



Seminar Biologi Kebangsaan 2025

<https://semarakilmu.my/index.php/spnes/index>
ISSN: 3083 - 8193



Protokol Pensterilan Optimum *Thuidium cymbifolium* dan *Thuidium pristocalyx* var. *samoanum*: Lumut berkualiti tinggi *Optimal Sterilization Protocol for Thuidium cymbifolium and Thuidium pristocalyx* var. *samoanum*: High quality moss

Athirah Amirah¹, Che Radziah Che Mohd Zain¹, Nurashikin Kemat², Nik Norhazrina^{1,3,♥}

¹ Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor

² Jabatan Teknologi Pertanian, Fakulti Pertanian, Universiti Putra Malaysia, 43400 Serdang, Selangor

³ Herbarium UKMB, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor

ABSTRACT

Lumut memainkan peranan ekologi kritikal dalam penyerapan air, pengurangan hakisan tanah dan pengawalan banjir serta berfungsi sebagai bioindikator sensitif terhadap perubahan kualiti udara dan air di persekitaran. Namun, permintaan pasaran yang meningkat dalam industri hortikultur terutamanya dalam penghasilan terarium, berpotensi mengancam kelestarian spesies ini memandangkan kadar pertumbuhan semula yang perlahan di habitat asal. Kultur *in vitro* muncul sebagai strategi efektif bagi pemeliharaan biodiversiti di samping membolehkan pengeluaran lumut pada skala yang besar dalam tempoh singkat tanpa eksploitasi berlebihan sumber semula jadi. Kajian ini memberi tumpuan kepada pengoptimuman protokol pensterilan permukaan eksplan bagi *Thuidium cymbifolium* (Dozy & Molk.) Dozy & Molk. dan *Thuidium pristocalyx* var. *samoanum* (Mitt.) Touw memandangkan kontaminasi merupakan faktor penghalang utama yang sering terjadi dalam kejayaan kultur *in vitro*. Hasil menunjukkan bahawa protokol optimum bagi *T. cymbifolium* adalah menggunakan 80% etanol (EtOH) selama 30 saat diikuti 5% sodium hipoklorit (NaOCl) selama 80 saat, manakala bagi *T. pristocalyx* var. *samoanum* adalah menggunakan 80% EtOH selama 30 saat diikuti 5% NaOCl selama 120 saat. Kedua-dua protokol pensterilan ini berjaya menghasilkan 100% kultur bersih tanpa kontaminasi selepas 30 hari pengkulturan. Penemuan ini membuktikan bahawa protokol pensterilan yang berbeza diperlukan antara spesies, berkemungkinan disebabkan oleh fungsi lumut sebagai mikrohabitat kepada pelbagai invertebrata yang mana meningkatkan risiko kontaminasi. Selain itu, protokol sterilisasi yang optimum ini juga digunakan dalam pengaruhan pucuk dan akar eksplan, seterusnya membuka peluang kepada pembiakan berskala besar. Secara keseluruhan, hasil kajian ini menyumbang kepada pemuliharaan ex-situ serta menawarkan asas saintifik yang kukuh untuk menyokong komersialisasi lestari Thuidiaceae tanpa menjejaskan populasi liar.

Mosses play critical ecological roles in water absorption, soil erosion reduction and flood control and function as sensitive bioindicators of changes in air and water quality in the environment. However, the increasing market demand in the horticultural industry, especially in terrarium production, has the potential to threaten the sustainability of this species given the slow rate of regeneration in its native habitat. In vitro culture has emerged as an effective strategy for biodiversity conservation while enabling large-scale production of mosses in a short period of time without overexploitation of natural resources. This study focused on optimizing the surface sterilization protocol of explants for Thuidium cymbifolium (Dozy & Molk.) Dozy & Molk. and Thuidium pristocalyx var. samoanum (Mitt.) Touw since contamination is a major barrier to successful in vitro culture. The results showed that the optimal protocol for T. cymbifolium was using 80% ethanol (EtOH) for 30 seconds followed by 5% sodium hypochlorite (NaOCl) for 80 seconds, while for T. pristocalyx var. samoanum was using 80% EtOH for 30 seconds followed by 5% NaOCl for 120 seconds. Both sterilization protocols successfully produced 100% clean cultures without contamination after 30 days of culture. This finding demonstrates that different sterilization protocols are required between species, possibly due to the function of mosses as microhabitats for various invertebrates which increases the risk of contamination. In addition, this optimal sterilization protocol was

♥ Corresponding author.

