

Identifikasi dan pencegahan kontaminasi pada kultur cair sistem perendaman sesaat

Identification and prevention of contamination in liquid culture of temporary immersion system

Masna Maya SINTA*), Imron RIYADI & SUMARYONO

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

Diterima tanggal 27 Juni 2014/disetujui tanggal 8 Oktober 2014

Abstract

Liquid culture is commonly used to scale up in vitro culture production as well as to optimize the developmental phase of plant in vitro culture. One of the liquid cultures that has been used widely is temporary immersion system (TIS). The main problem of liquid culture is contamination. The use of antibiotics sometimes controls the contaminants less effectively and hinders the growth of plant culture. The purpose of this research was to determine sources of contaminant on whole sequence of TIS to identify and to prevent the emergence of the contaminants. Sampling method was applied to each section and stage of TIS culture and the contaminants found were identified. The results revealed that compartment of TIS was the main source of contaminant (100%). Furthermore, from all components of TIS compartment, washer (a small ring seal connecting screen disc and basket) was the main source of TIS contaminant (41.2%). Four contaminants found were identified as Bacillus macerans, Bacillus megaterium, Bacillus sphaericus and Bacillus firmus. Two times sterilization of washer in an autoclave at temperature of 121 °C and air pressure of 1 kg/cm² for 20 minutes before and after being installed reduced the contamination level on TIS culture significantly.

[Keywords: In-vitro culture, bacterial contamination, sterilization method, Bacillus spp.]

Abstrak

Kultur cair umumnya digunakan untuk meningkatkan skala produksi dan mengoptimalkan fase perkembangan kultur *in vitro* tanaman. Salah satu jenis kultur cair yang banyak digunakan adalah sistem perendaman sesaat (SPS). Masalah utama dalam kultur cair adalah kontaminasi. Penggunaan antibiotika terkadang kurang efektif dalam mengendalikan kontaminan dan menghambat pertumbuhan kultur tanaman. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui sumber kontaminan pada seluruh rangkaian kultur SPS serta mengidentifikasi dan mencegah munculnya kontaminan tersebut. Metode yang digunakan adalah pengambilan contoh pada tiap bagian dan fase kultur SPS, serta kontaminan yang ditemukan kemudian diidentifikasi. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa kompartemen SPS merupakan sumber utama kontaminan (100%). Selanjutnya, dari seluruh komponen kompartemen SPS, *washer* (cincin penutup yang menghubungkan penyaring dan keranjang) di dalam rangkaian SPS merupakan sumber utama kontaminan (41,2%). Empat kontaminan yang ditemukan diidentifikasi sebagai *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus* dan *Bacillus firmus*. Sterilisasi cincin penutup sebanyak dua kali dalam autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan udara 1 kg/cm² selama 20 menit sebelum dan

sesudah dirangkai secara nyata menurunkan tingkat kontaminasi pada kultur SPS.

[Kata kunci: Kultur *in-vitro*, kontaminasi bakteri, metode sterilisasi, *Bacillus* spp.]

Pendahuluan

Kontaminasi oleh mikroba merupakan salah satu masalah serius dalam kultur *in vitro* tanaman (Leifert & Cassells, 2001) dan merupakan penyebab utama hilangnya kultur tanaman. Upaya untuk meningkatkan skala produksi (*scaling up*) kultur *in vitro* tanaman seringkali terhambat oleh adanya kontaminasi mikroba. Berbagai jenis mikroorganisme (fungi, kapang, bakteri, virus, dan viroid) dan mikroantropoda (tungau dan trips) telah diidentifikasi sebagai kontaminan dalam kultur jaringan tanaman (Leifert & Cassells, 2001).

