkan aquades. Setelah itu, ekstrak disimpan di lemari es. Seluruh alat juga disterilkan dengan dicuci, dibilas menggunakan cairan pemutih, dan disemprot alkohol 70%. Pengambilan dan penanaman eksplan dilakukan di pagi hari. Eksplan dipotong berukuran 2–5 cm setelah disterilisasi, lalu ditanam pada media padat. Perawatan mencakup menjaga suhu ruangan di bawah 20°C di dalam box dengan penambahan es batu sebagai pendinginnya, membersihkan rak penyimpanan jar, menggunakan penerangan lampu LED 20 watt, serta menyemprotkan alkohol 70% setelah pengamatan [20].

Pada percobaan kedua, media kultur yang digunakan memiliki formulasi hampir sama dengan percobaan pertama, namun dilakukan modifikasi dengan penambahan arang aktif sebagai penetralisir senyawa flavonoid yang berpotensi memicu browning pada eksplan. Arang aktif berfungsi menyerap senyawa fenolik hasil oksidasi, sehingga kondisi media tetap mendukung pertumbuhan jaringan [21]. Selain itu, pengaturan suhu ruang kultur dijaga lebih stabil pada kisaran 18°C–20°C untuk menekan pertumbuhan mikroorganisme kontaminan sekaligus menciptakan lingkungan optimal bagi regenerasi eksplan. Modifikasi ini bertujuan untuk mengurangi kegagalan yang terjadi pada percobaan pertama serta meningkatkan peluang keberhasilan kultur jaringan stevia pada tahap inisiasi tunas.

Percobaan ketiga dilakukan dengan menggunakan media sederhana 0 MS yang hanya terdiri dari agar sebagai pematat, Gandasil B sebagai sumber nutrisi, dan air sebagai pelarut utama. Formulasi sederhana ini dipilih untuk mengurangi kandungan garam mineral kompleks yang dapat memicu stres osmotik pada eksplan stevia. Sama seperti pada perlakuan kedua, suhu ruang dikontrol pada kisaran 18°C–20°C untuk menjaga kondisi stabil bagi pertumbuhan eksplan serta meminimalkan risiko kontaminasi. Sebagai langkah tambahan, sterilisasi dilakukan kembali menggunakan laminar air flow yang dilengkapi dengan penyinaran sinar UV [22], sehingga area kerja benar-benar bebas dari mikroorganisme dan mendukung keberhasilan inisiasi kultur jaringan.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Percobaan Pertama

Pada percobaan awal pembudidayaan tanaman *Stevia rebaudiana* B menggunakan metode kultur jaringan, eksplan ditanam ke dalam media sederhana yang kaya akan ZPT alami, yaitu ekstrak bawang merah dan kecambah. Dalam dua hari pertama pengamatan, terdapat 70% media kultur yang tetap steril tanpa tanda-tanda kontaminasi. Hal ini menunjukkan bahwa cara membuat media dan metode sterilisasi yang digunakan cukup efektif dalam menciptakan lingkungan bebas kontaminasi. Meskipun media yang digunakan tidak sebaik media kultur komersial seperti MS (Murashige and Skoog), tetapi tetap mampu memberikan kondisi yang cukup baik untuk mendukung pertumbuhan awal jaringan, setidaknya dalam tahap sterilisasi [23].

Selain itu, proses sterilisasi eksplan dan teknik penanaman juga berperan penting dalam keberhasilan awal ini. Eksplan yang digunakan berasal dari bagian tanaman *Stevia* yang masih muda, kemudian disterilkan dengan metode kimia menggunakan alkohol dan ditanam dengan teknik aseptik di dalam enkas [24]. Selama tiga hari setelah penanaman, tidak ditemukan tanda-tanda kontaminasi pada eksplan maupun media, menandakan bahwa metode sterilisasi telah berjalan dengan baik dan dapat mempertahankan kondisi steril. Keberhasilan ini penting, mengingat pada tahap inisiasi, eksplan sangat rentan terhadap serangan mikroorganisme, terutama jika sterilisasi tidak dilakukan secara optimal.



Gambar 1. Penanaman eksplan



Gambar 2. Sampel percobaan ke-1

Namun demikian, hasil pengamatan pada hari ketujuh setelah penanaman menunjukkan adanya permasalahan fisiologis pada eksplan. Tanaman mengalami browning, yaitu perubahan warna jaringan menjadi coklat gelap yang terjadi secara progresif dan berujung pada pembusukan jaringan. Browning ini merupakan reaksi fisiologis akibat oksidasi senyawa fenolik, khususnya flavonoid, yang terkandung dalam eksplan [5]. Dalam konteks ini, eksplan *Stevia* diduga mengandung flavonoid dalam kadar tinggi, dan dalam kondisi kultur in vitro yang tertutup serta tidak adanya sistem transportasi alami seperti di tanaman utuh, senyawa tersebut tidak terdistribusi dengan baik dan justru mengendap di jaringan. Oksidasi flavonoid menghasilkan radikal bebas dan senyawa toksik yang memicu kematian sel tanaman.

Kondisi ini diperparah karena media yang digunakan belum dilengkapi dengan antioksidan atau bahan penetral browning seperti asam askorbat atau PVP (polyvinylpyrrolidone), yang sering ditambahkan dalam kultur jaringan tanaman yang kaya metabolit sekunder [25]. Akibat dari browning ini, eksplan kemudian membusuk secara menyeluruh, yang menjadi pemicu masuknya kontaminan dari lingkungan sekitar, baik berupa bakteri maupun jamur. Ini membuktikan bahwa meskipun media awal steril dan teknik sterilisasi sudah memadai, keberhasilan kultur jaringan juga sangat tergantung pada kondisi fisiologi tanaman, keseimbangan zat pengatur tumbuh, dan pengendalian senyawa metabolit sekunder.