E-mail address: riena@ukm.edu.my

also used in the induction of shoot and root explants, thus opening the opportunity for large-scale propagation. Overall, the results of this study contribute to ex-situ conservation and offer a solid scientific basis to support sustainable commercialization of Thuidiaceae without affecting wild populations.

Keywords: Bryophyta; konservasi ex-situ; hortikultur Lestari; Bryophyta; ex-situ conservation; sustainable horticulture

1. Pengenalan

Thuidiaceae merupakan famili lumut daripada divisi Bryophyta yang memainkan peranan penting dalam mengekalkan keseimbangan ekosistem. Selain nilai ekologi, spesies dalam famili ini, terutamanya *Thuidium cymbifolium* (Dozy & Molk.) Dozy & Molk. mempunyai nilai ekonomi dan perubatan yang signifikan [1-2]. Penggunaan *T. cymbifolium* dalam perubatan tradisional di China dipercayai berupaya menyejukkan badan, mengeluarkan toksin dan membantu pertumbuhan semula tisu kulit untuk merawat luka melecur [3-4]. Daripada segi komersial, lumut ini sering digunakan sebagai komponen utama dalam terarium disebabkan sifat pertumbuhan secara pleurokarpa yang membentuk karpet merimbun, sesuai untuk penghasilan rumah hijau mini yang menawan. Permintaan yang tinggi dibuktikan dengan harganya yang boleh mencecah sehingga RM 303.56 bagi sepuluh kaki persegi. Stok lumut hiasan di Malaysia juga dilaporkan sering habis terjual dalam tempoh seminggu. Hal ini menunjukkan potensi besar bagi pengkomersialan spesies Thuidiaceae melalui pendekatan bioteknologi tumbuhan.

Pengkulturan *in vitro* menawarkan kaedah yang efektif untuk memenuhi permintaan pasaran tanpa menjejaskan populasi liar [5]. Namun, kontaminasi merupakan halangan yang besar dalam pelaksanaan teknik ini [6-7] yang berpotensi berasal daripada dua sumber utama: i) sampel eksplan memandangkan fungsi lumut sebagai mikrohabitat di hutan; dan ii) persekitaran makmal, termasuklah pendedahan kepada mikroorganisma bawaan udara semasa pengendalian atau penggunaan peralatan dan medium pengkulturan yang tidak disteril sepenuhnya [8].

Oleh itu, pembangunan protokol pensterilan yang optimum dan spesifik bagi setiap spesies adalah sangat penting bagi memastikan kejayaan kultur *in vitro* [9]. Kajian ini dijalankan untuk menentukan protokol pengoptimuman proses pensterilan permukaan eksplan bagi *Thuidium cymbifolium* dan *Thuidium pristocalyx* var. *samoanum*. Pengoptimuman pensterilan perlulah ditentukan secara eksperimen serta merujuk kepada kajian terdahulu, bagi mendapatkan gabungan yang tepat antara jenis bahan pensteril, kepekatan dan tempoh dedahan yang sesuai untuk setiap spesies dan jenis eksplan. Gabungan antara bahan pensteril sering dilakukan untuk mendapatkan hasil pensterilan yang lebih efektif supaya dapat meningkatkan kadar penghasilan kultur bersih yang bebas daripada mikroorganisma endofitik yang terdapat pada eksplan [10]. Protokol pensterilan yang berkesan ini merupakan syarat yang kritikal bagi kejayaan untuk fasa yang seterusnya, termasuklah bagi pengaruh pucuk dan akar. Secara keseluruhan, kajian ini menyumbang ke arah pemuliharaan ex-situ Thuidiaceae dengan menyediakan asas saintifik untuk komersialisasi yang mampan, sekali gus melindungi populasi spesies ini di habitat asalnya.

2. Bahan dan Kaedah

Kaedah yang digunakan merupakan pengubahsuaian daripada kajian lepas Liang *et al.* [11] dan Pereira *et al.* [12] yang disesuaikan dengan ketersediaan bahan dan keadaan makmal di samping ketiadaan rujukan khusus mengenai pengkulturan lumut Thuidiaceae yang telah dijalankan sama ada di dalam atau di luar Malaysia. Eksperimen dan penelitian dijalankan di Makmal Agrobioteknologi, Universiti Putra Malaysia (UPM).