Peningkatan skala produksi kultur *in vitro* tanaman umumnya dilakukan pada media cair, baik dalam labu Erlenmeyer, sistem perendaman sesaat (SPS) maupun bioreaktor. Kontaminasi merupakan salah satu masalah utama dalam penggunaan media cair. Satu bejana berkapasitas satu liter media cair mampu menampung ratusan sampai ribuan propagula sehingga kehilangan yang dialami sangat merugikan. Pada medium padat terkadang mikroba kontaminan bersifat laten namun akan muncul ketika berada pada medium cair yang memiliki lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhannya. Salah satu jenis kultur cair yang banyak digunakan dalam kultur *in vitro* tanaman adalah SPS. Kultur SPS memungkinkan eksplan memperoleh nutrisi yang cukup ketika eksplan terendam dalam media, serta memperoleh aerasi yang baik. Pencegahan kontaminasi mikroba pada kultur cair SPS lebih sulit dibandingkan dengan kultur padat karena peralatan yang digunakan lebih kompleks. Alat SPS terdiri dari dua wadah yaitu wadah bawah sebagai tempat medium cair dan wadah atas sebagai tempat propagula. Pompa menekan udara luar masuk melalui selang ke dalam wadah bawah mendorong medium ke wadah atas dan merendam propagula selama jangka waktu tertentu. Setelah waktu perendaman selesai aliran udara yang masuk ke wadah berhenti dan medium turun ke wadah bawah karena gravitasi. Udara masuk dan keluar wadah melalui filter untuk mencegah masuknya kontaminan. Adanya aliran udara dari dan keluar medium menyebabkan

terjadinya kontaminasi pada SPS lebih besar dibandingkan pada kultur padat yang statis. Di bioreaktor kabut yang prinsip kerjanya mirip dengan SPS, fungi dan bakteri dapat bergerak dari wadah medium dan generator pengkabutan ke dalam ruang tanam tempat propagula yang akan menimbulkan kontaminasi tiga sampai tujuh hari kemudian (Sharaf-Eldin & Weathers, 2006).

Pencegahan terhadap kontaminasi harus dilakukan sebelum pembuatan kultur karena apabila kultur cair diketahui terkontaminasi, penanggulangannya sudah terlambat. Sterilisasi dalam autoklaf dilakukan terhadap alat dan medium. Penambahan fungisida, bakterisida, antibiotika, dan biosida lain ke dalam medium dapat dilakukan untuk mencegah timbulnya kontaminasi. Berdasarkan pengamatan hasil kultur SPS pada beberapa tanaman di Laboratorium Biak Sel dan Mikropropagasi, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia periode 2009-2014, ditemukan kontaminasi bakteri cukup tinggi yaitu antara lain 27,5% pada kelapa sawit, 30% pada sagu, dan 25% pada tebu. Untuk menanggulangi kontaminasi pada kultur SPS kelapa sawit, maka ditambahkan antibiotik rifampisin 15 mL/L dan tetrasiklin 15 mL/L pada media, tetapi masih terjadi kontaminasi oleh bakteri sebesar 5%, dan penambahan antibiotika tersebut dapat menurunkan perkembangan kultur sawit (Sumaryono et al., 2010). Penggunaan antibiotika yang tidak tepat akan mempengaruhi pertumbuhan planlet, sedangkan pemaparan kultur terhadap antibiotika yang terlalu lama dapat menyebabkan kematian (Wojtania & Pulawska, 2005). Penggunaan erythromycin, ciprofloxacin dan sulfamethoxazole secara signifikan menurunkan pertumbuhan, kandungan klorofil dan laju fotosintesis pada kultur *Sele-nastrum capricornutum* (Liu et al., 2011).

