

## Optimasi prosedur sterilisasi permukaan eksplan stek mikro karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg)

*Optimization of surface sterilization procedure on Hevea brasiliensis Muell. Arg microcutting explant*

Irfan MARTIANSYAH<sup>\*</sup>), Deden Dewantara ERIS, NURHAIMI-HARIS  
& Darmono TANIWIRYONO

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1 Bogor 16128, Indonesia

Diterima tanggal 4 Januari 2013/disetujui tanggal 14 Maret 2013

### Abstract

*An increasing number of explants is necessary to obtain plantlets in large quantities, for mass propagation of rubber plants. However, high level of contamination at the primary culture stage is still a major constraint in in vitro microcutting of rubber. The aim of this study was to optimize surface sterilization procedures to reduce micro-bial contamination at the primary culture. Sterilization experiment was conducted in two steps. The first step was to determine the effect of washing the explants with running water prior to sterilization and then using Deso-germe, ethanol or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while the second step was to identify the suitable sterilization process on reducing the level of contamination. The results showed that the surface sterilization with only one type of sterilization agent could not reduce contamination level caused either by bacteria or fungi, while sterilization with three types of sterilizing agents increased the number of dead explants. The best treatment for surface sterilization was the direct sterilization of explants using 70% ethanol for one minute and 17.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 minutes without washing with tap water (A-CD treatment). The percentage of viable and sterile explants of this treatment was 76.7%, which was significantly higher than those of other treatments. This treatment reduced contamination level to 21.7%.*

[Keywords: Contamination, primary culture, rootstock, micropropagation, clonal propagation]

### Abstrak

Peningkatan jumlah eksplan sangat diperlukan untuk memperoleh planlet dalam jumlah besar pada perbanyakan massal tanaman karet secara *in vitro*. Namun, tingginya tingkat kontaminasi pada tahap kultur primer masih merupakan kendala utama dalam kultur stek mikro tanaman karet. Tujuan penelitian adalah mengoptimasi prosedur sterilisasi permukaan eksplan untuk mengurangi jumlah eksplan yang terkontaminasi mikroba pada tahap kultur primer. Percobaan sterilisasi dilaksanakan dalam dua tahap, tahap pertama untuk mengetahui pengaruh pencucian eksplan dengan air mengalir pada awal sterilisasi serta penggunaan Desogerme, etanol dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sedangkan tahap kedua untuk mendapatkan proses sterilisasi yang paling sesuai dalam menurunkan tingkat kontaminasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan sterilisasi permukaan yang menggunakan satu jenis bahan sterilan tidak dapat mengurangi kontaminasi, baik oleh bakteri maupun cendawan. Perlakuan sterilisasi eksplan dengan tiga jenis bahan sterilan meningkatkan kematian eksplan. Perlakuan sterilisasi permukaan terbaik adalah sterilisasi langsung

eksplan menggunakan etanol 70% selama satu menit dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 17,6% selama 20 menit, tanpa pencucian dengan air mengalir (perlakuan A-CD). Persentase eksplan steril yang hidup sebesar 76,7%, berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Perlakuan tersebut dapat mengurangi kontaminasi menjadi sebesar 21,7%.

[Kata kunci: Kontaminasi, kultur primer, batang bawah, mikropropagasi, perbanyakan klonal]

### Pendahuluan

Beberapa tahun belakangan ini, perbanyakan klonal batang bawah tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) melalui teknik stek mikro (*in vitro microcutting*) dilakukan secara rutin di Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI). Pengadaan batang bawah tanaman karet secara klonal sangat diperlukan karena batang bawah yang selama ini digunakan berasal dari biji, sehingga ketersediaannya dibatasi oleh musim dan viabilitas biji. Di samping itu, meskipun digunakan klon batang atas yang sama, tanaman karet dengan batang bawah asal biji menunjukkan variasi morfologi dan produksi yang cukup tinggi antar tanaman. Hal ini berdampak pada produksi dalam suatu luasan areal tertentu.