2.1 Media Pengkulturan

Medium Knop digunakan untuk pengkulturan *in vitro* Thuidiaceae. Medium bagi setiap rawatan mengandungi 7.5 g/L sukrosa dan 3.9 g/L gelrite dan diselaraskan kepada pH 5.8 sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 minit.

2.2 Pensampelan

Sampel bagi spesies *T. cymbifolium* dan *T. pristocalyx* var. *samoanum* telah dikutip di hutan simpan Semenanjung Malaysia (Bukit Fraser) berdasarkan rekod spesimen yang terdapat di Herbarium Universiti Kebangsaan Malaysia (UKMB). Lumut yang dijumpai dipisahkan daripada substrat dengan menggunakan tangan memandangkan Thuidiaceae hidup secara pleurokarpa, yang mana tumbuh menjalar membentuk tikar yang padat dan mudah diambil. Sampel yang telah dipisahkan kemudiannya dimasukkan ke dalam plastik zip kedap udara dan maklumat penting seperti tarikh, habitat, altitud, tahap dedahan sampel terhadap cahaya dicatat pada plastik zip kedap udara tersebut. Sekembalinya dari lokasi pensampelan, sampel segera disimpan di dalam peti pada suhu 4°C. Penyimpanan sejuk ini adalah untuk mengekalkan kesegaran sampel sebelum ia digunakan dalam proses pengkulturan *in vitro* Thuidiaceae.

2.3 Pensterilan Permukaan Eksplan

Pra-pensterilan eksplan dilakukan untuk meningkatkan keberkesanan pensterilan dan mengurangkan risiko kontaminasi. Proses ini dimulakan dengan pemilihan eksplan daripada sampel yang telah dikutip. Kajian ini menggunakan gametofit (batang) untuk dijadikan eksplan kerana sporofit sukar diperolehi semasa aktiviti pensampelan. Eksplan daripada batang berwarna hijau muda dipilih dan dibasuh melalui penggoncangan vorteks menggunakan air suling steril. Proses pembasuhan ini diulangi sebanyak tiga kali atau sehingga semua bendasing seperti batu dan tanah berjaya disingkirkan.

Jadual 1

Rekabentuk rawatan bagi pengoptimuman pensterilan eksplan *T. cymbifolium* dan *T. pristocalyx* var. *samoanum* menggunakan kombinasi EtOH dan NaOCl

Rawatan	Tempoh Rendaman 80% EtOH (saat)	Tempoh Rendaman 5% NaOCl (saat)
1	15	40
2	15	80
3	15	120
4	30	40
5	30	80
6	30	120
7	45	40
8	45	80
9	45	120

Proses pensterilan permukaan seterusnya dilakukan di dalam kabinet laminar mengikut teknik aseptik. Penyediaan eksplan dilakukan terlebih dahulu dengan membuang dahan pada batang dengan menggunakan forsep bermata tajam dan halus, serta memotong bahagian batang sepanjang 0.5-1.0 cm. Seterusnya, eksplan disterilkan secara berurutan dengan merendamkannya di dalam 80% etanol (EtOH), diikuti 5% sodium hipoklorit (NaOCl) pada tempoh masa yang tertentu (Jadual 1).