Gambar 3. Browning pada sampel pucuk daun



Gambar 4. Browning pada sampel batang

Selain itu, ZPT alami dari ekstrak bawang merah dan kecambah, meskipun mengandung senyawa seperti auxin dan sitokinin alami, belum tentu memiliki komposisi dan konsentrasi yang ideal bagi eksplan Stevia. Kandungan senyawa bioaktif dalam ekstrak alami cenderung tidak konsisten dan dapat berbeda tergantung umur bahan, kondisi ekstraksi, dan bagian yang digunakan [26]. Oleh karena itu, meskipun dapat menjadi alternatif ZPT komersial, penggunaannya membutuhkan optimalisasi lebih lanjut agar tidak memicu stress fisiologis pada jaringan tanaman.

Secara keseluruhan, hasil ini menunjukkan bahwa penggunaan media sederhana dan ZPT alami dalam kultur jaringan dapat berhasil pada tahap awal, namun diperlukan pendekatan tambahan untuk mencegah browning dan memastikan kelangsungan hidup eksplan hingga fase regenerasi. Perlu dilakukan pengujian lanjutan dengan penambahan senyawa anti-browning, pengaturan dosis ekstrak ZPT alami, serta penggunaan eksplan dari bagian tanaman yang lebih rendah kandungan metabolit sekundernya [21].

B. Hasil Percobaan Kedua

Setelah mengevaluasi hasil dari percobaan pertama, dilakukan modifikasi pada media kultur untuk percobaan kedua. Kali ini, media yang digunakan masih mengacu pada formulasi awal, namun ditambahkan arang aktif sebagai upaya untuk menetralkan senyawa flavonoid yang diduga menjadi penyebab utama terjadinya browning pada eksplan Stevia. Arang aktif diketahui efektif dalam menyerap senyawa fenolik dan metabolit sekunder lainnya, sehingga dapat mencegah oksidasi yang memicu browning [27]. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa selama tiga hari setelah media dibuat, 100% media tetap steril dan tidak mengalami kontaminasi, menandakan bahwa penambahan arang aktif tidak mengganggu kondisi aseptik media, bahkan cenderung memperbaikinya [28].

Namun, keberhasilan awal ini tidak sepenuhnya berlanjut saat proses penanaman eksplan. Penanaman dilakukan pada hari ketujuh setelah media siap, namun hasilnya menunjukkan bahwa sebanyak 50% media mengalami kontaminasi secara tiba-tiba. Investigasi penyebab kontaminasi menunjukkan adanya faktor teknis, yakni tutup botol yang berkarat akibat terciprat media panas saat proses penuangan. Karat ini berpotensi menjadi tempat berkembangnya mikroorganisme dan memicu kontaminasi internal. Di sisi lain, sebagian kontaminasi lainnya juga disebabkan oleh masuknya mikroba dari luar, diduga melalui udara atau kontak permukaan alat yang tidak sepenuhnya steril [29].



Gambar 5. Sampel percobaan Ke-2

Penanaman tetap dilanjutkan pada 50% media yang tersisa dan tampak bersih, namun hasilnya menunjukkan bahwa semua eksplan yang ditanam tetap mengalami kontaminasi, meskipun telah dilakukan sterilisasi maksimal di bawah laminar air flow di sinari lampu UV selama 30 menit sebelum dan sesudah penanaman. Hal ini menjadi indikasi

bahwa kontaminasi tidak semata-mata berasal dari lingkungan luar, tetapi bisa juga berasal dari eksplan itu sendiri karena endofit (mikroba dari dalam jaringan tanaman) atau karena senyawa eksplan yang rusak selama proses sterilisasi. Faktor lingkungan sebetulnya sudah dikondisikan secara optimal. Proses kultur dilakukan dalam ruang steril dengan suhu yang dikontrol pada 18°C, yang tergolong ideal untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Namun, hasil yang tetap menunjukkan kontaminasi menandakan bahwa penyebab utama bukan dari suhu atau ruang inkubasi, melainkan lebih kepada proses awal penanaman dan kualitas eksplan itu sendiri[30].



Gambar 6. Eksplan Terkontaminasi Mikroba

Dugaan lain yang perlu diperhatikan adalah bahwa penambahan arang aktif, meskipun berhasil menekan browning, juga dapat menyerap nutrisi atau ZPT alami yang ditambahkan dari ekstrak bawang merah dan kecambah, sehingga mempengaruhi keseimbangan media secara keseluruhan [21]. Selain itu, arang aktif juga dapat mengganggu pH media jika tidak dikontrol dengan tepat. Ketidakseimbangan ini bisa memicu stress fisiologis pada eksplan, yang kemudian menjadi pintu masuk kontaminasi.

Berdasarkan hasil percobaan kedua ini, dapat disimpulkan bahwa meskipun langkah perbaikan dengan arang aktif memberikan hasil positif dalam mengurangi browning, pengendalian teknis sterilisasi alat dan akurasi saat proses penanaman tetap menjadi tantangan utama. Kontaminasi akibat faktor non-biologis seperti tutup botol berkarat menunjukkan bahwa keberhasilan kultur jaringan sangat sensitif terhadap detail kecil dalam proses pelaksanaan. Evaluasi menyeluruh terhadap kebersihan alat, eksplan yang digunakan, hingga teknik handling perlu terus ditingkatkan agar memperoleh hasil kultur yang optimal dan bebas kontaminasi [31].