Salah satu bahan biosida yang banyak digunakan dalam kultur cair adalah golongan isotiazolon dalam bentuk *Plant Preservative Mixture* (PPM) (Sharaf-Eldin & Weathers, 2006). PPM terdiri dari campuran metilkloroisotiazolinon dan metilisotiazolinon. PPM merupakan biosida dengan spektrum yang lebih luas dibandingkan dengan antibiotika lainnya dan relatif tahan terhadap suhu tinggi sehingga dapat diberikan ke dalam medium sebelum diautoklaf. Walaupun demikian, keefektifan senyawa biosida dalam mengendalikan kontaminan mikroba tidak dianjurkan apabila dapat menghambat pertumbuhan propagula. Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah menetapkan sumber terjadinya kontaminasi pada seluruh rangkaian kultur SPS serta mengidentifikasi dan mencegah munculnya kontaminan tersebut.

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni-Oktober 2014 di Laboratorium Biak Sel dan Mikropropagasi,

Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor.

Alat dan bahan deteksi

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: pinset dan spatula sendok yang disterilisasi dengan cara dibakar dalam bunsen; media, *millipore filter* 0,2 μm dan kompartemen SPS yang disterilisasi dengan dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan udara 1 kg/cm² selama 20 menit; dan *laminar air flow* (LAF) *cabinet* yang disterilisasi dengan sinar UV selama 45 menit. Kompartemen SPS yang digunakan adalah SPS RITA® (Etienne & Berthouly, 2002) dengan ukuran diameter 12,5 cm dan tinggi 15 cm. Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalus *friable* karet klon PB 260. Media pendeteksi kontaminan adalah media *Nutrient Agar* (NA) yang disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan udara 1 kg/cm² selama 20 menit.

Penentuan sumber kontaminan

Penentuan sumber kontaminan dilakukan secara bertahap. Tahap pertama dilakukan untuk menentukan sumber kontaminan sesuai alur kerja kultur SPS. Untuk mengetahui sumber kontaminan bakteri pada kultur *in vitro*, dilakukan pengambilan contoh (*sampling*) pada tiap bagian proses kultur yang dilakukan. Titik pengambilan contoh yang diambil antara lain: peralatan kultur (pinset dan spatula sendok), *LAF cabinet*, media, eksplan, kompartemen SPS, udara dalam SPS, pelaksana kultur, serta lingkungan sekitar SPS berada.

Pengambilan contoh peralatan kultur dilakukan dengan menggoreskan bagian tersebut pada media NA. Pengambilan contoh LAF dilakukan dengan meletakkan media NA pada LAF selama empat menit (karena proses kultur pada SPS rata-rata dilakukan selama empat menit). Pengambilan contoh media dilakukan dengan menuang sedikit media setelah diautoklaf pada media NA (metode *pour plate*). Pengambilan contoh eksplan dilakukan dengan mengkultur eksplan pada media NA. Pengambilan contoh kompartemen SPS dilakukan dengan menggores bagian-bagian kompartemen SPS dengan menggunakan jarum ose steril kemudian digoreskan pada media NA (*streak*). Pengambilan contoh udara dalam SPS dilakukan dengan meletakkan media NA di dalam kompartemen SPS yang dioperasikan secara normal. Pengambilan contoh pelaksana kultur dilakukan dengan menggores ujung jari dengan jarum ose steril kemudian digoreskan pada media NA. Pengambilan contoh dilakukan sebanyak sembilan kali dengan tiga ulangan waktu. Contoh kemudian diinkubasi pada suhu ruangan. Penentuan sumber kontaminan tahap dua dilakukan untuk memperinci lebih lanjut bagian dari sumber kontaminan hasil

tahap 1 yakni kompartemen SPS. Pengambilan contoh dilakukan dengan melepaskan setiap bagian kompartemen SPS, kemudian menggores bagian-bagian tersebut kembali pada media NA. Media NA berisi hasil pengambilan contoh selanjutnya diinkubasi pada suhu ruangan selama satu minggu.

Isolasi dan identifikasi kontaminan

Kontaminan yang tumbuh pada media NA hasil pengambilan contoh kemudian diisolasi berdasarkan perbedaan warna koloni yang muncul. Kontaminan yang telah diisolasi tersebut kemudian diidentifikasi di Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor. Metode identifikasi yang digunakan berdasarkan karakter morfologi serta uji biokimia yang dicocokkan dengan panduan *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology* (Holt, 1994).