Stek mikro yang digunakan untuk perbanyakan klonal batang bawah karet, merupakan hasil mikropropagasi aseptik dengan menggunakan potongan batang muda yang memiliki mata tunas aksiler sebagai eksplan (Nurhaimi Haris *et al.*, 2009). Teknik ini telah digunakan untuk menghasilkan planlet karet di laboratorium hingga menjadi bibit tanaman untuk batang bawah, setelah melalui tahapan aklimatisasi. Namun, perbanyakannya dalam skala besar masih menghadapi beberapa kendala, antara lain adalah tingginya tingkat kontaminasi eksplan, terutama pada tahap awal eksplan dikulturkan. Kontaminasi dapat terjadi karena kurang tepatnya sterilisasi permukaan eksplan dan adanya bakteri endogen dalam jaringan eksplan terutama bagian akar (Colgecen *et al.*, 2011).

Eksplan yang terkontaminasi tidak dapat diperthankan karena kultur akan dipenuhi oleh kontaminan, terutama apabila kontaminan tersebut adalah fungi. Kontaminan berupa bakteri, meskipun pertumbuhannya lebih lambat dapat memproduksi metabolit yang toksik terhadap eksplan, memodifikasi Ph media sehingga eksplan mengalami nekrosis dan

<sup>\*</sup>) Penulis korespondensi: imartiansyah6311@yahoo.com

menghambat penyerapan nutrisi oleh eksplan (Singh *et al.*, 2011). Kontaminan akan menghambat pertumbuhan eksplan dan menyebabkan kehilangan eksplan yang jumlahnya bisa sangat besar sehingga memperlambat proses perbanyakan serta meningkatkan biaya produksi kultur jaringan skala komersial (Marino *et al.*, 2009).

Kontaminasi oleh mikroorganisme dapat dicegah dengan mengoptimalkan proses sterilisasi permukaan eksplan. Sterilisasi dapat dilakukan menggunakan lebih dari satu bahan sterilan seperti NaOCl dan etanol 70% (Odutayo *et al.*, 2007), NaOCl dan HgCl<sub>2</sub> (Badoni & Chauhan, 2010), NaOCl, HgCl<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Srivastava *et al.*, 2010). Di samping itu penggunaan *Nano-Silver Particles* untuk menghilangkan kontaminasi telah dilaporkan pada kultur jaringan tanaman *olive* (Rostami & Shamsavar, 2009). Pada kultur *in vitro* tanaman karet, bahan sterilan yang biasa digunakan antara lain tween 20 (surfaktan) dan etanol 70% (Dickson *et al.*, 2011), serta etanol 70% dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Carron *et al.*, 2005). Proses sterilisasi permukaan eksplan karet pada teknik stek mikro cukup panjang, yang diawali dengan pencucian eksplan dengan air mengalir. Namun, proses pencucian tersebut diduga dapat menyebarkan mikroorganisme yang terdapat di permukaan jaringan tanaman, sehingga meningkatkan risiko kontaminasi. Pengamatan yang dilakukan dalam beberapa periode waktu menunjukkan bahwa tingkat kontaminasi pada tahap awal kultur (*primary culture*) cukup tinggi antara 10 – 50%, tergantung musim (Nurhaimi-Haris *et al.*, 2009). Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi prosedur sterilisasi permukaan eksplan karet yang akan digunakan pada kultur stek mikro sehingga tingkat kontaminasi dapat dikurangi.

## Bahan dan Metode

### Sumber eksplan

Bahan tanam yang digunakan sebagai eksplan adalah batang karet muda pada tahap pertumbuhan dua payung daun yang berasal dari biji yang telah terseleksi dan dipelihara di rumah kaca. Sehari sebelum diambil, batang karet diolesi dengan dithane 0,5% yang berfungsi sebagai fungisida. Pengambilan eksplan dilakukan dengan memotong batang muda sekitar 10–15 cm dari pertautan okulasi, kemudian dibawa ke laboratorium untuk proses sterilisasi.

### Prosedur standar sterilisasi permukaan eksplan

Batang karet yang akan digunakan sebagai eksplan dicuci dengan air mengalir hingga bersih, kemudian dicuci dengan larutan Desogerm 0,5% (v/v) yang merupakan larutan bakterisida dan fungisida dengan bahan aktif *quaternary alkyl chloride* dan garam *polyiminobiguanidide*. Selanjutnya eksplan direndam selama lebih kurang satu menit dalam larutan etanol 70% (v/v), lalu direndam dalam larutan

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrogen peroksida) 17,6% (v/v) selama 20 menit. Setelah itu eksplan dibilas menggunakan aquades steril hingga seluruh eksplan bersih dari larutan sterilan.