C. Hasil Percobaan Ketiga

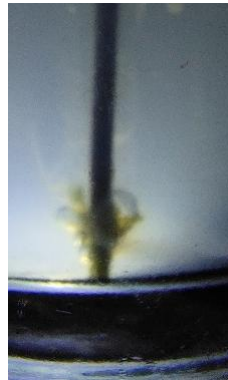
Percobaan ketiga dilakukan dengan pendekatan berbeda, yaitu menggunakan media dasar sederhana tanpa garam-garam kompleks dari MS (Murashige and Skoog). Komposisi media terdiri dari air, agar, Gandasil B, serta ZPT alami (ekstrak bawang merah dan kecambah) sesuai perlakuan. Formulasi ini berdasarkan literatur yang merekomendasikan "0 MS" sebagai media inisiasi untuk kultur jaringan Stevia, karena tanaman ini tergolong sensitif terhadap konsentrasi garam mineral tinggi pada fase awal kultur [21].



Gambar 7. Media 0 MS Percobaan Ke-3

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa media dengan formulasi ini memiliki stabilitas sterilitas yang sangat baik. Seluruh media tidak mengalami kontaminasi, bahkan terdapat satu media yang dibiarkan tanpa penutup dan tetap bebas dari mikroorganisme, meskipun ditanami eksplan tambahan. Hal ini menunjukkan bahwa formulasi media yang lebih ringan, tanpa komponen kompleks seperti MS, tidak hanya mendukung sterilitas yang lebih tinggi, tetapi juga

mengurangi potensi mikroba berkembang, karena ketersediaan nutrisi yang lebih terbatas bagi mikroorganisme, namun masih mencukupi untuk eksplan tanaman[21].



Gambar 8. Tunas Di Ruas Eksplan **Gambar 9.** Tunas di dalam media **Gambar 10.** Tunas menembus media

Hasil penanaman eksplan selama 7 hari menunjukkan respon yang sangat positif. Teramati adanya pertumbuhan tunas-tunas baru, yang merupakan indikator awal keberhasilan regenerasi. Perlakuan dengan ekstrak bawang merah memberikan hasil paling signifikan dalam merangsang pertumbuhan tunas, dibandingkan perlakuan lain. Hal ini dapat dikaitkan dengan kandungan ZPT alami dalam bawang merah, terutama auksin dan sitokinin dalam rasio yang mendukung inisiasi dan pemanjangan tunas [26]. Beberapa literatur menyebutkan bahwa bawang merah mengandung senyawa seperti IAA (Indole-3-Acetic Acid) dan zeatin, yang berperan penting dalam proses morfogenesis tanaman.

Perlakuan dengan ekstrak kecambah dan BAP (ZPT sintetis sebagai kontrol) menunjukkan hasil yang sebanding, yaitu adanya pertumbuhan tunas, meskipun tidak sekuat ekstrak bawang merah. Ini menunjukkan bahwa baik ZPT alami dari kecambah maupun bahan sintetis tetap memiliki efek biologis, namun efektivitasnya masih dipengaruhi oleh konsentrasi dan komposisi masing-masing.

Meskipun hasilnya ada yang berhasil, percobaan ini juga mengalami browning pada beberapa eksplan, serupa dengan yang terjadi pada percobaan pertama. Hal ini disebabkan karena tidak adanya penambahan arang aktif dalam media. Seperti diketahui, *Stevia* merupakan tanaman dengan kandungan flavonoid tinggi, dan dalam kondisi kultur *in vitro* yang tertutup, senyawa ini cenderung terakumulasi dan teroksidasi menjadi senyawa toksik yang menyebabkan browning, kerusakan jaringan [5], dan berpotensi menghambat pertumbuhan tunas lebih lanjut. Ketidakhadiran arang aktif dalam media menjadi titik lemah dalam formulasi ini, mengingat pada percobaan kedua, penggunaan arang aktif terbukti mampu mencegah browning meskipun tidak sepenuhnya menyelamatkan eksplan dari kontaminasi.

Secara keseluruhan, percobaan ketiga memberikan hasil paling tampak dibandingkan dua percobaan sebelumnya. Kombinasi media ringan dengan ZPT alami terbukti efektif dalam mendukung pertumbuhan awal kultur *Stevia*, selama penanganan sterilisasi dan kualitas eksplan tetap terjaga. Keseimbangan antara kesederhanaan media dan pengendalian fisiologis tanaman, seperti penggunaan arang aktif dan pemilihan eksplan yang tepat, tetap menjadi kunci penting dalam mengoptimalkan hasil kultur jaringan *Stevia* ke tahap lanjut, seperti perbanyakan massal atau regenerasi tanaman utuh.

Pertumbuhan tunas yang baik pada percobaan ketiga disebabkan oleh penggunaan media dengan kandungan nutrisi yang lebih ringan dan mudah diserap oleh eksplan, dibandingkan media MS penuh. Media berbasis air, agar, dan Gandasil B memberikan nutrisi makro dan mikro dalam jumlah seimbang namun tidak berlebih, sehingga eksplan *Stevia* yang sensitif terhadap konsentrasi garam tinggi tidak mengalami stres osmotik [32]. Formulasi ini mendukung proses pembelahan dan diferensiasi sel secara optimal, sehingga mendukung regenerasi tunas secara aktif. Nutrisi yang ringan juga meminimalkan akumulasi senyawa metabolit yang berpotensi memicu browning, sehingga eksplan dapat bertahan dan tumbuh lebih baik dalam jangka waktu awal kultur.