Pencegahan kontaminasi

Pencegahan kontaminasi dikhususkan pada bagian utama sumber kontaminan berdasarkan deteksi kontaminan tahap 1 dan 2. Pencegahan kontaminasi dilakukan secara fisik dengan perlakuan (1) kontrol yakni sterilisasi pada autoklaf setelah dirangkai, (2) sterilisasi menggunakan sinar UV dengan panjang gelombang 245 nm selama 45 menit lalu diautoklaf, (3) sterilisasi dengan diautoklaf terpisah sebelum dirangkai dan diautoklaf kembali setelah dirangkai, dan (4) sterilisasi dengan direndam dalam larutan alkohol 70% selama 10 menit sebelum dirangkai lalu diautoklaf. Deteksi efektifitas sterilisasi dilakukan dengan metode pengambilan contoh dan contoh dikultur pada media NA.

Analisis statistik

Data hasil pengamatan dianalisis dengan sidik ragam (*analysis of variance*). Apabila ada perbedaan

yang nyata maka perbedaan antar perlakuan ditentukan menurut uji jarak berganda Duncan pada $P=0,05$.

Hasil dan Pembahasan

Sumber kontaminan

Penentuan sumber kontaminan tahap 1 dilakukan dengan pengambilan contoh pada peralatan, eksplan yang digunakan, ruang kultur dan pelaksana kultur SPS. Hasil pengambilan contoh yang kemudian dikulturkan pada media NA menunjukkan bahwa kompartemen SPS merupakan sumber kontaminan utama dengan tingkat kontaminasi mencapai 100% (Tabel 1). Proses kultur *in vitro* terdiri dari beberapa tahap pelaksanaan yang melibatkan beberapa komponen, sehingga memungkinkan terjadinya kontaminasi. Komponen tersebut antara lain: peralatan kultur, media kultur, eksplan, ruang penanaman, pelaksana kultur serta ruang kultur. Berdasarkan penelitian ini sumber kontaminan utama berasal dari kompartemen SPS (100% terkontaminasi). Udara di dalam kompartemen SPS juga menimbulkan kontaminasi sebesar 33,3%, sedangkan contoh lainnya bukan merupakan sumber kontaminan. Peralatan kultur, ruang LAF, media, eksplan kalus embriogenik karet, pelaksana kultur dan lingkungan sekitar kompartemen SPS menunjukkan tingkat kontaminasi yang rendah (0 - 11,1%), sehingga bukan merupakan sumber kontaminasi.

Kompartemen SPS terdiri dari 12 komponen utama yaitu dua saluran udara (*air vent*), filter udara dengan ukuran lubang 2,5 μm (*millipore filter*), tutup (*cap*), segel tutup (*cap O ring*), segel tabung (*tube O ring*), tabung tengah (*central tube*), penyaring (*screen disc*), cincin penutup (*washer*), keranjang (*basket*), lonceng (*bell*), dan wadah (*vessel*) (Gambar 1a). Komponen tersebut disusun secara berurutan

Tabel 1. Sumber kontaminan pada kultur *in vitro* tahap 1.

Table 1. Source of contamination in *in vitro* culture at phase 1.

Titik pengambilan contoh (<i>Sampling point</i>)	Tingkat kontaminasi <i>Contamination level</i> (%)
Kontrol (<i>control</i>)	0 c ^{*)}
Pinset (<i>forcep</i>)	0 c
Spatula dengan sendok (<i>spatula with spoon</i>)	0 c
Laminar air flow cabinet	11,1 bc
Media (<i>medium</i>)	11,1 bc
Eksplan kalus karet (<i>explant of rubber callus</i>)	0 c
Kompartemen SPS (<i>TIS compartment</i>)	100 a
Udara di dalam SPS (<i>air inside TIS</i>)	33,3 b
Pelaksana kultur (<i>lab workers</i>)	0 c
Lingkungan sekitar SPS (<i>surrounding TIS</i>)	0 c

^{*)} Rerata pada kolom yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada $P=0,05$.