### Optimasi sterilisasi permukaan eksplan

Pada tahap awal dilakukan pengujian sterilisasi menggunakan 13 perlakuan, seperti yang terdapat pada Tabel 1. Selanjutnya dipilih tujuh cara yang memberikan hasil paling baik untuk melakukan optimasi proses sterilisasi tersebut. Sebagai kontrol digunakan proses sterilisasi standar seperti diuraikan di atas.

### Parameter yang diamati dan analisis data

Parameter yang diamati adalah jumlah eksplan steril yang hidup, eksplan mati, eksplan terkontaminasi bakteri dan eksplan terkontaminasi cendawan. Pengamatan dilakukan mulai minggu pertama sejak eksplan dikulturkan sampai minggu ke enam. Analisis data dilakukan dengan menggunakan ANOVA (SPSS 11.0), dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf uji  $\alpha = 5\%$ .

## Hasil dan Pembahasan

Pengujian tingkat kontaminasi eksplan karet dengan berbagai perlakuan sterilisasi dilakukan untuk memilih beberapa perlakuan sterilisasi yang akan dioptimasi. Hasil pengamatan berupa kontaminasi eksplan oleh bakteri dan cendawan pada beberapa perlakuan sterilisasi sampai pada pengamatan minggu ke-6 disampaikan pada Tabel 2. Pada minggu ke-1, rerata kontaminasi bakteri untuk semua perlakuan sebesar 19,6%, kemudian meningkat menjadi 37,7% pada minggu ke-3 dan menjadi 39,6% pada akhir pengamatan. Sama halnya dengan kontaminasi bakteri, kontaminasi yang disebabkan cendawan mengalami peningkatan pada minggu ke-3 dari 9,1% menjadi 24,9%. Dari hasil ini diketahui bahwa peningkatan kontaminasi yang signifikan terjadi selama minggu ke-2 dan minggu ke-3 baik kontaminasi oleh bakteri ataupun cendawan (Tabel 2). Kontaminasi pada kultur *in vitro* biasanya terjadi pada awal penanaman eksplan ke dalam media. Pada tahap ini eksplan yang berasal dari luar (lingkungan tidak steril) dibawa ke dalam lingkungan laboratorium sehingga kemungkinan eksplan terkontaminasi sangat besar. Menurut Akin-Idowu *et al.* (2009), kontaminasi pada kultur jaringan terjadi pada awal inisiasi eksplan yang terkait dengan tempat dan waktu pengambilan eksplan. Kontaminasi mikroba terutama bakteri menjadi masalah utama pada kultur jaringan tanaman (Marino *et al.*, 2009). Kontaminasi bakteri seringkali sulit dideteksi pada awal kultur karena berada di dalam jaringan tanaman. Beberapa tanaman yang terkontaminasi tidak menunjukkan gejala penghambatan tumbuh, tetapi terlihat dari laju multiplikasi yang berkurang dan

banyaknya planlet yang mati (Sharifkhani *et al.*, 2011). Selain bakteri, Omamor *et al.* (2007) melaporkan bahwa di daerah yang beriklim tropis kontaminasi cendawan sangat sering terjadi dan mengakibatkan kerugian besar pada kultur jaringan. Keberadaan mikroba pada media kultur biasanya meningkatkan kematian eksplan sehingga eksplan menguning, serta menghambat pertumbuhan tunas dan perakaran (Singh *et al.*, 2011).

Kontaminasi bakteri yang sangat berat terdapat pada perlakuan A+C sebesar 62,5%, A-C sebesar 75 %, A+BC sebesar 65 % dan A-BC sebesar 66,3%,

sedangkan tingkat kontaminasi bakteri yang paling ringan (12,5%) terdapat pada perlakuan A-CD yang menggunakan dua bahan sterilan etanol 70% dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanpa dicuci air mengalir. Tingkat kontaminasi cendawan yang sangat berat terdapat pada perlakuan A+B dan A-B, masing-masing 58,8% dan 67,5%. Pada perlakuan tersebut, bahan sterilan yang digunakan hanya Desogerme. Nampak bahwa sterilisasi yang menggunakan alkohol 70% saja, dan yang digabung dengan perlakuan Desogerme, baik eksplan dicuci maupun tidak dicuci terlebih dahulu dengan air mengalir tidak cukup efektif untuk mengatasi