Gambar 11. Ulangan 1



Gambar 12. Ulangan 2



Gambar 13. Ulangan 3



Gambar 14. Ulangan 4

Pada perlakuan dengan ekstrak bawang merah, hasilnya merupakan yang paling baik di antara perlakuan lain, dengan kemunculan 9 tunas pada ulangan ke-1 dan 11 tunas pada ulangan ke-3. Hal ini diduga besar disebabkan oleh kandungan ZPT alami dalam bawang merah, seperti auksin (IAA) dan sitokinin (zeatin), yang berperan dalam merangsang pembentukan tunas dan pembelahan sel [33]. Selain itu, bawang merah juga mengandung senyawa sulfur dan antioksidan yang membantu mengurangi stres oksidatif pada eksplan, sehingga proses morfogenesis dapat berlangsung lebih efektif.

Tabel 1. Hasil pengamatan dengan perlakuan ekstrak bawang merah 7 hari setelah tanam

Perlakuan	Ulangan	Sampel	Panjang Sampel	Jumlah Tunas
Media sederhana dengan ekstrak bawang merah	1	A	20,1 cm	7
		B	13 cm	2
	2	A	12,1 cm	6
		B	10,2 cm	4
	3	A	18,2 cm	6
		B	15,9 cm	5
	4	A	15,9 cm	2
		B	7,4 cm	2

Pada percobaan ketiga, perlakuan dengan penambahan ekstrak bawang merah menunjukkan hasil paling signifikan dalam merangsang pertumbuhan tunas. Hal ini terlihat dari kemunculan 7 dan tunas pada ulangan 1 sampel A dan 6 tunas pada ulangan 2 sampel A dan ulangan 3 sampel A, menjadikannya perlakuan dengan rata-rata tunas terbanyak dibandingkan perlakuan lain. Bawang merah mengandung senyawa auksin dan sitokinin alami yang bekerja efektif dalam merangsang pembelahan sel dan inisiasi tunas pada jaringan muda stevia.



Gambar 15. Ulangan 1



Gambar 16. Ulangan 2



Gambar 17. Ulangan 3



Gambar 18. Ulangan 4

Sementara itu, perlakuan dengan Benzyl Amino Purine (BAP) juga menunjukkan hasil yang cukup baik, dengan pertumbuhan tertinggi sebesar 9 tunas pada ulangan pertama dan 5 tunas pada ulangan kedua. Efektivitas BAP diduga berasal dari konsentrasi dan jenis ZPT yang sesuai, yang bekerja secara langsung dalam memicu inisiasi tunas. Namun, efeknya tidak sekuat ekstrak bawang merah, diduga karena BAP tidak mengandung senyawa pendukung alami lain seperti antioksidan atau senyawa organik minor yang juga mendukung regenerasi [34].

Tabel 2. Hasil pengamatan dengan perlakuan ZPT sintetis 7 hari setelah tanam

Perlakuan	Ulangan	Sampel	Panjang Sampel	Jumlah Tunas
Media sederhana dengan BAP	1	A	16,5 cm	6
		B	11,4 cm	4
	2	A	16,5 cm	3
		B	11 cm	2
	3	A	14,6 cm	1
		B	15,7 cm	2
	4	A	18 cm	3
		B	13,6 cm	0

Perlakuan dengan penambahan BAP masih menunjukkan hasil yang cukup baik. Jumlah tunas yang muncul mencapai 6 tunas pada perlakuan ulangan 1 sampel A yang menandakan bahwa ZPT sintetis tetap efektif untuk inisiasi tunas meskipun tidak sekuat respon pada ekstrak bawang merah. Efektivitas ini bergantung pada konsentrasi dan kombinasi antara auksin dan sitokinin dalam BAP.



Gambar 19. Ulangan 1



Gambar 20. Ulangan 2



Gambar 21. Ulangan 3



Gambar 22. Ulangan 4

Pada perlakuan dengan ekstrak kecambah kacang hijau, hasil pertumbuhan tunas tergolong paling rendah, yaitu 6 tunas pada ulangan ke-1 dan 5 tunas pada ulangan ke-4, dan tidak menunjukkan pertumbuhan pada ulangan ke-2. Hal ini diduga karena variasi kandungan ZPT dalam ekstrak kecambah lebih fluktuatif tergantung umur dan kondisi kecambah saat diekstrak. Selain itu, kadar auksin dan sitokinin dalam ekstrak ini diduga belum seimbang secara optimal untuk mendorong pertumbuhan tunas, atau bisa jadi terjadi degradasi senyawa aktif jika proses ekstraksi tidak dilakukan dengan tepat [35]. Ketidakteraturan ini membuat perlakuan ekstrak kecambah kurang konsisten dalam merangsang pertumbuhan tunas.

Tabel 3. Hasil pengamatan perlakuan dengan ekstrak kecambah kacang hijau 7 hari setelah tanam

Perlakuan	Ulangan	Sampel	Panjang Sampel	Jumlah Tunas
Media sederhana dengan ekstrak kecambah	1	A	17,3 cm	3
		B	11,1 cm	3
	2	A	13 cm	0
		B	13,2 cm	0
	3	A	18,1 cm	0
		B	15,4 cm	2
	4	A	18,7 cm	5
		B	14,5 cm	1

Sementara itu, perlakuan dengan penambahan ekstrak kecambah kacang hijau menunjukkan hasil yang kontras. Hanya ada 1 perlakuan yang hasilnya cukup baik dengan munculnya 5 tunas pada perlakuan ulangan 4 sampel A namun beberapa ulangan menunjukkan tidak adanya pertumbuhan tunas (nilai 0). Hal ini dapat disebabkan oleh kadar hormon alami dalam kecambah kacang hijau yang tidak stabil atau lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak bawang merah.

