

## **Pengaruh bahan pra-sterilan, tutup tabung kultur, dan musim terhadap tingkat kontaminasi eksplan pada kultur *microcutting* karet**

*Effect of pre-sterilization agent, culture tube closure, and season on the contamination level of rubber microcutting culture*

NURHAIMI-HARIS<sup>1)</sup>, SUMARYONO<sup>1)</sup> & M.P. CARRON<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Jl. Taman Kencana No.1 Bogor 16151, Indonesia

<sup>2)</sup> CIRAD, Montpellier-Cedex 5, France

Diterima tgl 28 Juni 2009/Disetujui tgl 12 September 2009

### **Abstract**

*Microbial contamination is a major obstacle in clonal propagation of hevea (*Hevea brasiliensis*) through microcutting technology; therefore the ability to reduce contamination will determine the success of the application of this technology. The aim of experiments was to increase healthy and survived plantlets by testing pre-sterilization agents for cleaning explants during pre-sterilization step, culture tube closures suitable for explants growth and an appropriate time for introducing explants at the primary culture phase. The pre-sterilization agents tested were aganol, alcohol and desogerme, the culture tube closures used were parafilm and cotton, and the time for culturing explants were determined by using rubber genotypes introduced during the year of 2006 and 2007. The results show that desogerme decreased significantly the level of explant contamination compared to aganol and alcohol, meanwhile the type of culture tube closure did not affect the level of explant contamination. The type of culture tube closure influenced significantly the survival of explants where the number of survived explants in culture tubes covered with cotton was higher than that of with parafilm. Season also affected the contamination frequency of the explants. Higher number of healthy plantlets were obtained when introduction of the explants were conducted from*

*June to October considered as dry season in Bogor compared to introduction of the explants during rainy season from January to May. Different genotypes of rubber introduced at the primary culture phase did not affect the percentage of explant contamination.*

[Key words: *Hevea brasiliensis*, microcutting, microbial contamination, culture *in-vitro*]

### **Abstrak**

Kontaminasi oleh mikroba merupakan masalah utama pada perbanyakan klonal tanaman karet (*Hevea brasiliensis*) melalui teknologi *microcutting* sehingga kemampuan mengurangi kontaminasi menentukan keberhasilan aplikasi teknologi tersebut. Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh jenis bahan pra-sterilan yang efektif untuk pencucian eksplan tahap pra-sterilisasi, mempelajari pengaruh tutup tabung terhadap perkembangan eksplan serta mengidentifikasi waktu yang tepat untuk melaksanakan introduksi eksplan pada tahap kultur primer (kultur awal) sehingga jumlah eksplan sehat dan tumbuh dapat ditingkatkan. Bahan pra-sterilan yang diuji adalah aganol, alkohol dan desogerme, tutup tabung yang digunakan adalah parafilm dan kapas, sedangkan identifikasi waktu kultur dilakukan melalui introduksi eksplan sepanjang

tahun 2006 dan 2007 terhadap berbagai genotipe tanaman karet yang tersedia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa desogermene menurunkan secara nyata tingkat kontaminasi eksplan dibandingkan dengan aganol dan alkohol, sedangkan jenis tutup tabung tidak berpengaruh terhadap persentase kontaminasi. Jenis tutup tabung berpengaruh sangat nyata terhadap persentase eksplan yang hidup dan membentuk tunas, di mana persentase eksplan membentuk tunas pada tabung dengan tutup kapas lebih tinggi dibandingkan dengan tutup parafilm. Musim juga sangat mempengaruhi tingkat kontaminasi eksplan. Eksplan sehat jauh lebih banyak diperoleh apabila penanaman eksplan dilakukan pada bulan Juni sampai Oktober, yang merupakan musim kemarau di Bogor dibandingkan dengan introduksi eksplan pada bulan Januari sampai Mei, yang merupakan musim hujan. Jenis genotipe yang ditanam pada tahap kultur primer tidak berpengaruh terhadap persentase kontaminasi.