^{*)} Means on column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

menjadi satu kesatuan seperti terlihat pada Gambar 1b dan dibungkus kertas sebelum disterilisasi dalam autoklaf.

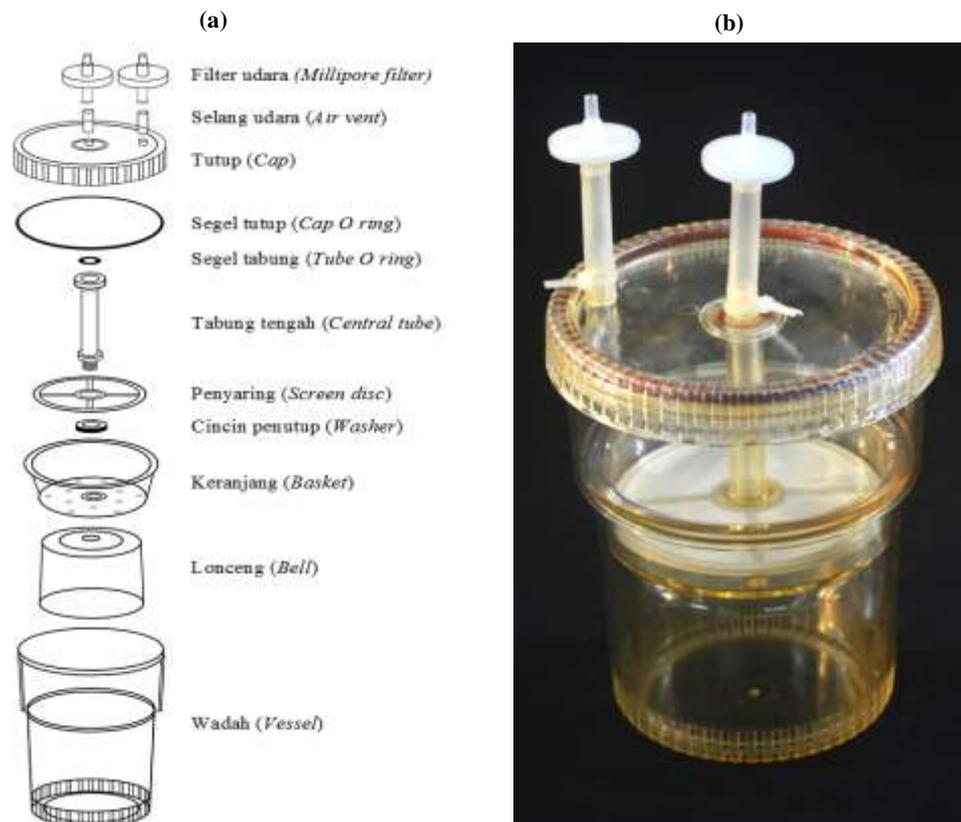
Penentuan sumber kontaminan tahap 2 dilakukan untuk menentukan lebih rinci sumber utama kontaminan (berdasarkan hasil tahap 1), sehingga pengambilan contoh hanya dilakukan pada kompartemen SPS. Pengambilan contoh pada setiap komponen kompartemen SPS memperlihatkan bahwa sumber kontaminan utama pada kultur SPS terdapat pada cincin penutup (*washer*), yang menghubungkan panyaring dan keranjang, dengan tingkat kontaminasi sebesar 41,6% (Tabel 2). Tingkat kontaminasi pada cincin penutup tersebut berbeda nyata dengan tingkat kontaminasi pada bagian komponen lainnya berdasarkan uji jarak berganda Duncan. Cincin penutup ketika dirangkai akan berada tepat di tengah kompartemen SPS, sehingga kemungkinan ketika proses sterilisasi tekanan udara 1 kg/cm² dan uap panas dengan suhu 121 °C dalam autoklaf kurang efektif menjangkaunya.