Faktor panjang eksplan dan jumlah ruas batang juga sangat memengaruhi jumlah tunas yang muncul. Eksplan dengan ruas lebih banyak memberikan potensi meristematik yang lebih besar [36] karena setiap ruas mengandung tunas aksiler yang siap tumbuh bila dirangsang ZPT. Namun demikian, tidak selalu eksplan yang panjang menghasilkan lebih banyak tunas, karena keberhasilan pertumbuhan juga ditentukan oleh kualitas jaringan eksplan (misalnya jaringan tua atau terlalu muda), kandungan fenolik yang tinggi yang bisa menghambat pertumbuhan, serta berpotensi kerusakan jaringan saat proses sterilisasi. Dengan demikian, keberhasilan penumbuhan tunas tidak hanya ditentukan oleh jenis ZPT atau ekstrak alami yang digunakan, namun juga sangat dipengaruhi oleh faktor fisiologis eksplan, kondisi lingkungan kultur, dan interaksi antara hormon dan jaringan. Kombinasi media rendah nutrisi seperti 0 MS dengan ZPT alami terbukti menjadi pendekatan yang menjanjikan dalam kultur jaringan *Stevia* yang lebih murah dan efektif.

D. Penyebab Kontaminasi

Kontaminasi merupakan salah satu kendala utama dalam teknik kultur jaringan yang dapat menggagalkan keseluruhan proses. Pada percobaan pertama, kontaminasi diperkirakan disebabkan oleh beberapa faktor. Pertama, kondisi suhu inkubasi yang tidak stabil dapat memicu pertumbuhan mikroorganisme, terutama jika terlalu hangat atau tidak sesuai dengan standar suhu kultur jaringan (sekitar 18–25°C). Kedua, lingkungan kerja yang kurang steril, seperti ruang tanam yang tidak tertutup rapat atau laminar airflow yang tidak dibersihkan dengan optimal, berpotensi masuknya spora dan mikroba dari udara. Ketiga, kontaminasi saat penanaman terjadi karena eksplan belum benar-benar bersih dari mikroba endofit atau karena alat tanam tidak disterilkan sempurna. Selain itu, dugaan lain berasal dari media yang telah tercemar sebelum autoklaf, seperti botol atau gelas ukur yang kurang bersih sebelum pembuatan media [37].

Pada percobaan kedua, meskipun media ditambahkan arang aktif untuk mengatasi browning, justru muncul kontaminasi baru. Diduga penyebabnya adalah arang aktif yang tidak disterilisasi secara menyeluruh sebelum dicampurkan ke dalam media, karena arang bersifat porous dan mudah membawa mikroba jika tidak diautoklaf dengan baik. Faktor kedua adalah karat pada tutup botol, yang muncul karena media panas terciprat ke bagian logam saat penuangan, menciptakan kondisi ideal bagi mikroorganisme tumbuh. Selanjutnya, kontaminasi saat proses penanaman meskipun dilakukan di laminar airflow, bisa saja terjadi jika UV lamp tidak cukup lama dinyalakan [38], atau tangan/operator menyentuh area steril secara tidak sengaja. Selain itu, eksplan yang digunakan membawa kontaminasi dari jaringan dalam (endofit) yang tidak dapat dibasmi hanya dengan sterilisasi permukaan.

Sementara itu, pada percobaan ketiga tidak ditemukan kontaminasi sama sekali, bahkan pada media yang dibiarkan tanpa penutup. Hal ini menunjukkan bahwa semua tahap telah dilakukan secara optimal. Diduga keberhasilan ini disebabkan oleh media yang lebih ringan, yang tidak menyediakan nutrisi berlebih bagi mikroorganisme, sehingga menurunkan risiko pertumbuhan kontaminan. Selain itu, lingkungan kerja dan alat yang digunakan sangat steril, serta teknik penanaman dilakukan dengan hati-hati dan aseptik. Penyesuaian suhu ruangan menjadi 18°C [39], serta pemilihan eksplan yang lebih sehat dan bersih juga mendukung keberhasilan ini. Kombinasi dari semua faktor tersebut menjadikan percobaan ketiga sebagai bukti penting bahwa keberhasilan kultur jaringan sangat bergantung pada konsistensi teknik, kebersihan, dan kontrol lingkungan yang ketat.

E. Kontaminan

Selama proses budidaya kultur jaringan *Stevia*, ditemukan beberapa jenis kontaminan dengan karakteristik berbeda dalam setiap percobaan. Pada percobaan pertama, ditemukan dua jenis kontaminan utama. Kontaminan pertama berupa cairan bening yang berbau mirip fermentasi nira, diduga besar disebabkan oleh kontaminasi bakteri asam laktat, seperti *Lactobacillus* sp. Bakteri ini biasanya tumbuh di lingkungan yang kaya akan gula atau senyawa organik, dan menghasilkan aroma yang mirip dengan tape atau nira. Kehadiran bakteri ini bisa menunjukkan bahwa eksplan atau media terkontaminasi oleh mikroorganisme fermentatif dari lingkungan sekitar atau dari jaringan tanaman itu sendiri. Kontaminan kedua pada percobaan pertama berupa gumpalan putih yang halus seperti bulu kapas, yang sangat khas dan menunjukkan adanya jamur dari genus *Penicillium* atau *Trichoderma*. Jamur ini sering muncul dalam kultur jaringan bila terjadi kebocoran aseptik atau ada bagian alat/media yang lembap [40]. Jamur ini berkembang dengan cepat dan menyebar melalui spora udara, sehingga sangat mudah mengkontaminasi kultur jika kebersihan laminar flow, alat tanam, atau eksplan tidak optimal.