[Kata kunci: *Hevea brasiliensis*, *microcutting*, kontaminasi mikroba, kultur *in-vitro*]

## Pendahuluan

*Microcutting* merupakan salah satu teknik mikropropagasi tanaman berbasis kultur *in vitro* dan telah berhasil diaplikasikan untuk perbanyakan tanaman karet asal biji (*seedling*) dengan menggunakan tunas aksiler sebagai eksplan (Carron & Enjalric, 1983). Keuntungan teknik tersebut adalah terbukanya peluang untuk menghasilkan batang bawah klonal yang selama ini belum pernah ada pada tanaman karet. Penggunaan batang bawah klonal akan meningkatkan keseragaman pertanaman karet di lapang, karena klon batang atas didukung oleh batang bawah yang sama dan lebih seragam, dibandingkan dengan batang bawah asal biji yang digunakan saat ini. Di samping itu,

teknologi perbanyakan tersebut juga membuka peluang untuk melakukan seleksi terhadap batang bawah sesuai dengan karakter yang diinginkan, misalnya batang bawah dengan karakter tahan terhadap penyakit akar atau toleran terhadap kondisi lahan kering. Material bahan tanam tersebut kemudian dapat diperbanyak secara klonal. Penggunaan batang bawah unggul dan klonal berpeluang besar untuk meningkatkan produksi lateks dari batang atas karena diduga potensi produksi dapat ditampilkan secara optimal.

Proses perbanyakan tanaman karet melalui teknologi *microcutting* terdiri atas beberapa tahap, yaitu kultur primer (*primary culture*), multiplikasi, *conditioning (hardening)*, induksi dan inisiasi perakaran serta aklimatisasi (Carron *et al.*, 2005). Kultur primer merupakan tahap penanaman eksplan pada medium pertumbuhan steril untuk menginisiasi kultur aseptik, yang merupakan tahap awal dalam teknologi kultur jaringan (Ahloowalia *et al.*, 2002). Eksplan pada tahap kultur primer merupakan potongan batang tanaman karet muda yang dipelihara dalam polibeg di rumah kaca dan eksplan tersebut memiliki minimal satu mata tunas aksiler (*axillary bud*). Dalam kondisi *in vitro*, eksplan yang bebas dari kontaminan dan tumbuh baik dapat diperbanyak melalui subkultur berulang-ulang sehingga kultur primer merupakan tahap yang menentukan untuk keberhasilan dan keberlanjutan perbanyakan tanaman menggunakan teknologi tersebut.

Keberhasilan implementasi teknologi *microcutting* pada tanaman sangat dipengaruhi oleh kemampuan untuk mengatasi masalah kontaminasi, yang merupakan masalah serius dan selalu ditemui, terutama di daerah beriklim tropis seperti Indonesia. Seringkali kegagalan eksplan untuk tumbuh dan berkembang bukan disebabkan oleh

medium pertumbuhan yang kurang sesuai namun oleh tingginya tingkat kontaminasi. Pada *microcutting* karet, metode sterilisasi yang efektif telah dilaporkan di daerah dengan empat musim (Perancis) sehingga eksplan sehat dapat mencapai 90%, dan ternyata metode yang sama tidak efektif apabila diaplikasikan di daerah tropis seperti Guadeloupe (Afrika). Penerapan metode sterilisasi yang sama di Guadeloupe hanya menghasilkan tanaman aseptik tidak lebih dari 20% (Enjalric *et. al.*, 1988). Kontaminan utama adalah bakteri, yakni mencapai 73% dari keseluruhan kontaminasi, didominasi oleh genus *Enterobacter* dan *Pseudomonas*, sedangkan dari kelompok fungi adalah *Neurospora*. Di alam, jenis mikroba tersebut banyak ditemukan di tanah, air ataupun ber-asosiasi dengan tanaman.

Kontaminasi oleh bakteri *Pseudomonas* dan bakteri Gram negatif lainnya dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti prosedur sterilisasi eksplan dan medium yang tidak efisien, atau keterampilan dan pemahaman pekerja yang belum memadai untuk teknik kultur aseptik (Leifert & Cassells, 2001).