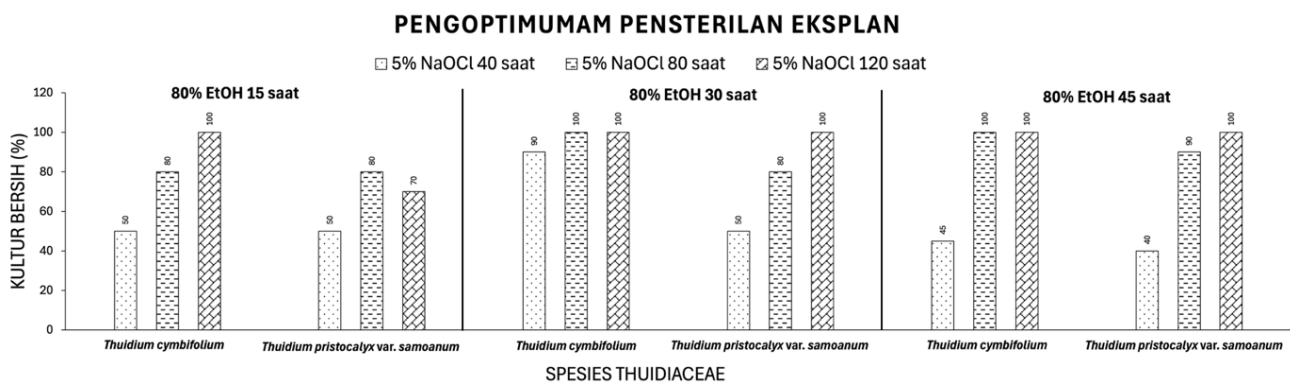
Selepas proses rendaman, eksplan dibilas sebanyak tiga kali menggunakan air suling steril, dikeringkan di atas kertas turas yang steril sebelum pengkulturan pada medium Knop dilakukan.

2.4 Pengkulturan In Vitro

Eksplan yang telah disteril dikultur pada piring petri yang mengandungi 20 mL medium Knop. Piring petri kemudiannya dibalut dengan parafilm dan diletakkan di bilik pengkulturan pada keadaan suhu 23°C dengan 16 jam cahaya / 8 jam gelap ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Philips TL33). Pemerhatian dilakukan selama sebulan untuk mencapai 100% kultur bersih tanpa kontaminasi.

3. Hasil & Perbincangan

Rajah 1 menunjukkan hasil yang diperoleh bagi pengoptimuman protokol pensterilan yang telah dilakukan. Terdapat tiga protokol yang berjaya menghasilkan 100% kultur bersih bagi *T. cymbifolium* iaitu: i) 80% EtOH selama 15 saat, diikuti 5% NaOCl selama 120 saat, ii) 80% EtOH selama 30 saat, diikuti 5% NaOCl selama 80 saat, dan iii) 80% EtOH selama 30 saat, diikuti 5% NaOCl selama 120 saat. Bagi *T. pristocalyx var. samoanum* 100% kultur bersih selepas 30 hari pengkulturan direkodkan hanya pada protokol menggunakan 80% EtOH selama 30 saat, diikuti 5% NaOCl selama 120 saat.



Rajah 1. Peratusan kejayaan penghasilan kultur bersih bagi *T. cymbifolium* dan *T. pristocalyx var. samoanum* selepas 30 hari pengkulturan

Protokol pensterilan optimum yang dipilih bagi *T. cymbifolium* adalah menggunakan 80% EtOH selama 30 saat, diikuti 5% NaOCl selama 80 saat. Protokol ini dipilih disebabkan oleh tempoh rendaman eksplan terhadap NaOCl adalah pada kadar yang minimum berbanding protokol lain yang menghasilkan 100% kultur bersih tanpa kontaminasi. Hal ini demikian kerana NaOCl merupakan satu agen pengoksidaan kuat yang terurai membentuk asid hipoklorus (HOCl) dan ion hipoklorit (OCl^-) yang mampu menembusi secara terus struktur sel tumbuhan dan mampu memecahkan dinding sel mikroorganisma yang menyebabkan kontaminasi melalui denaturasi protein dan oksidasi lipid membran. Manakala, EtOH adalah sebatian ampifilik yang bertindak melalui mekanisme penembusan secara perlahan-lahan ke dalam sel tumbuhan tetapi keberkesanannya adalah terhad dalam menyingkirkan mikroorganisma, mahupun untuk menembusi lapisan sel yang berprotein tinggi [10]. Namun, peranan EtOH adalah penting dalam melarutkan lapisan lilin dan memudahkan penembusan NaOCl ke permukaan tisu tumbuhan. Kesan negatif terhadap pertumbuhan tisu tumbuhan juga lebih ketara apabila NaOCl digunakan pada kepekatan yang tinggi pada masa dedahan yang lama [13].