Pada percobaan kedua, ditemukan kontaminasi yang lebih beragam. Pertama, terdapat cairan berwarna kekuningan dengan bau asam tajam, yang sangat mengarah pada infeksi bakteri gram negatif seperti *Pseudomonas* sp. atau *Enterobacter* sp.. Bakteri jenis ini tumbuh cepat dalam media kaya nutrisi dan dapat menyebabkan eksplan membusuk dengan cepat, serta memicu perubahan warna dan bau pada media. Kedua, muncul kontaminasi berupa gumpalan bulu putih dan hitam, yang menunjukkan kombinasi jamur dari genus *Aspergillus* dan *Rhizopus* [40]. Warna gelap dan tekstur berbulu tebal merupakan ciri khas jamur yang tumbuh agresif di permukaan media dengan kelembaban tinggi atau akibat kerusakan wadah seperti tutup yang tidak rapat [41]. Selain kontaminasi mikroorganisme, pada percobaan kedua juga ditemukan kontaminasi berupa karat pada tutup jar, yang bersifat non-biologis namun tetap merusak kultur. Karat tersebut diduga berasal dari cipratan media panas yang mengenai bagian logam tutup jar, menyebabkan oksidasi. Karat ini bukan hanya menjadi sumber cemaran logam berat yang toksik bagi tanaman, tetapi juga dapat menjadi tempat tumbuhnya mikroorganisme tertentu. Karat juga dapat merusak segel steril wadah, sehingga mempermudah masuknya kontaminan dari udara luar [42].

Secara keseluruhan, berbagai jenis kontaminasi ini menunjukkan bahwa keberhasilan kultur jaringan sangat tergantung pada pengendalian ketat terhadap kebersihan, kelembaban, suhu, dan perlakuan media serta eksplan. Setiap jenis kontaminan memberikan dampak berbeda terhadap eksplan dan memerlukan pendekatan pencegahan yang spesifik agar tidak mengganggu proses regenerasi tanaman.

IV. SIMPULAN

Dari hasil semua percobaan, bisa disimpulkan bahwa media sederhana yang terdiri dari air, agar-agar, Gandasil B, dan ZPT alami seperti ekstrak bawang merah serta kecambah mampu membantu pertumbuhan awal eksplan *Stevia* secara efektif, terutama ketika proses kehitaman berhasil dikurangi. Dari semua bahan tersebut, ekstrak bawang merah terbukti paling baik dalam memicu pertumbuhan tunas, menunjukkan bahwa ZPT alami memiliki potensi besar sebagai alternatif yang ramah lingkungan dan lebih ekonomis dibandingkan ZPT sintetis. Selain itu, penggunaan media "0 MS" pada tahap awal ternyata mampu menciptakan lingkungan yang stabil dan bebas dari kontaminasi.

Namun, untuk mencapai hasil kultur jaringan yang optimal, perlu diperhatikan beberapa faktor penting, seperti pengendalian senyawa fenolik dengan arang aktif, sterilisasi alat dan bahan yang menyeluruh, serta teknik penanaman yang tepat. Kombinasi pendekatan ilmiah dan teknis ini sangat penting untuk menghindari kegagalan kultur akibat kontaminasi atau stres fisiologis tanaman. Oleh karena itu, penelitian lanjutan dapat difokuskan pada optimalisasi konsentrasi ZPT alami dan penggunaan agen anti-browning, agar regenerasi eksplan *Stevia* dapat berlanjut hingga fase multiplikasi dan aklimatisasi.