Tabel 1. Perlakuan sterilisasi eksplan karet

Table 1. Treatments of sterilization on rubber explants

Perlakuan sterilisasi <i>Treatment of sterilization</i>	Keterangan (Note)
A+BCD* (Kontrol/control)	A+ : Dicuci dengan air mengalir/ <i>Washed with running water</i>
A+B	A- : Tidak dicuci / <i>Unwashed</i>
A+C	B : Dicuci dengan Desogerme 0,5% / <i>Washed with 0.5% Desogerme</i>
A+D*	C : Direndam satu menit dengan etanol 70% / <i>Soaked in 70% ethanol for one minute</i>
A+BC	D : Direndam 20 menit dengan H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 17,6% / <i>Soaked in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 17.6% for 20 minutes</i>
A+BD*	Pada tahap akhir proses sterilisasi seluruh eksplan dicuci dengan akuades steril ( <i>At the end of sterilization process, all explants were washed with sterile aquadest</i> )
A+CD*	
A-BCD*	
A-B	
A-C	*Perlakuan untuk optimasi tahap lanjut masing-masing menggunakan 20 eksplan, dan diulang sebanyak empat kali ( <i>Treatment for advanced stage of optimization each used 20 explants for four times and repeated</i> ).
A-D*	
A-BC	
A-BD*	
A-CD*	

Tabel 2. Persentase eksplan karet yang terkontaminasi bakteri dan cendawan pada berbagai perlakuan sterilisasi.

Table 2. Percentage of rubber explants contaminated by bacteria and fungi on various sterilization treatments.

Perlakuan sterilisasi <i>Treatments of sterilization</i>	Persentase eksplan terkontaminasi ( <i>Percentage of contaminated explants</i> )					
	Minggu ke-1 <i>First week</i>		Minggu ke-3 <i>Third week</i>		Minggu ke-6 <i>Sixth week</i>	
	Bakteri <i>Bacteria</i>	Cendawan <i>Fungi</i>	Bakteri <i>Bacteria</i>	Cendawan <i>Fungi</i>	Bakteri <i>Bacteria</i>	Cendawan <i>Fungi</i>
A <sup>+</sup> BCD (Kontrol/control)	17,5	3,8	32,5	7,5	32,5	10,0
A+B	23,8	33,8	40,0	57,5	41,3	58,8
A+C	40,0	0	62,5	6,3	62,5	8,8
A+D	3,8	6,3	26,3	33,8	32,5	35,0
A+BC	36,3	3,8	63,8	12,5	65,0	12,5
A+BD	5,0	7,5	21,3	27,5	21,3	31,3
A+CD	16,3	1,3	38,8	12,5	42,5	15,0
A-BCD	7,5	2,5	22,5	10,0	23,8	11,3
A-B	20,0	41,3	32,5	66,3	32,5	67,5
A-C	53,8	2,5	73,8	10,0	75,0	10,0
A-D	15,0	12,5	26,3	52,5	28,8	53,8
A-BC	27,5	3,8	63,8	11,3	66,3	11,3
A-BD	2,5	7,5	12,5	33,8	17,5	37,5
A-CD	5,0	1,3	11,3	7,5	12,5	13,8
Rerata ( <i>Average</i> )	19,6	9,1	37,7	24,9	39,6	26,9

kontaminasi. Perlakuan sterilisasi dengan satu bahan sterilan saja diketahui tidak dapat menghilangkan mikroba sumber kontaminan pada permukaan eksplan, bahkan pada perlakuan A+B dan A-B eksplan terkontaminasi bakteri dan cendawan hingga 100% (Gambar 1). Menurut Traore *et al.* (2005), jenis dan jumlah bahan sterilan pada proses kultur jaringan mempengaruhi tingkat kontaminasi, misalnya kultur tanaman pinus di Amerika Utara memerlukan lima jenis bahan sterilan. Prosedur sterilisasi permukaan dengan menggabungkan etanol dengan NaOCl, atau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> terbukti dapat mengurangi kontaminasi pada beberapa jenis tanaman (Oyebanji *et al.*, 2009). Kontaminasi dapat diminimalkan apabila dilakukan dua tahap sterilisasi atau digunakan dua jenis bahan sterilan (Benazir *et al.*, 2013).