Percobaan pendahuluan *microcutting* tanaman karet di Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI) menunjukkan bahwa tingkat kontaminasi tahap kultur primer sangat tinggi, yakni di atas 30%, bahkan pada beberapa kultur dapat mencapai 100 % (Nurhaimi-Haris & Carron, 2007), sehingga menjadi pembatas utama aplikasi teknologi tersebut untuk perbanyakan skala massal secara efisien. Apabila dilakukan sterilisasi eksplan yang terlalu keras maka jaringan di sekitar mata tunas rusak sehingga mempengaruhi pertumbuhan eksplan, bahkan menyebabkan kematian eksplan. Oleh karena itu, keberhasilan mengatasi masalah kontaminasi tanpa merusak eksplan merupakan tantangan

awal yang harus diatasi dalam implementasi teknologi *microcutting* tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh bahan pra-sterilan untuk mencuci eksplan, jenis tutup tabung kultur dan waktu yang tepat untuk introduksi eksplan pada tahap kultur primer sehingga tingkat kontaminasi dapat ditekan serendah mungkin.

## **Bahan dan Metode**

### *Bahan tanam dan inisiasi kultur (primary culture)*

Genotipe tanaman karet dengan dua lingkaran pertumbuhan daun (dua payung) yang ditumbuhkan dalam polibeg di rumah kaca BPBPI, Bogor, digunakan sebagai sumber eksplan dalam penelitian ini. Tanaman tersebut merupakan semai dari biji klon GT 1, RRIM 600 dan PB 260 yang diseleksi pertumbuhannya di Kebun Percobaan Balai Penelitian Sungei Putih (Puslit Karet) tahun 2005. Perlakuan sterilisasi yang digunakan adalah kombinasi antara bahan pra-sterilan dalam proses pra-sterilisasi eksplan dengan bahan penutup tabung kultur, yaitu aganol-parafilm (bahan pra-sterilan adalah aganol, bahan penutup tabung kultur adalah parafilm), aganol-kapas, alkohol-parafilm, alkohol-kapas, desogermeparafilm dan desogermeparafilm dan desogermeparafilm. Batang tanaman karet muda yang mengandung mata tunas aksiler dikumpulkan dan dikelompokkan berdasarkan genotipenya. Pra-sterilisasi eksplan dilakukan melalui pencucian eksplan selama lima menit dengan larutan tertentu (aganol 5 mL/L, alkohol 70%, desogermeparafilm 5 mL/L) sesuai perlakuan, kemudian disterilisasi melalui pencucian sesaat dengan alkohol 70%, direndam dalam larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 17,6% selama 20 menit dan dicuci dengan

akuades steril sebanyak tiga kali. Eksplan selanjutnya dipotong dengan ukuran 1,0–1,5cm, masing-masing potongan minimal mempunyai satu mata tunas aksiler. Kemudian setiap eksplan direndam selama 2,5 - 4 jam dalam tabung kultur yang berisi 10 mL medium MID cair (Carron *et al.*, 2005). Setelah perendaman, eksplan dikulturkan dalam tabung kultur yang berisi 13 mL medium MM1 0H padat (Carron *et al.*, 2005) dengan posisi mata tunas aksiler menghadap ke atas. pH kedua medium tersebut diatur pada 5,8 sebelum di Autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 20 menit. Berdasarkan ketersediaan bahan tanam sumber eksplan (tanaman induk), penanaman eksplan pada media kultur pada tahun 2006 dilakukan dari bulan Februari sampai Desember (kecuali bulan September dan Oktober), sedangkan pada tahun 2007 dilakukan dari bulan Januari sampai Oktober.

Kultur dipelihara di rak kultur dengan pencahayaan selama 12 jam/hari menggunakan lampu TL 40 W dengan intensitas cahaya sekitar 30  $\mu\text{mol}$  foton/m<sup>2</sup>/detik dan dengan kelembaban relatif berkisar antara 65–80%. Suhu ruang diatur pada kisaran 26 – 28°C. Inisiasi kultur dilakukan selama enam minggu sebelum dipindah ke tahap berikutnya. Pengamatan dilakukan setiap minggu dan parameter yang diamati pada tahap kultur primer adalah jumlah eksplan terkontaminasi dan mati, mata tunas pecah serta jumlah tunas yang diperoleh dari masing-masing genotipe.