REFERENSI

- [1] M. Abror, S. Arifin, A. Eviyanti, P. S. Agroteknologi, and Sains, "Analisa Anti Oksidan dan Vitamin C pada Sayuran dan Rempah-Rempah," *J. Farm. Galen.*, vol. 7, no. 2, pp. 1–10, 2020.
- [2] J. Ahmad, I. Khan, R. Blundell, J. I. Azzopardi, and F. Mahomoodally, "Stevia rebaudiana B.: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 100, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2020.04.030.
- [3] V. Peteliuk *et al.*, "Review article : Natural Sweetner Stevia Rebaudiana : Functionalities , Health Benefits and Potential Risks," pp. 1412–1430, 2021.
- [4] D. Putra, M. Bimantio, A. Ferhat, and N. Nugraha, "Stevia rebaudiana bertoni M. dalam kondisi stres: Studi kasus lingkungan," vol. 1, pp. 1–6, Sep. 2021, doi: 10.54387/jpp.v1i1.6.
- [5] J. Borgo, L. C. Laurella, F. Martini, and C. A. N. Catal, "Stevia Genus : Phytochemistry and Biological Activities Update," pp. 1–45, 2021.
- [6] A. D. Khuluq, E. Widaryanto, Ariffin, and E. Nihayati, "Adaptive strategy of Stevia rebaudiana to environmental change in tropical climate based on anatomy and physiology characteristics," *Biodiversitas*, vol. 23, no. 11, pp. 5710–5717, 2022, doi: 10.13057/biodiv/d231122.
- [7] S. Sharma, S. Gupta, D. Kumari, S. L. Kothari, R. Jain, and S. Kachhwaha, "Exploring Plant Tissue Culture and Steviol Glycosides Production in Stevia rebaudiana (Bert .) Bertoni : A Review," pp. 1–30, 2023.
- [8] R. Rosmaina, R. Endika, and Z. Zulfahmi, "STUDI PENGARUH MEDIA ALTERNATIF UNTUK PERBANYAKAN PISANG BARANGAN (Musa acuminata L.) SECARA IN-VITRO," *J. Agroteknologi*, vol. 12, no. 1, p. 33, 2021, doi: 10.24014/ja.v12i1.12425.
- [9] E. Mutryarny, P. S. Agroteknologi, F. Pertanian, and U. L. Kuning, "Effectiveness of Plant Growth Regulators From Shallot," vol. 13, no. April, pp. 33–39, 2022.
- [10] A. Paelongan, K. Malau, and L. Semahu, "Pengaruh Ekstrak Bawang Merah (Allium cepa L.) sebagai Zat Pengatur Tumbuh pada Benih Kakao (Theobroma cacao L.)," *J. Agro Ind. Perkeb.*, pp. 185–196, Nov. 2023, doi: 10.25181/jaip.v11i3.3013.
- [11] M. Nathan, M. Jayadi, and H. Thamrin, "Efektivitas Pupuk Organik Cair Bawang Merah dan Limbah Bawang Merah Terhadap Perubahan Sifat Kimia Tanah dan Pertumbuhan Bawang Merah," *J. Ecosolum*, vol. 12, no. 1, pp. 114–127, 2023, doi: 10.20956/ecosolum.v12i1.26545.
- [12] L. Mochoyaroh *et al.*, "Pengaruh Ekstrak Rendaman Limbah Kulit Bawang Merah Sebagai Pupuk Organik Cair Terhadap Pertumbuhan Tanaman Cabai Rawit," Nov. 2022.
- [13] S. Marlina and M. Syamsiah, "RESPON PERTUMBUHAN STEK TANAMAN MURBEI (Morus alba L .) TERHADAP ZPT ALAMI EKSTRAK TAUGE DAN EKSTRAK BAWANG MERAH GROWTH RESPONSE OF MULBERRY (Morus alba L .) CUTTINGS TO NATURAL ZPT EXTRACT OF SPROUTS AND SHALLOTS," vol. 6, no. 1, pp. 50–64, 2024.
- [14] D. Suherni, Y. C. Ginting, and A. Karyanto, "Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Bawang Merah dan Tomat pada Pertumbuhan Seedling Manggis (Garcinia mangostana L .) The Effect of Shallot and Tomato Extract Concentrations on the Growth of," vol. 12, no. 1, pp. 42–50, 2021.
- [15] K. Abha Manohar, G. Shukla, B. Roy, and S. Chakravarty, "Effects of plant growth regulators and growing media on propagation and field establishment of Stevia rebaudiana: a medicinal plant of commerce," *CABI Agric. Biosci.*, vol. 3, no. 1, 2022, doi: 10.1186/s43170-021-00072-5.
- [16] S. L. Asmono and N. Sjamsijah, "Inisiasi Akar Secara In Vitro pada Stevia (Stevia rebaudiana B) dengan Modifikasi Media Murashige and Skoog (MS) dan Beberapa Tipe Auksin . In Vitro Root Initiation in Stevia (Stevia rebaudiana B .) With Modified Murashige and Skoog (MS)," pp. 51–54.
- [17] Z. Gharari, K. Bagheri, G. Karimkhanloo, and A. Sharafi, "Study of tissue culture and in vitro organogenesis of Scutellaria bornmuelleri using benzylaminopurine, Isopentenyl adenine and thidiazuron," *South African J. Bot.*, vol. 139, pp. 458–469, 2021, doi: 10.1016/j.sajb.2021.03.030.
- [18] H. Poltak, "Pendekatan Metode Studi Kasus dalam Riset Kualitatif Hendrik," *J. Local Archit. Civ. Eng.*, vol. 2, no. 2, pp. 50–58, 2024, doi: 10.59810/localengineering.
- [19] N. S. Roslan and A. S. Halim, "Enablers and barriers to online learning among medical students during COVID-19 pandemic: An explanatory mixed-method study," *Sustain.*, vol. 13, no. 11, 2021, doi: 10.3390/su13116086.
- [20] S. Wulandari, Y. S. Nisa, T. Taryono, S. Indarti, and R. S. Sayekti, "Sterilisasi Peralatan dan Media Kultur Jaringan," *Agrotechnology Innov.*, vol. 4, no. 2, p. 16, 2022, doi: 10.22146/a.77010.
- [21] G. Amente and E. Chimdessa, "Control of browning in plant tissue culture: A review," *J. Sci. Agric.*, vol. 5, pp. 67–71, 2021, doi: 10.25081/jsa.2021.v5.7266.
- [22] I. Sivanesan, M. Muthu, J. Gopal, S. Tasneem, D. H. Kim, and J. W. Oh, "A fumigation-based surface sterilization approach for plant tissue culture," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 18, no. 5, pp. 1–12,