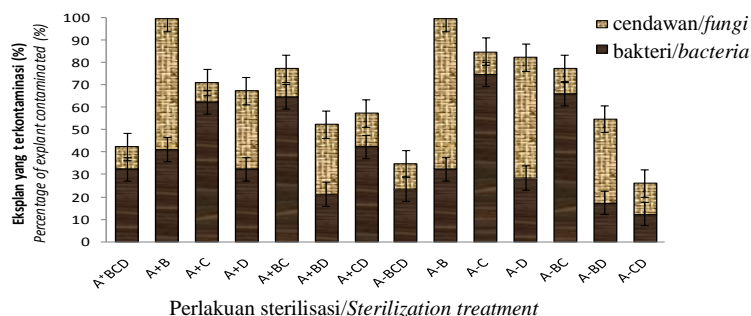
Apabila digabungkan secara total, baik kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri ataupun cendawan, tingkat kontaminasi terendah terdapat pada eksplan karet yang tidak dicuci dengan air mengalir, namun langsung direndam sesaat dengan etanol 70% dan disterilisasi menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gambar 1A-CD). Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang digunakan untuk sterilisasi permukaan eksplan biasanya berkisar 3-20% tergantung pada jenis bahan tanaman yang digunakan. Hidrogen peroksida dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan cendawan dengan cara menghidrolisis sel atau menggumpalkan protein yang terdapat pada protoplasma. Protein yang telah menggumpal kehilangan fungsinya sehingga bakteri dan cendawan mengalami kematian. Dibandingkan dengan bahan kimia lainnya, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> merupakan bahan yang ramah lingkungan karena mudah terurai menjadi air dan oksigen (Srivastava *et al.*, 2010).

Perlakuan A-CD dapat menekan kontaminasi secara signifikan yaitu sebesar 26,3%, jauh lebih rendah dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan lainnya (Tabel 3). Eksplan yang mati sebesar 12,4%, lebih tinggi dari perlakuan yang hanya menggunakan satu bahan sterilan, tetapi masih lebih rendah dari kontrol. Persentase eksplan steril yang hidup pada

perlakuan A-CD sebesar 61,3% berbeda nyata dengan perlakuan-perlakuan lainnya. Eksplan steril yang hidup tersebut lalu diperbanyak dengan proses subkultur setiap empat minggu dengan laju multiplikasi sebesar 1,6 kali yang berasal dari bagian pucuk tunas dan ruas batang (Gambar 2).

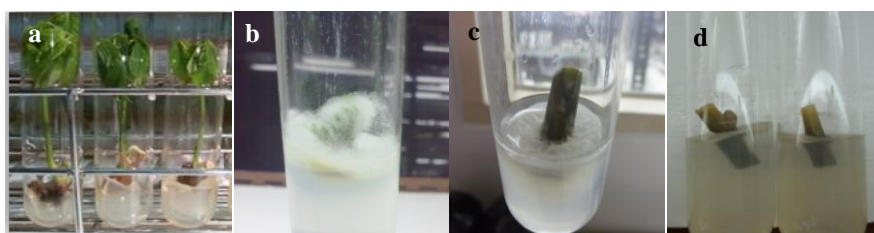
Pada tahap selanjutnya optimasi sterilisasi permukaan eksplan dilaksanakan dengan mengurangi beberapa perlakuan yang terlihat kurang efektif mengatasi kontaminasi pada percobaan sebelumnya (Tabel 4). Berdasarkan perlakuan terbaik A-CD, diketahui bahwa penggunaan sterilan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diperlukan untuk mencapai hasil sterilisasi terbaik sehingga pada percobaan tahap lanjutan, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> digunakan dalam seluruh perlakuan sterilisasi tersebut. Secara keseluruhan terlihat bahwa pencucian eksplan dengan air mengalir sebelum proses sterilisasi dilaksanakan menghasilkan tingkat kontaminasi yang lebih tinggi, terutama kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri. Sterilisasi menggunakan Desogermine ternyata tidak membantu menurunkan tingkat kontaminasi pada kultur stek mikro tanaman karet. Selain itu, Desogermine tidak tersedia di Indonesia sehingga biaya penyediaan desinfektan ini tergolong mahal dan sulit didapatkan. Oleh karena itu, penggunaan Desogermine dapat dihilangkan dalam proses sterilisasi seperti yang selama ini dilakukan.

Hasil terbaik tetap diperoleh dari perlakuan A-CD dengan persentase eksplan sehat mencapai 76,7% dan tingkat kontaminasi rendah sebesar 21,7% (Tabel 4). Dengan penurunan tingkat kontaminasi eksplan hingga di bawah 30%, maka terbuka peluang untuk melangkah ke tahap produksi massal batang bawah karet secara klonal karena selama ini kontaminasi merupakan salah satu faktor pembatas utama perbanyakannya massal bahan tanam karet tersebut (Nurhaimi-Haris *et al.*, 2009). Di samping itu dengan menghilangkan beberapa tahap dalam proses sterilisasi, seperti pencucian eksplan dengan air dan Desogermine, maka efisiensi dalam hal penggunaan waktu dan bahan akan meningkat.