#### *Multiplikasi eksplan*

Setelah selesai tahap kultur primer ( $\pm$  6 minggu), eksplan yang menghasilkan tunas selanjutnya diperbanyak. Proses perbanyak-an dilakukan dengan memotong tunas baru

menjadi bagian yang lebih kecil, dan selanjutnya dikulturkan pada medium baru. Pada tahap ini terdapat tiga bentuk eksplan, yaitu *stock* eksplan (S) yang merupakan eksplan awal yang diperoleh dengan memisahkan tunas baru yang terbentuk, nodal eksplan (NE) yang diperoleh dari bagian batang tunas baru, serta *shoot* eksplan (ST) yang merupakan bagian apikal tunas baru, biasanya mengandung beberapa daun muda.

Masing-masing eksplan tersebut dikulturkan di medium baru yang berbeda, yaitu *stock* eksplan dalam medium padat MM1, nodal eksplan dalam medium padat MM2 dan *shoot* eksplan dalam medium padat MA1 (Carron *et al.*, 2005). Kondisi pemeliharaan dan lingkungan kultur sama seperti pada tahap kultur primer. Satu siklus tahap multiplikasi adalah empat minggu, dan tahap ini dapat diulang antara 3 – 12 siklus tergantung jumlah planlet yang diinginkan. Pengamatan dilakukan setiap minggu dan parameter yang diamati adalah jumlah eksplan terkontaminasi serta jumlah *stock* eksplan, nodal eksplan dan *shoot* eksplan pada setiap siklus multiplikasi.

### **Hasil dan Pembahasan**

#### *Pengaruh bahan pra-sterilan dan tutup tabung*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bahan pra-sterilan berpengaruh nyata terhadap persentase kontaminasi (Tabel 1). Tingkat kontaminasi eksplan pada perlakuan desogermine secara nyata lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan aganol dan alkohol. Desogermine dan aganol merupakan larutan disinfektan, desogermine dengan bahan aktif *quaternary alkyl chloride* dan garam *polyimino biguanidide*, sedangkan

aganol dengan bahan aktif *alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride*. Persentase kontaminasi tidak dipengaruhi oleh jenis tutup serta tidak ada interaksi antara bahan pra-sterilan dan jenis tutup terhadap persentase kontaminasi.

Kontaminasi termasuk pembatas utama dalam perbanyakan tanaman melalui kultur *in vitro*, terutama apabila sumber eksplan berasal dari lingkungan non-steril, seperti rumah kaca atau lapangan. Penurunan tingkat kontaminasi eksplan dapat diupayakan melalui pre-kondisi tanaman sumber eksplan dengan bahan antimikroba, seperti fungisida, yang diikuti dengan perlakuan pencucian eksplan dengan disinfektan tertentu serta penggunaan jaringan tanaman muda mungkin sebagai eksplan (Enjalric *et al.*, 1988; Lardet *et al.*, 1994). Desogerme yang digunakan dalam proses pra-sterilisasi dengan kombinasi bahan aktif *quaternary alkyl chloride* dan

garam *poly-imino biguanidide* memiliki kemampuan merusak membran sel dan protein berbagai jenis mikroba, termasuk fungi, namun cukup aman untuk jaringan tanaman, sehingga secara efektif dapat digunakan sebagai disinfektan.

Jenis tutup tabung berpengaruh sangat nyata terhadap persentase hidup dan pembentukan tunas eksplan. Dengan larutan pra-sterilan apapun (aganol, alkohol, atau desogerme), jumlah eksplan (mata tunas aksiler) yang hidup dan menghasilkan tunas pada tabung kultur dengan tutup kapas jauh lebih banyak dibandingkan dengan pada tabung kultur yang ditutup parafilm (Tabel 2). Tidak ada interaksi antara bahan pra-sterilan dan jenis tutup terhadap persentase tumbuh eksplan. Secara visual perbedaan pengaruh jenis tutup tabung terhadap pembentukan tunas dari setiap eksplan dapat dilihat pada Gambar 1. Tutup tabung kapas mampu menginduksi dengan lebih baik mata

Tabel 1. Persentase kontaminasi eksplan *microcutting* karet pada dua jenis penutup tabung kultur dan tiga jenis bahan pra-sterilan.

Table 1. Percentage of contamination of rubber *microcutting* explants in two kind of culture tube closure and three kind of pre-sterilization agent.