Hasil identifikasi kontaminan yang diisolasi dari media NA menunjukkan terdapat empat jenis bakteri yang menyebabkan kontaminasi yaitu *Bacillus macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus* dan *Bacillus firmus*. Genus *Bacillus* mampu tumbuh

dengan baik pada suhu 10-50 °C dan membentuk endospora yang dikenal tahan terhadap panas. Karakter utama dari bakteri genus *Bacillus* adalah adanya endospora. Resistensi endospora *Bacillus* lebih tinggi dibandingkan sel vegetatifnya. Spora *B. megaterium* dan *B. sphaericus* mampu bertahan hingga suhu 120 °C (Jantova & Lukasova, 2001). Lokasi cincin penutup pada rangkaian SPS yang tersembunyi serta ketahanan endospora bakteri kontaminan pada suhu tinggi menyebabkan timbulnya kontaminasi pada kultur SPS.

Pencegahan kontaminasi

Pencegahan kontaminasi pada SPS dilakukan dengan perbaikan sistem sterilisasi sumber kontaminan utama pada kompartemen SPS yaitu cincin penutup (*washer*). Berdasarkan beberapa perlakuan sterilisasi, pencegahan kontaminasi SPS paling efektif adalah dengan sterilisasi cincin penutup di autoklaf sebanyak dua kali yaitu sebelum dirangkai (terpisah) dengan memasukkan cincin pada botol jam, dan setelah dirangkai bersama komponen SPS lainnya (Gambar 2). Sterilisasi cincin penutup secara terpisah dalam autoklaf sebelum dirangkai kemudian di autoklaf kembali setelah dirangkai pada kompartemen SPS mampu mengurangi tingkat kontaminasi



Gambar 1. Rangkaian kompartemen SPS, a) Komponen penyusun kompartemen SPS, b) Kompartemen SPS yang telah dirangkai.

Figure 1. Series of TIS compartment, a) Components of TIS compartment, b) TIS compartment has been assembled.

Tabel 2. Sumber kontaminasi pada kompartemen SPS.

Table 2. Source of contamination on TIS compartment.

Titik pengambilan contoh (<i>Sampling point</i>)	Kontaminasi Contamination (%)
Selang udara masuk (<i>inlet air vent</i>)	0,0 b ^{*)}
Selang udara keluar (<i>outlet air vent</i>)	0,0 b
Segel pada tutup (<i>cap O ring</i>)	0,0 b
Dudukan cincin pada tutup (<i>cap O ring holder</i>)	0,0 b
Tutup (<i>cap</i>)	8,3 b
Ulir pada tutup (<i>screw on cap</i>)	0,0 b
Segel pada tabung (<i>tube o ring</i>)	8,3 b
Dudukan cincin tabung (<i>tube o ring holder</i>)	8,3 b
Tengah tabung luar (<i>outer central tube</i>)	0,0 b
Tengah tabung dalam (<i>inner central tube</i>)	0,0 b
Dinding wadah atas (<i>upper vessel wall</i>)	0,0 b
Permukaan atas saringan (<i>upper surface of screen disc</i>)	0,0 b
Permukaan bawah saringan (<i>lower surface of screen disc</i>)	8,3 b
Wadah bawah (<i>lower vessel</i>)	8,3 b
Dinding dalam keranjang (<i>basket inner wall</i>)	0,0 b
Dinding luar keranjang (<i>basket outer wall</i>)	8,3 b
Dinding dalam lonceng (<i>inner bell</i>)	0,0 b
Dinding luar lonceng (<i>outer bell</i>)	0,0 b
Cincin penutup (<i>washer</i>)	41,6 a
Ulir tabung (<i>tube screw</i>)	0,0 b
Ulir pada lonceng (<i>screw on bell</i>)	0,0 b
Permukaan keranjang (<i>basket surface</i>)	8,3 b
Lubang keranjang (<i>basket holes</i>)	0,0 b

^{*)} Rerata pada kolom yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada P= 0,05.

