

**PENGARUH TEKNIK STERILISASI EXPLAN
TERHADAP TINGKAT PEROLEHAN KULTUR JARINGAN AKSENIK
RAMIN (*Gonystylus bancanus*)**

*Influence of Explants Sterilisation Technique on Acquisition Rate of
Ramin (*Gonystylus bancanus*) Axenic Tissue Culture*

Asri Insiana Putri, Toni Herawan, Prastyono, dan Liliek Haryjanto
Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar Km.15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta, Indonesia 55582
email: asriip@yahoo.co.id

ABSTRACT

Since 2005, ramin has been included in CITES Appendix II and according to IUCN red list, ramin is also regarded as vulnerable (VU A1cd). The Lack of information on explant sterilization techniques in ramin tissue culture is one reason why there has not been enough initiation to develop ramin micro propagation. Plant tissue culture contamination has economic impact due to its direct influence in losses during in vitro culture of plants. The aim of this study was to observe the influence of explants sterilisation technique on acquisition rate of ramin axenic tissue culture with the rate of contamination increase, axenic culture acquisition and shoot elongation as parameters. Ramin seedlings as explants source were collected from Tumbang Nusa, Central Kalimantan. Fifty replicating explants of one nodule each in 3 techniques were used in this study based on in vitro incubation time: sterilization 1 (24 hours incubation), sterilization 2 (48 hours incubation) and sterilization 3 (72 hours incubation) with non metallic antimicrobial compounds namely detergent, ditiocarbamate with mankozeb active ingredient (compound A), a compound containing 5.25% NaOCl added sodium hypochlorite and hydrogen oxide (compound B), 70% alcohol (compound C) as explants surface sterilants. Murashige-Skoog was used as media for evaluation of sterilization technique and explants regeneration on one year incubation. The results of this study indicate that the lowest rate of contamination was found in sterilization 3 (28%) with the success number of axenic tissue culture at 46%. The average shoot elongation of the axenic culture was 5,91 cm after 12 months subcultured in every month.

Keywords: *in vitro*, contamination, mortality, non metallic antimicrobial

ABSTRAK

Sejak 2005, ramin termasuk dalam CITES Appendix II dan menurut daftar merah IUCN, ramin juga termasuk kategori rentan (VU A1cd). Kurangnya informasi teknik sterilisasi eksplan pada kultur jaringan ramin merupakan salah satu alasan mengapa belum ada cukup inisiasi untuk mengembangkan perbanyakan ramin secara mikro. Kontaminasi pada kultur jaringan mempunyai dampak ekonomi akibat pengaruh langsung pada kerugian selama kultur in vitro tanaman. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan observasi pengaruh teknik sterilisasi eksplan terhadap perolehan kultur aksenik ramin, dengan tingkat pertambahan kontaminasi, perolehan kultur aksenik dan panjang tunas sebagai parameter. Anakan ramin digunakan sebagai sumber eksplan yang dikoleksi dari Tumbang Nusa, Kalimantan Tengah. Lima puluh replikasi eksplan satu nodul masing-masing dalam 3 teknik pada penelitian in vitro yang berdasarkan waktu inkubasi *in vitro* yaitu sterilisasi 1 (24 jam inkubasi), sterilisasi 2 (48 jam inkubasi) dan sterilisasi 3 (72 jam inkubasi), dengan senyawa antimikrobia bukan logam yaitu detergent, ditiokarbamat dengan bahan aktif mankozeb (senyawa A), senyawa berbahan aktif NaOCl 5,25% yang ditambahkan sodium hipoklorit dan hydrogen oksida (senyawa B), alkohol 70% (senyawa C) untuk sterilisasi permukaan eksplan. Murashige-skoog digunakan sebagai media untuk evaluasi teknik sterilisasi dan regenerasi eksplan selama 1 tahun inkubasi. Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa pertambahan tingkat kontaminasi terendah adalah pada pengulangan sterilisasi 3 (28%) dengan kultur aksenik tertinggi 46%. Rata-rata pemanjangan tunas pada kultur aksenik ini adalah 5,91 cm setelah 1 tahun di subkultur setiap bulan.