Bahan pra-sterilan <i>Pre-sterilization agent</i>	Penutup tabung kultur <i>Culture tube closure</i>		Rerata <i>Average</i>
	Parafilm ( <i>Parafilm</i> )	Kapas ( <i>Cotton</i> )	
	Eksplan terkontaminasi (%) <i>Contaminated explants (%)</i>		
Aganol	50,8	44,9	47,9 a*
Alkohol ( <i>Alcohol</i> )	41,9	37,7	39,8 a
Desogerme	27,1	21,4	24,2 b
Rerata ( <i>Average</i> )	39,9 a*	34,7 a	

\*) Masing-masing rerata pada kolom dan baris yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada  $P=0,05$ .

\*) *Each average on column and row followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at  $P=0,05$ .*

tunas aksiler untuk menghasilkan tunas, dibandingkan dengan tutup tabung parafilm. Hal ini diduga berhubungan erat dengan peluang terjadinya pertukaran udara (*gas exchange*) antara udara di dalam dan di luar tabung kultur. Penutup tabung kapas memberikan peluang aerasi yang lebih baik dan jenis tutup tabung seperti ini banyak digunakan di awal teknik kultur *in vitro* diperkenalkan. Tabung, botol kultur, atau bejana apapun yang digunakan dalam proses perbanyakan kultur *in vitro*, perlu ditutup untuk melindungi eksplan dan media pertumbuhan, baik terhadap kontaminasi mikroorganisme maupun penguapan yang berlebihan. Namun penutup yang digunakan harus tetap memberi peluang terjadinya pertukaran udara di dalam tabung. Pertukaran udara berperan penting dalam ketersediaan oksigen dan CO<sub>2</sub>, serta penguapan air dan eliminasi gas etilen di dalam tabung kultur (Prakash *et al.*, 2002). Gas etilen merupakan fitohormon yang dihasilkan planlet dan akan terakumulasi di

dalam tabung atau botol kultur apabila tutup tabung atau botol terlalu rapat (Kozai & Kubota, 2005). Akumulasi gas etilen dalam jumlah tertentu dapat merusak pertumbuhan planlet (Prakash *et al.*, 2002).

*Pengaruh musim terhadap kontaminasi*

Perlakuan terbaik pada percobaan di atas, yaitu desogermes sebagai larutan pra-sterilan, dikombinasi dengan tutup tabung kapas yang dibungkus dengan kain kasa, digunakan dalam penelitian selanjutnya. Sepanjang tahun 2006 dan 2007 telah ditanam sekitar 7.556 eksplan pada tahap kultur primer. Eksplan yang terkontaminasi oleh mikroba, terutama fungi biasanya dapat diamati pada 10 hari pertama kultur dan semakin berkurang setelah melewati 10 hari tersebut. Namun kontaminasi yang bersifat laten, yakni yang tidak terlihat secara visual biasanya akan bertahan lama pada kultur tanpa menunjukkan gejala pada pertumbuhan tanaman ataupun medium (Leifert &

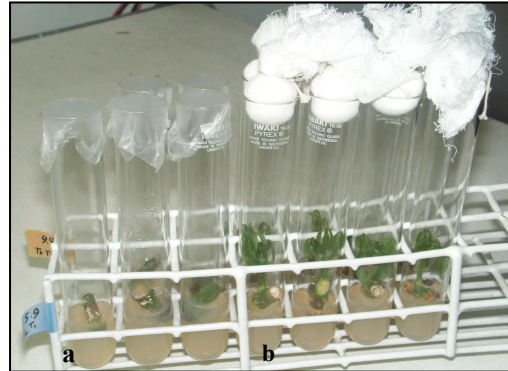
Tabel 2. Persentase hidup eksplan *microcutting* karet pada dua jenis penutup tabung kultur dan tiga jenis bahan pra-sterilan.

Table 2. Percentage of survival explants of rubber *microcutting* explants in two kind of culture tube closure and three kind of pre-sterilization agent.