Gambar 1. Pengaruh perlakuan sterilisasi permukaan eksplan terhadap persentase eksplan yang terkontaminasi oleh bakteri atau cendawan pada enam minggu setelah dikultur. (A+: dicuci dengan air mengalir, A-: tidak dicuci, B: dicuci dengan Desogermine 0,5%, C: direndam satu menit dengan etanol 70%, D: direndam 20 menit dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 17,6%)

Figure 1. Effect of surface sterilization treatment on the percentage of explants contaminated by bacteria and fungi at six weeks after cultured. (A+: washed with running water, A-: unwashing B: washed with 0.5% Desogermine, C: soaked in 70% ethanol for one minute, soaked in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 17.6% for 20 minutes)



Gambar 2. Kondisi eksplan pada akhir minggu ke-6 pengamatan a) eksplan steril yang hidup b) eksplan terkontaminasi cendawan c) eksplan terkontaminasi bakteri d) eksplan mati (mencoklat).

Figure 2. Condition of explants at the end of sixth week a) viable and aseptic explants b) explants contaminated by fungi c) explants contaminated by bacteria d) dead explant (browning)

Tabel 3. Kondisi eksplan karet pada akhir minggu ke-enam.

Table 3. Condition of rubber explants at the end of sixth week.

Perlakuan sterilisasi <i>Sterilization treatments</i>	Kondisi akhir eksplan ( <i>Final condition of explants</i> ) (%)		
	Eksplan steril yang hidup <i>Viable sterile explants</i>	Eksplan mati <i>Dead explants</i>	Total eksplan terkontaminasi <i>Total contaminated explants</i>
A <sup>+</sup> BCD (Kontrol/control)	32,5 bc	25,0 a	42,5 gh
A+B	0,0 f	0,0 e	100,0 a
A+C	18,8 cde	10,0 bcd	71,3 bcd
A+D	26,3 cd	6,2 bcde	67,5 cde
A+BC	18,8 cde	3,7 cde	77,5 bc
A+BD	41,3 b	6,2 bcde	52,5 fg
A+CD	28,8 bcd	13,7 b	57,5 def
A-BCD	32,5 bc	32,5 a	35,0 hi
A-B	0,0 f	0,0 e	100,0 a
A-C	11,3 ef	3,7 cde	85,0 b
A-D	17,5 de	0,0 e	82,5 b
A-BC	20,0 cde	2,5 de	77,5 bc
A-BD	42,5 b	2,5 de	55,0 efg
A-CD	61,3 a	12,4 bc	26,3 i

\* Angka-angka dalam kolom yang sama yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%.

\* *The numbers in the same column followed by the same letters are not significantly different at 5% level according to Duncan test.*

Tabel 4. Kondisi eksplan karet pada perlakuan sterilisasi terseleksi.

Table 4. Conditions of rubber explants on selected-sterilization treatments.

Perlakuan sterilisasi <i>Sterilization treatments</i>	Kondisi akhir eksplan ( <i>Final condition of explants</i> ) (%)		
	Eksplan steril yang hidup <i>Viable sterile explants</i>	Eksplan mati <i>Dead explants</i>	Total eksplan terkontaminasi <i>Total contaminated explants</i>
A <sup>-</sup> CD	76,7 a	1,6 a	21,7 a
A <sup>-</sup> BCD	46,7 b	3,3 a	50,0 b
A <sup>-</sup> BD	36,7 b	1,6 a	61,7 b
A <sup>-</sup> D	36,7 b	0,0 a	63,3 b
A <sup>+</sup> BD	18,3 c	0,0 a	81,7 c
A <sup>+</sup> D	16,7 c	0,0 a	83,3 c
A <sup>+</sup> BCD (Kontrol/control)	6,7 c	5,0 a	88,3 c
A <sup>+</sup> CD	3,3 c	1,7 a	95,0 c

\*) Angka-angka dalam kolom yang sama yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%. (*The numbers in the same column followed by the same letters are not significantly different at 5% level according to Duncan test.*)