Kombinasi EtOH dan NaOCl adalah bersifat sinergistik kerana interaksi kedua-duanya dapat menghasilkan keberkesanan pensterilan yang lebih baik berbanding penggunaan bahan pensteril

secara bersendirian [10]. Kajian Liang *et al.* [11] pada *Bryum argenteum* mendapati bahawa kadar kemandirian eksplan (gametofit) mencapai 70% apabila menggunakan rawatan kombinasi 70% EtOH selama 5 saat, diikuti 5% NaOCl selama 30 saat. Sebaliknya, penggunaan NaOCl secara tunggal pada pelbagai kadar kepekatan dan masa, hanya menghasilkan 100% kultur yang mempunyai pertumbuhan kulat (kontaminasi). Hasil kajian juga menunjukkan bahawa penggunaan NaOCl pada kepekatan tinggi bagi masa rendaman singkat adalah lebih efektif berbanding kepekatan rendah dengan masa rendaman yang panjang. Perkara ini dibuktikan apabila penggunaan 5% NaOCl selama 30 saat menghasilkan kadar kemandirian kultur eksplan sebanyak 70%, berbanding menggunakan 0.1% NaOCl selama 90 saat yang hanya menghasilkan kadar kemandirian kultur eksplan sebanyak 10%, walaupun kedua-dua rawatan tersebut menggunakan kombinasi 70% EtOH sebelum rendaman menggunakan NaOCl dilakukan. Kajian Pereira *et al.* [12] juga menunjukkan bahawa kombinasi 70% EtOH selama 5 saat, diikuti 2% NaOCl selama 120 saat berjaya menghasilkan peratus pertumbuhan pada kultur eksplan yang tertinggi (7.7%), berbanding menggunakan 1% NaOCl selama 5 minit (3.6%) dan 10 minit (2.4%) pada lima spesies lumut iaitu *Bryum densifolium*, *Isopterygium tenerifolium*, *Leucobryum crispum*, *Pogonatum pensilvanicum* dan *Vitalia cuspidifera*.

Proses sterilasi menggunakan 80% EtOH selama 30 saat, diikuti 5% NaOCl selama 120 saat pula menjadi protokol sterilasi yang optimum bagi *T. pristocalyx* var. *samoanum* memandangkan hanya protokol tersebut sahaja menunjukkan 100% kultur bersih selepas 30 hari pengkulturan pada tempoh rendaman NaOCl yang minimum. Hasil daripada kaedah pensterilan ini juga menunjukkan bahawa spesies yang berbeza memerlukan pengoptimuman proses sterilasi yang berbeza. Proses sterilasi yang berkesan berupaya untuk menyingkirkan kesemua mikroorganisma endofitik dan eksofitik [14], di samping mengekalkan viabiliti eksplan [10]. Tambahan pula, fungsi lumut sebagai habitat kepada pelbagai invertebrata [15] menjadikannya lebih terdedah kepada bahan kontaminasi amat memerlukan protokol yang khusus bagi setiap spesies bagi memastikan kejayaan dalam pengkulturan secara *in vitro*. Protokol pensterilan eksplan yang optimum bagi *T. cymbifolium* dan *T. pristocalyx* var. *samoanum* kemudiannya digunakan untuk mengaruh pertumbuhan pucuk dan akar bagi eksplan menggunakan pengawal atur tumbuhan (PGR) secara bersendirian dan kombinasi, seterusnya melakukan pembiakan berskala besar untuk memenuhi permintaan komersial tanpa mengganggu populasi di habitat asal.

4. Kesimpulan

Protokol pensterilan yang optimum bagi *T. cymbifolium* dan *T. pristocalyx* var. *samoanum* telah berjaya dikenal pasti menggunakan kombinasi 80% EtOH dan 5% NaOCl pada tempoh rendaman yang spesifik. Penemuan ini menjadi asas pembentukan sistem kultur tisu lumut untuk konservasi dan pengeluaran bioindustri negara.

Penghargaan

Penulis ingin merakamkan penghargaan kepada Kementerian Pengajian Tinggi (KPT) atas Skim Geran Penyelidikan Fundamental (FRGS/1/2023/WAB11/UKM/02/1) bagi menjayakan projek penyelidikan ini. Terima kasih juga diucapkan kepada Universiti Kebangsaan Malaysia dan Universiti Putra Malaysia.

Rujukan

- [1] Dollery, Rebecca, Mike H. Bowie, and Nicholas M. Dickinson. "The Ecological Importance of Moss Ground Cover in Dry Shrubland Restoration Within an Irrigated Agricultural Landscape Matrix." *Ecology and Evolution* 12, no. 4 (2022): e8843. <https://doi.org/10.1002/ece3.8843>.