Bahan pra-sterilan <i>Pre-sterilization agent</i>	Penutup tabung kultur <i>Culture tube closure</i>		Rerata <i>Average</i>
	Parafilm ( <i>Parafilm</i> )	Kapas ( <i>Cotton</i> )	
	Eksplan hidup (%) <i>Survival explants (%)</i>		
Aganol	8,6	41,4	25,0 a*
Alkohol ( <i>Alcohol</i> )	7,4	49,8	28,6 a
Desogermes	20,4	61,5	40,9 a
Rerata ( <i>Average</i> )	21,1 b*	50,9 a	

\*) Masing-masing rerata pada kolom dan baris yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada P=0,05.

\*) Each average on column and row followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P=0.05.



Gambar 1. Penampilan eksplan tanaman karet pada tabung kultur dengan dua jenis bahan penutup tabung: (a) parafilm, (b) kapas.

Figure 1. Performance of rubber explants in culture tubes with two kinds of tube closure: (a) parafilm, (b) cotton.

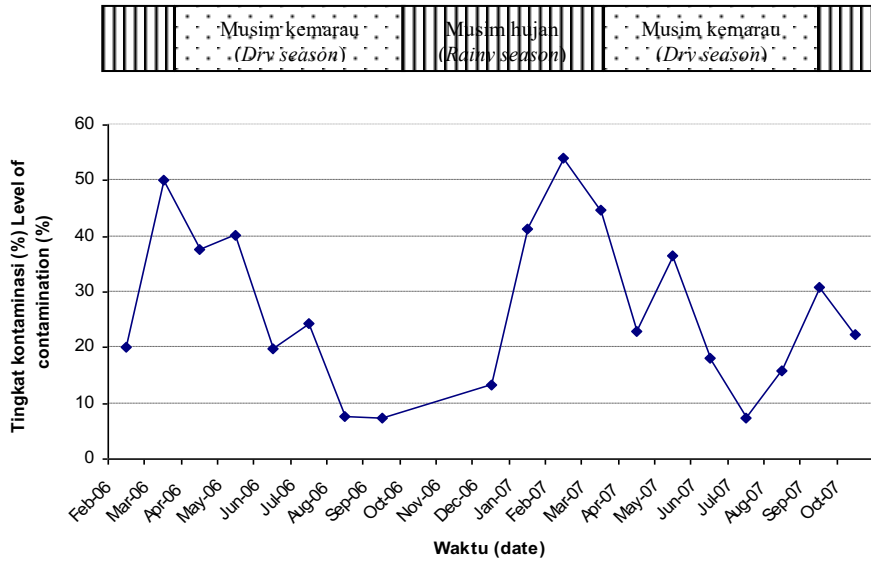
Cassells, 2001). Tingkat kontaminasi kultur pada tahap akhir kultur primer pada setiap bulan penanaman menunjukkan variasi yang sangat tinggi dari waktu ke waktu, namun terdapat pola yang mirip sepanjang tahun (Gambar 2).

Kultur eksplan yang dilakukan sekitar bulan Januari sampai Mei, yang merupakan bulan-bulan basah setiap tahunnya di Bogor, menunjukkan tingkat kontaminasi relatif tinggi, baik tahun 2006 maupun 2007. Rata-rata kontaminasi pada bulan-bulan tersebut melebihi 30%, yaitu batas maksimal kontaminasi yang diperbolehkan pada tahap kultur primer (Carron, komunikasi pribadi). Sebaliknya, apabila penanaman eksplan dilakukan pada bulan-bulan kering sekitar Juni sampai Oktober tingkat kontaminasi turun sampai di bawah batas maksimum (30%).

Keberhasilan teknologi *microcutting* untuk perbanyakan massal bahan tanam karet secara klonal sangat ditentukan oleh dua hal, yaitu kemampuan mengatasi tingkat kontaminasi serta respon dari eksplan. Kontaminasi seringkali menjadi masalah serius, terutama untuk eksplan yang berasal dari lingkungan luar seperti lapangan dan