## Kesimpulan

Optimasi perlakuan pada proses sterilisasi permukaan yang dilakukan pada penelitian ini mampu mengurangi kontaminasi pada tahap kultur primer stek mikro tanaman karet. Perlakuan yang menggunakan satu jenis bahan sterilan tidak dapat mengurangi kontaminasi, baik oleh bakteri ataupun cendawan, sedangkan perlakuan dengan tiga jenis bahan sterilan meningkatkan kematian eksplan sehingga dapat disimpulkan perlakuan dengan dua jenis bahan sterilan merupakan perlakuan terbaik. Eksplan yang tidak dicuci dengan air mengalir, tetapi langsung disterilisasi menggunakan etanol 70% selama satu menit dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 17,6% selama 20 menit (A-CD) merupakan perlakuan terbaik dengan persentase eksplan hidup sebesar 76,7%, yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Perlakuan A-CD dapat menurunkan kontaminasi dari 88,3% pada kontrol menjadi sebesar 21,7%.

## Daftar Pustaka

- Akin-Idowu PE, DO Ibitoye & OT Ademoyegun (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African J Biotech* 8 (16), 372-378.
- Badoni A & JS Chauhan (2010). *In vitro* sterilization protocol for micropropagation of *Solanum tuberosum* cv Kufri Himalini. *Acad Arena* 2 (4), 24-27.
- Benazir JF, R Suganthi, P Chandrika & B Mathithumila (2013). *In vitro* regeneration and transformation studies on *Pelargonium grave-olens* (geranium) - an important medicinal and aromatic plant. *J Medicine Plant Res* 7(38), 2815-2822.
- Carron MP, L Lardet & P Montoro (2005). Hevea micro-cutting. *Technical Notes on The Process*. CIRAD.
- Colgecen H, U Koca & G Toker (2011). Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turk J Biol* 35, 513-520.
- Dickson I, A Okere, J Elizabeth, O Mary, F Olatunde & S Abiodun (2011). In-vitro culture of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) embryo. *J Plant Breed Crop Sci* 3(9), 185-189.
- Marino G, F Gaggia, F Saiano, B Biavati & B Marangoni (2009). Elimination of *in vitro* bacterial contaminants in shoot cultures of MRS 2/5 plum hybrid by the use of *Melia azadarach* extracts. *Eur J Plant Pathol* 123, 195-205.
- Nurhaimi-Haris, Sumaryono & MP Carron (2009). Pengaruh bahan pra sterilan, tutup tabung kultur, dan musim terhadap tingkat kontaminasi eksplan pada kultur *microcutting* karet. *Menara Perkebunan* 77(2), 84-93.
- Odutayo OI, NA Amusa, OO Okutade & YR Ogunsanwo (2007). Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in Southwestern Nigeria. *African J Agric Res* 2 (3), 67-72.
- Omamor IB, AO Asemota, CR Eke & EI Eziashi (2007). Fungal contamination of the oil palm tissue culture in Nigerian Institute for Oil Palm Research (NIFOR). *African J Agric Res* 2(10), 534-537.
- Oyebanji OB, O Nweke, O Odeunmi, NB Galadima MS Idris, UN Nnodi, AS Afolabi & GH Ogbadu (2009). Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African J Biotech* 8 (20), 5395-5399.
- Rostami AA & A Shahsavar (2009). Nano-silver particles eliminate the *in vitro* contaminations of Olive 'mission' explants. *Asian J of Plant Sci* 8(7), 505-509.
- Sharifkhani A, HM Saud & MBA Aziz (2011). An alternative safer sterilization method for explants of *Aloe vera barbadensis* Mill. In: 2<sup>nd</sup> International Conf on Chemical Engineering and Applications IPCBEE 23, 32-36.
- Singh AT, PK Chauhan, P Kumari & S Kaushal (2011). Identification and prevention of bacterial contamination on explant used in plant tissue culture labs. *Internat J Pharm & Pharmaceutical Sci* 3(4), 160-163.
- Srivastava N, B Kamal, V Sharma, YK Negi, AK Dobriyal, S Gupta & VS Jadon (2010). Standardization of sterilization protocol for micro-propagation of *Aconitum heterophyllum* an endangered medicinal herb. *Acad Arena* 2 (6), 62-66.
- Traore A, Z Xing, A Bonser & J Carlson (2005). Optimizing a protocol for sterilization and *in vitro* establishment of vegetative buds from mature douglasfir tree. *Hort Sci* 40(5), 1464-1468.