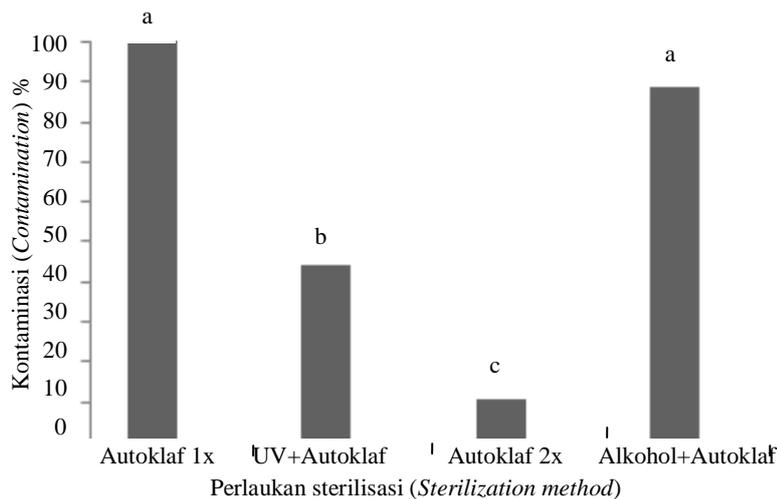
^{*)} Means on column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P= 0.05.

pada SPS menjadi sebesar 11,1%. Sterilisasi satu kali dalam autoklaf setelah dirangkai atau dengan perlakuan perendaman dalam alkohol 70% selama 10 menit sebelum diautoklaf tidak menurunkan secara nyata tingkat kontaminasi, sedangkan dengan penyinaran sinar UV selama 45 menit sebelum diautoklaf me-nurunkan tingkat kontaminasi menjadi 40%.

Bakteri kontaminasi yang muncul pada SPS ini berasal dari genus *Bacillus* yang tergolong dalam bakteri gram positif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang lebih tebal sehingga tidak terpengaruh oleh perendaman alkohol, berbeda dengan gram negatif yang memiliki dinding sel tipis dan mudah luruh oleh alkohol pada pewarnaan gram. Ketika cincin penutup tersebut dirangkai bersama komponen lain pada rangkaian SPS, cincin penutup akan berada tepat di tengah rangkaian dan terjepit di antara penyaring dan keranjang. Hal ini menyebabkan udara panas dan tekanan dalam autoklaf tidak mampu menjangkau cincin tersebut, oleh karena itu bakteri yang memiliki endospora tahan terhadap panas seperti *B. megaterium* dan *B. sphaericus* yang berada pada cincin penutup masih mampu bertahan hidup. Kontaminasi dari genus *Bacillus* umumnya disebabkan

kan karena kurang efektifnya teknik sterilisasi (Leifert & Woodward, 1998), oleh karena itu perbaikan sistem sterilisasi seperti pada penelitian ini memang penting untuk dilakukan.

Beragamnya sumber dan jenis mikroba kontaminasi menyebabkan perbedaan penanganan kontaminasi. Sumber kontaminasi dari bakteri endogen seperti pada *Jatropha curcas* (Misra *et al.*, 2010), lada (Anjali *et al.*, 2007), pisang (Titov *et al.*, 2007), dan yam (Mbah & Wakil, 2012) ditanggulangi dengan penambahan antibiotika yang sesuai pada media. Penggunaan beberapa buku tanpa daun sebagai sumber eksplan mampu menekan kontaminasi dan efek negatif sterilitas pada kultur bambu, teh dan mawar (Thakur & Sood, 2007). Nurhaimi-Haris *et al.* (2009) menemukan bahwa sumber kontaminasi pada kultur *microcutting* karet berasal dari permukaan eksplan, dan sterilisasi eksplan dengan penggunaan desogermes efektif menurunkan tingkat kontaminasi. Laboratorium kultur jaringan di daerah tropis seperti Nigeria, lingkungan dan pelaksana kultur merupakan sumber utama kontaminasi (Oduyayo *et al.*, 2007). *Good Laboratory Practice* dalam proses kultur jaringan mutlak diperlukan untuk menghindari dan menurunkan tingkat kontaminasi.