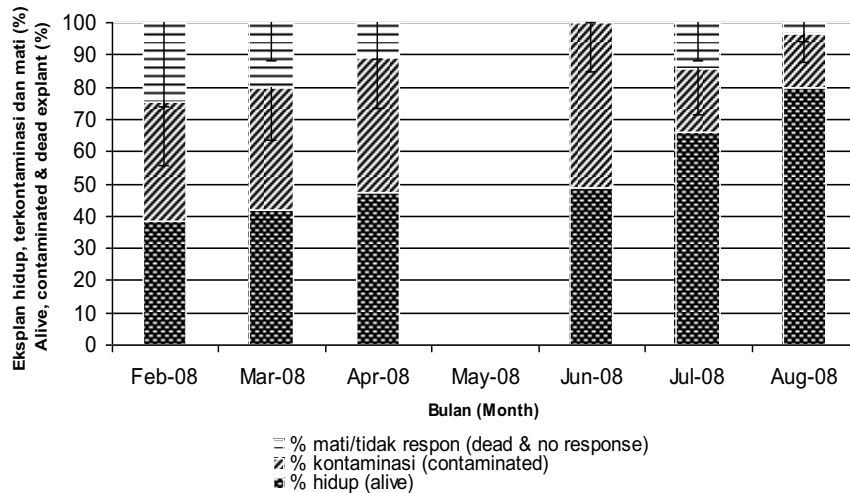
rumah kaca (Niedz & Bausher, 2002). Dalam penelitian ini, dari 7.556 eksplan tanaman karet yang dikulturkan pada tahap kultur primer sepanjang tahun 2006 dan 2007, kehilangan kultur akibat kontaminasi mencapai 26% dan eksplan tidak responsif (mati) mencapai 10%. Tingkat kontaminasi tersebut masih lebih rendah dibandingkan dengan perbanyakan tanaman bambu (*Guadua angustifolia*) menggunakan tunas aksiler, dimana sebagian besar eksplan yang berasal dari tanaman di lapangan terkontaminasi sedangkan yang berasal dari tanaman di rumah kaca terkontaminasi sebanyak 50% (Jimenez *et al.*, 2006).

Jumlah eksplan sehat pada tahap kultur primer sangat dipengaruhi oleh waktu penanaman eksplan (Gambar 3). Kultur eksplan yang dilakukan pada bulan basah (Februari – April 2008) hanya menghasilkan eksplan sehat di bawah 50%, namun pada bulan kering (Juli dan Agustus 2008) dapat meningkatkan eksplan sehat, bahkan mendekati 80% pada pelaksanaan bulan Agustus (Gambar 3). Dengan demikian untuk meningkatkan efisiensi perbanyakan tanaman karet dengan teknologi *microcutting* perlu diperhatikan waktu yang tepat



Gambar 2. Tingkat kontaminasi tahap akhir kultur primer pada tanaman karet yang diperbanyak dengan teknologi *microcutting* dari waktu ke waktu sepanjang Februari 2006 s/d Oktober 2007.

Figure 2. Contamination level at the end of primary culture on rubber plant propagated through *microcutting* technology from time to time during February 2006 until October 2007.



Gambar 3. Variasi eksplan tanaman karet yang hidup, terkontaminasi dan mati pada tahap akhir kultur primer pada berbagai waktu kultur.

Figure 3. Variation of live, contaminated and dead rubber explants at the end of primary culture at various dates of culture.



Pengaruh bahan pra-sterilan, tutup tabung kultur, dan musim terhadap....

Tabel 3. Persentase kontaminasi eksplan *microcutting* karet dari 15 genotipe, dikulturkan pada musim berbeda.

Table 3. Percentage of contamination of rubber *microcutting* explants from 15 genotypes, cultured at different season.

Genotipe Genotype	Kontaminasi (Contamination) (%)	
	Musim hujan <sup>+) )</sup> Rainy season	Musim kemarau <sup>++)</sup> Dry season
2	45,90	18,72
4	30,69	13,24
5	36,94	17,81
7	51,80	17,84
9	34,08	18,78
11	64,75	16,99
26	41,31	9,92
38	56,21	11,68
43	45,83	10,32
55	43,33	11,08
58	62,73	10,14
60	46,97	10,90
63	43,59	14,59
78	30,14	26,05
91	49,71	16,03
Rerata Average	45,60 a*	14,94 b

<sup>+) )</sup> January – May 2006 & 2007    <sup>++)</sup> June – October 2006 & 2007

\*) Rerata pada kolom yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata menurut uji-t pada  $P=0,05$ .