- [2] Rowntree, J.K. and Ramsay, M.M. (2005). "Ex Situ Conservation of Bryophytes: Progress and Potential of A Pilot Project." *Boletín de la Sociedad Española de Briología* 27(26): 17–22.
- [3] Dziwak, Michał, Katarzyna Wróblewska, Antoni Szumny, and Renata Galek. "Modern Use of Bryophytes as A Source of Secondary Metabolites." *Agronomy* 12, no. 6 (2022):1456. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061456>
- [4] Harris, E.S.J. (2008). Ethnobryology: Traditional Uses and Folk Classification of Bryophytes. *Bryologist* 111(2): 169–217. [https://doi.org/10.1639/0007-2745\(2008\)111\[169:ETUAFJ\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1639/0007-2745(2008)111[169:ETUAFJ]2.0.CO;2)
- [5] Oseni, Ojo Michael, Veena Pande, and Tanpan Kumar Nailwal. "A Review on Plant Tissue Culture, a Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species." *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7, no. 7 (2018): 3778–86. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.438>.
- [6] Li, W., Cao, G., Zhu, M., Zhang, Y., Zhou, R., Zhao, Z., Guo, Y., Yang, W., Zheng, B., Tan, J. and Sun, Y. (2022). Isolation, Identification and Pollution Prevention of Bacteria and Fungi during The Tissue Culture of Dwarf Hygro (*Hygrophila polysperma*) Explants. *Microorganisms* 10, no. 12(2022): 2476. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122476>
- [7] Sivanesan, I., Muthu, M., Gopal, J., Tasneem, S., Kim, D.H. and Oh, J.W. "A Fumigation-Based Surface Sterilization Approach for Plant Tissue Culture." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, no. 5(2021): 2282. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052282>
- [8] Leifert, C., and A. C. Cassells. "Microbial Hazards in Plant Tissue and Cell Cultures." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37, no. 2 (March 1, 2001): 133–38. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0025-y>.
- [9] Al Ghasheem, N., Stanica, F., Peticilă, A.G., Cosmina, O. and Venat, A. "In Vitro Effect of Various Sterilization Techniques on Peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) Explants." *Horticulture* 62 (2018): 227–234.
- [10] Sahu, V., Rawat, K.K., Srivastava, A. and Asthana, A.K. "In Vitro Propagation of Saprophytic Moss *Splachnum sphaericum* Hedw." *International Journal of Plant and Environment* 3, no. 02(2017): 47–50. <https://doi.org/10.18811/ijpen.v3i02.10436>
- [11] Liang, S.-F., Sun, Y. and Zhu, R.-L. (2010). *In Vitro* Micropropagation of *Bryum argenteum* Hedw. *Cryptogamie Bryologie* 31(3): 233–239.
- [12] Pereira, C.G., Carvalho-silva, M., Alfredo, L., Pereira, R., Eneida, C., Silveira, S., Even, S. and As, K. (2021). "Indirect Establishment Increases the Chances of *In Vitro* Propagation of Mosses Occurring in the Cerrado - A New Method." *Rodriguésia* 72: e00302019. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202172024>
- [13] Yildiz, Mustafa, S. Fatih Ozcan, Cansu T. Kahramanogullari, and Ege Tuna. "The Effect of Sodium Hypochlorite Solutions on the Viability and in Vitro Regeneration Capacity of the Tissue." *The Natural Products Journal* 2, no. 4 (2012): 328–31. <https://doi.org/10.2174/2210315511202040328>.
- [14] Eliwa, G.I., El-Dengawy, E.R.F., Gawish, M.S. and Yamany, M.M. "Comprehensive Study on *In Vitro* Propagation of Some Imported Peach Rootstocks: *In Vitro* Explant Surface Sterilization and Bud Proliferation." *Scientific Reports* 14, no. 1(2024): 5586. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55685-3>
- [15] Makinde, A.M., Isa, M.O. and Ayisire, B.E. "Studies of Sterilization Protocol Development and Calli Induction of Selected Tropical Mosses." *Journal of Tropical Biology & Conservation (JTBC)* 11 (2014): 33–40. <https://doi.org/10.51200/jtbc.v11i.260>