Gambar 2. Perlakuan sterilisasi pada cincin penutup SPS. Kolom diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata.

Figure 2. Sterilization methods on washer of TIS. Column followed by the same letters are not significantly different.

Kesimpulan

Kontaminasi pada kultur SPS disebabkan terutama oleh kurang efektifnya proses sterilisasi kompartemen SPS. Empat bakteri kontaminan telah terdeteksi yaitu *Bacillus macerans*, *B. megaterium*, *B. sphaericus* dan *B. firmus*. Dari rangkaian kompartemen SPS terdeteksi bahwa sumber utama kontaminan adalah cincin penutup (*washer*). Sterilisasi cincin penutup tersebut sebelum dan sesudah dirangkai pada autoklaf selama 20 menit menurunkan tingkat kontaminasi pada kultur SPS.

Daftar Pustaka

- Anjali AK, SM Kelkar, MG Watve & KV Khrisnamurthy (2007). Characterization and control of endophytic bacterial contaminants in *in vitro* cultures of *Piper* spp., *Taxus baccata* subsp. *Wallichiana*, and *Withania somnifera*. *Canadian J Microbiol* 53, 63-74.
- Etienne H & M Berthouly (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69, 215-231
- Holt JG (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth eds. Baltimore, William & Wilkins
- Jantova B & J Lukasova (2001). Heat resistance of *Bacillus* spp. spores isolated from cow's milk and farm environment. *Acta Vet Brno* 70, 197-184.
- Leifert C & AC Cassells (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37, 133-138.
- Leifert C & S Woodward (1998). Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell Tiss Org Cult* 52, 83-88.
- Liu B, W Liu, X Nie, C Guan, Y Yang, Zwang & W Liao (2011). Growth response and toxic effects of three antibiotics on *Selenastrum capricornutum* evaluated by photosynthetic rate and chlorophyll biosynthesis. *J Environ Sci* 23(9), 1558-1563.
- Mbah EI & SM Wakil (2012). Elimination of bacteria from *in vitro* yam tissue cultures using antibiotics. *J Plant Pathol* 94 (1), 53-58
- Misra P, N Gupta, DD Toppo, V Pandey, MK Mishra & R Tuli (2010). Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell Tiss Org Cult* 100, 189-197.
- 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), 89-99.
- 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), 067-072.
- Sharaf-Eldin MA & P Weathers (2006). Movement and containment of microbial contamination in the nutrient mist bioreactor. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 42, 553-557.
- Sumaryono, I Riyadi & MM Sinta (2010). Clonal propagation of elite genotypes of oil palm through tissue culture. *Laporan Akhir Tahun BPBPI 2010*. Bogor, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia.
- Thakur R & A Sood (2007). An efficient method for explant sterilization for reduced contamination. *Plant Cell Tiss Org Cult* 84, 369-371.
- Titov S, SK Bhowmik, MS Alam & SN Uddin (2007). Control of endogenous bacterial contamination and micropropagation of a traditional table banana (*Musa* spp cv. Kathali) of Bangladesh. *Chinese J Biotechnol* 23(6), 1042-1048.
- Wojtania A & J Pulawska (2005). Identification and elimination of bacterial contaminants from *Pelargonium* tissue cultures. *J Fruit Ornamental Plant Res* 13, 101-108.