- 2021, doi: 10.3390/ijerph18052282.
- [23] E. Science, "The effect of murashige and skoog (MS) modified medium and several types of auxins on the growth of stevia (*Stevia rebaudiana* B.) in vitro The effect of murashige and skoog (MS) modified medium and several types of auxins on the growth of stevi," 2017, doi: 10.1088/1755-1315/672/1/012001.
- [24] S. Plant *et al.*, "Pengembangan Metode Teknik Sterilisasi Eksplan Guna Meningkatkan Keberhasilan Kultur Jaringan Tanaman Stevia (*Stevia Rebaudiana* B.) Development of Explant Sterilization Technique Methods to Improve the Success of Tissue Teknik Kultur Jaringan merup," vol. 2, no. 2, pp. 60–67, 2023.
- [25] B. DHARANI, S. A, and S. SEBASTIAN, "Understanding the Benefits of *Stevia Rebaudiana* Bertoni for Diabetes: a Comprehensive Review," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 16, no. 11, pp. 12–16, 2024, doi: 10.22159/ijpps.2024v16i11.52382.
- [26] S. A. Nugroho, L. Naju, A. Arozi, and I. L. Novenda, "JURNAL BIOSENSE Vol . 06 No . 1 , Juni 2023 ISSN : 2622 - 6286 PENGARUH MEDIA TANAM DAN ZPT NABATI (AIR KELAPA DAN BAWANG MERAH) TERHADAP PERTUMBUHAN SETEK VANILI (*Vanilla planifolia* Andrews) ISSN : 2622 - 6286 Masyarakat mengalami pergeseran perilaku," vol. 06, no. 1, pp. 83–97, 2023.
- [27] S. M. Telaumbanua, "PENGARUH KONSENTRASI AIR KELAPA DAN DOSIS ARANG AKTIF TERHADAP PERTUMBUHAN PLANLET ANGGREK *Dendrobium* sp DENGAN MEDIA VW SECARA IN VITRO," *J. Sapta Agrica*, vol. 1, no. 1, pp. 26–33, 2022, doi: 10.57094/agrotek.v1i1.384.
- [28] E. Maulia, W. Rahmatika, and M. Maulana, "Dampak Media Subkultur dan Variasi Subkultur untuk Pertumbuhan Tunas pada Kultur Jaringan Pisang (*Musa spp.*) Serta Penerapan Penanaman Bibit Dengan Pemberian Agen Hayati," *J. Agro-Livestock*, vol. 3, no. 1, pp. 145–153, 2025, [Online]. Available: <https://jurnal.ypkpasid.org/index.php/jal>
- [29] W. Smulek, M. Rojewska, A. Pacholak, O. Machrowicz, and K. Prochaska, "Co-interaction of nitrofurantoin and saponins surfactants with biomembrane leads to an increase in antibiotic ' s antibacterial activity," *J. Mol. Liq.*, vol. 364, p. 120070, 2022, doi: 10.1016/j.molliq.2022.120070.
- [30] S. Weiskirchen, S. K. Schröder, E. M. Buhl, and R. Weiskirchen, "A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems," *Cells*, vol. 12, no. 5, 2023, doi: 10.3390/cells12050682.
- [31] N. Permadi, M. Nurzaman, A. N. Alhasnawi, F. Doni, and E. Julacha, "Managing Lethal Browning and Microbial Contamination in *Musa* spp. Tissue Culture: Synthesis and Perspectives," *Horticulturae*, vol. 9, no. 4, pp. 1–16, 2023, doi: 10.3390/horticulturae9040453.
- [32] J. C. I. R. ANDUNG, "PENGARUH NAA DAN DOSIS PUPUK GANDASIL D TERHADAP PERTUMBUHAN BIBIT PISANG CAVENDISH HASIL KULTUR JARINGAN PADA FASE PEMBESARAN," p. 9, 2022.
- [33] S. Kamal, E. Agustina, and K. sari, "Efektivitas Pemberian ZPT Bawang Merah (*Allium cepa* L.) terhadap Subkultur Tanaman Pisang Barangan (*Musa acuminata* L.) secara In Vitro Effectiveness of Giving Red Onion (*Allium Cepa* L.) PGR to Banana (*Musa Acuminata* L.) Subculture In Vitro," vol. 12, no. 1, pp. 45–56, 2025, doi: 10.33059/jj.v12i1.11461.
- [34] S. Hidayati, E. A. M. Zuhud, I. K. Adiyaksa, and P. Al Manar, "REVIEW: BUDIDAYA DAN PEMANENAN PASAK BUMI (*Eurycoma longifolia* Jack)," *J. Tumbuh. Obat Indones.*, vol. 15, no. 1, pp. 16–26, 2022, doi: 10.22435/jtoi.v15i1.3860.
- [35] J. A. Z. Zahra, E. R. Sasmita, and A. Wijayani, "SUBKULTUR ANGGREK BULAN (*Phalaenopsis* sp.) PADA MEDIA MS DENGAN PENAMBAHAN THIAMIN DAN EKSTRAK TAUGE," *Agro Wiralodra*, vol. 6, no. 2, pp. 34–39, 2023, doi: 10.31943/agrowiralodra.v6i2.89.
- [36] P. Samantaray and A. Nayak, "Lilium : A High-Value Cut Flower Production Guide for Lucrative Return," vol. 30, no. 6, pp. 67–86, 2024, doi: 10.9734/JSRR/2024/v30i62022.
- [37] A. B. S. Putri, H. Hajrah, D. Armita, and I. R. Tambunan, "Teknik kultur jaringan untuk perbanyakan dan konservasi tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) secara in vitro," *Filogeni J. Mhs. Biol.*, vol. 1, no. 2, pp. 69–76, 2021, doi: 10.24252/filogeni.v1i2.23801.
- [38] R. I. Jabal Rahmat Ashar, A. Farhanah, Pratiwi Hamzah and M. Sumiyati Tuhuteru, Ramal Yusuf, Reina Yulianti, *Pengantar KULTUR JARINGAN TANAMAN*. 2022.
- [39] D. Andriani and P. Heriansyah, "Identifikasi Jamur Kontaminan pada Berbagai Eksplan Kultur Jaringan Anggrek Alam (*Bromheadia finlaysonian* (Lind.) Miq," *Agro Bali Agric. J.*, vol. 4, no. 2, pp. 192–199, 2021, doi: 10.37637/ab.v4i2.723.
- [40] E. Wulandari, "Identifikasi bakteri kontaminan pada kultur jaringan bambu jenis fargesia scabrida," *Integr. Lab J.*, vol. 10, no. 02, pp. 99–107, 2022.
- [41] A. I. Sucahyo, K. Manalu, and R. A. Nasution, "Isolasi dan Identifikasi Mikroba Penyebab Kontaminasi dari Udara di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan UIN-SU Medan," *J. Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–12, 2023, doi: 10.47134/biology.v1i1.1931.

- [42] Y. K. Mareng, P. S. Biologi, F. Bioteknologi, U. Kristen, and D. Wacana, “Akumulasi dan Toleransi Tembaga (Cu) pada Kultur Kalus *Talinum paniculatum* (Jacq .) Gaertn .,” 2024.

Conflict of Interest Statement:

The author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.