\*) Average on column followed by the different letters are significantly different according to t-test at  $P=0.05$ .

untuk menanam eksplan pada tahap kultur primer. Berdasarkan data pada Gambar 2 dan 3 diketahui bahwa waktu penanaman eksplan yang sesuai adalah pada bulan-bulan kering, yaitu Juni sampai Oktober, sehingga kehilangan kultur akibat kontaminasi dapat ditekan seminimal mungkin dan persentase hidup eksplan jauh lebih tinggi.

#### Pengaruh genotipe terhadap kontaminasi

Untuk mengetahui apakah jenis genotipe karet memberikan pengaruh ter-

hadap tingkat kontaminasi dilakukan pengujian menggunakan 15 macam genotipe, yaitu genotipe-genotipe yang menunjukkan respons pertumbuhan yang baik dalam lingkungan kultur *in vitro*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa genotipe karet tidak berpengaruh terhadap persentase kontaminasi serta tidak ada interaksi antara genotipe dan musim terhadap persentase kontaminasi tersebut (Tabel 3). Dari data ini jelas terlihat bahwa persentase kontaminasi sangat nyata dipengaruhi oleh musim, apapun jenis genotipe yang dikulturkan.

## Kesimpulan

Pada kebanyakan tanaman karet menggunakan teknologi *microcutting*, bahan pra-sterilan desogerm pada tahap pre-sterilisasi eksplan secara nyata menurunkan tingkat kontaminasi eksplan dibandingkan bahan pra-sterilan aganol dan alkohol, sedangkan jenis tutup tabung tidak mempengaruhi tingkat kontaminasi. Jenis genotipe karet tidak berpengaruh terhadap persentase kontaminasi serta tidak ada interaksi antara genotipe dan musim terhadap persentase kontaminasi. Penurunan tingkat kontaminasi juga dicapai apabila penanaman eksplan tahap kultur primer dilakukan pada bulan-bulan kering. Mata tunas eksplan akan berkembang membentuk tunas apabila jenis tutup tabungnya adalah kapas yang dibungkus kain kasa. Dengan demikian, tutup tabung kapas menginduksi dengan lebih baik pembentukan tunas dibandingkan dengan tutup tabung parafilm.

## Daftar Pustaka

- Ahloowalia BS, J Prakash, VA Savangikar & C Savangikar (2002). Plant tissue culture. In: *Low Cost Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries*. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna, 26–30 August 2002.
- Carron MP & F Enjalric (1983). Perspectives du microbouturage de *l'Hevea brasiliensis*. *Caoutchoucs et Plastiques* 627-628, 65-68.
- Carron MP, L Lardet & P Montoro (2005). Hevea microcutting. *Technical Notes on The Process*. CIRAD
- Enjalric F, MP Carron & L Lardet (1988). Contamination of primary cultures in tropical areas: The case of *Hevea brasiliensis*. *Acta Horticult* 225, 57 – 65.
- Jimenez VM, J Castillo, E Tavares, E Guevara & M Montiel (2006). *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell Tiss & Org Cult* 86, 389-395.
- Kozai T & C Kubota (2005). *In vitro* aerial environments and their effects on growth and development of plants. In: Kozai et al. (Eds) *Photoautotrophic (Sugar Free Mendium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System*. The Netherlands. Kluwer Academic Publisher. p, 31-52.
- Lardet L, M Bes, F Enjalric & MP Carron (1994). Mineral imbalance in *Hevea brasiliensis* microcuttings: Relation with *in vitro* multiplication and acclimatization. *J Plant Nutrition* 17(12), 2135-2150.
- Leifert C & AC Cassells (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 37, 133-138.
- Niedz RP & MG Bausher (2002). Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. *In Vitro Cell Dev Biol* 38(5), 468-471.
- Nurhaimi-Haris & MPCarron (2007). *Progress Report*. Toward the development of rootstock clones for high productivity in rubber plants (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.). Bogor, Indonesian Biotechnology Research Institute for Estate Crops. PI. 01/Bud/2007.
- Prakash J, MI Hoque & T Brinks (2002). Culture media and containers. In: *Low Cost Options for Tissue Culture Technology In Developing Countries*. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna, 26–30 August 2002.