Kata kunci: *in vitro*, kontaminasi, mortalitas, antimikrobia bukan logam

I. PENDAHULUAN

Ramin merupakan salah satu kayu ekspor utama Asia Tenggara. Indonesia merupakan pengekspor terbesar dengan tujuan utama

negara-negara Eropa. Produksi kayu ramin terus menurun dari tahun ke tahun karena tingginya eksploitasi tanpa diimbangi penanaman kembali. Menurut *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna*

and Flora (CITES) (2017) ramin termasuk jenis pohon dengan status terancam punah karena penyebarannya bersifat endemik dengan tingkat eksploitasi yang tinggi. Melalui Keputusan Menteri Kehutanan No 121/Kpts-V/2001 telah dilakukan penghentian sementara (moratorium) kegiatan penebangan dan perdagangan ramin di Indonesia dan keputusan tersebut masih berlaku sampai tahun 2017 ini. Dalam rangka pelestarian dan peningkatan populasi jenis ramin, penanaman kembali pada bekas areal tebangan hutan alam rawa gambut memberikan keuntungan secara ekonomis dan ekologis. Ketersediaan anakan ramin asal biji yang memiliki daya hidup yang tinggi sampai saat ini menjadi hambatan karena ketidakpastian musim berbunga, pertumbuhan yang lambat, memerlukan situs spesifik. Di samping itu penelitian perbanyak ramin sampai saat ini belum menunjukkan hasil yang signifikan.

Fokus utama di berbagai topik penelitian kultur jaringan saat ini adalah pada pengembangan protokol standar sterilisasi dengan tanaman sebagai sumber eksplan dari alam untuk menghasilkan kultur aksenik (Cobrado & Fernandez, 2016; Kusuma, Kustiawan, & Ruchaemi, 2016). Penelitian mengenai pengaruh umur tanaman terhadap kontaminasi juga menjadi fokus untuk mendapatkan standar sterilisasi. Anakan ramin yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil koleksi di sekitar tanaman induk yang tumbuh dari biji beberapa tahun sebelumnya dan sulit diketahui umur anakan secara pasti. Hal ini menjadi kendala untuk mengamati pengaruh umur terhadap tingkat kontaminasi. Namun demikian kisaran umur tingkat semai dapat dipergunakan sebagai dasar penentuan.

Teknik sterilisasi secara berulang dengan waktu inkubasi tertentu setelah dikultur pada penelitian ini berdasarkan pertimbangan kemampuan mikrobia untuk bertahan atau menghindari dari senyawa antimikrobia seperti pada pembentukan dormansi. Bertahan hidup jamur dapat berupa miselium atau spora dorman (Dworkin & Shah, 2010). Sel bakteri dapat

bertahan hidup dari pengaruh senyawa antimikrobia tanpa mengalami perubahan genetik, kondisi dorman ini dikenal sebagai persisten (*persisters*) dan berbeda dengan ketahanan (*resistant*). Mikrobia dorman tidak mengalami pertumbuhan, namun demikian formasi sel dan status metabolisme sel belum diketahui sepenuhnya (Wood, Knabel, & Kwan, 2013). Sel-sel dorman dapat terbawa pada permukaan eksplan (eksternal) maupun di dalam eksplan (internal) sehingga mempersulit proses sterilisasi yang secara standar dilakukan di permukaan jaringan eksplan. Penelitian efektivitas dan efisiensi berbagai jenis dan konsentrasi senyawa antimikrobia pada sterilisasi kultur jaringan untuk jenis akasia (Elbasheer & Osman, 2017), jenis *Durio zibethinus* (Hermayani, Retnoningsih, & Rahayu, 2016), jenis *Durio kutejensis* Hassk. (Kusuma et al., 2016). Sedangkan untuk tanaman jenis bukan pohon juga sudah dilaporkan seperti pada *Musa textilis* Nee (Cobrado & Fernandez, 2016), *Coccinia abyssinica* (Cobrado & Fernandez, 2016), *Dendrobium* (Da Silva, Winarto, Dobránszki, Cardoso, & Zeng, 2016).

Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan observasi pengaruh teknik sterilisasi eksplan berdasarkan waktu inkubasi pada perlakuan sterilisasi berulang terhadap tingkat perolehan kultur jaringan aksenik ramin dengan persentase kontaminasi, persentase kematian dan panjang tunas sebagai parameter. Penelitian ini penting dilakukan untuk menurunkan tingginya tingkat kontaminasi kultur jaringan tanaman hutan terutama jenis lambat tumbuh seperti pohon ramin. Penelitian ini merupakan kerjasama antara Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPPBPTH) dengan Asia Pulp and Paper (APP).

II. BAHAN DAN METODE

A. Waktu dan tempat

Penelitian diawali dengan melakukan

eksplorasi dan pengangkutan anakan ramin dari populasi Tumbang Nusa, Kalimantan Tengah pada bulan Januari 2015. Kegiatan dilakukan di persemaian dan laboratorium Kultur Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta. Perlakuan penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2015 setelah dilakukan tata persemaian dan persiapan sterilisasi peralatan dan media untuk kultur jaringan. Pengamatan penelitian dilakukan selama 1 tahun dilanjutkan analisis data.

B. Bahan dan alat penelitian

1. Bahan

Bahan tanaman penelitian ini adalah anakan ramin hasil eksplorasi yang ditanam dalam *polybag* di persemaian sebagai sumber eksplan setelah 6 bulan dilakukan prakondisi dengan penyemprotan pestisida dan pemeliharaan dengan pemberian paranet serta pemupukan dasar N:P:K perbandingan 1:1:1. Tunas aksiler satu nodul dipergunakan sebagai eksplan untuk materi perlakuan sterilisasi. Bahan kimia untuk sterilisasi menggunakan tiga senyawa antimikrobia bukan logam yaitu detergen, ditiokarbamat dengan bahan aktif mankozeb (senyawa A), senyawa berbahan aktif NaOCl 5,25 % yang direaksikan dengan sodium hipoklorit dan hydrogen oksida serta larutan Tween²⁰ (90 %) sebagai larutan pelindung jaringan eksplan (senyawa B), dan alkohol 70 % (senyawa C). Media MS dengan pengayaan hormon 6-BAP (*Benzylaminopurine*) 1 mg/l; NAA (*Naphthalene acetic acid*) 0,5 mg/l; 100 mg myo inositol; pyridoxine-HCl 0,5 mg/l; thiamine-HCl 0,1 mg/l; nicotinic-acid 0,5 mg/l; glycine 2 mg/l; 30 g/l sucrose and 10 g/l agar; dengan pengaturan pH 5,7 menggunakan NaOH dan/atau HCl. Sterilisasi media menggunakan *autoclave* pada suhu 121⁰C; 1,2 kg/cm² selama 30 menit.

2. Alat

Peralatan utama sterilisasi eksplan di laboratorium adalah *autoclave*, *lamina air flow* (LAF), pH meter, *microwave*, *hot steerer*, *shaker* dan peralatan gelas dan logam standar untuk kultur jaringan.

C. Rancangan penelitian

Sumber eksplan berasal dari 150 individu anakan ramin hasil eksplorasi yang dipilih secara acak di persemaian. Masing-masing perlakuan teknik sterilisasi menggunakan 1 nodul pada posisi nodul ke-2 tunas aksiler anakan dengan ukuran eksplan sekitar 2 cm yang diambil dari 50 individu sebagai ulangan. Teknik sterilisasi dilakukan secara bertahap di luar dan di dalam *lamina air flow* (LAF). Senyawa A merupakan sterilan yang diaplikasikan pada eksplan dengan mesin penggojok (*shaker*) di luar LAF berturut-turut pada larutan detergen dan larutan ditiokarbamat masing-masing 5 g/l dalam air kran selama 30 menit. Setelah dibilas sampai bersih, sterilisasi dilanjutkan dengan senyawa B dan C. Senyawa B (10 ml bahan aktif dilarutkan menjadi 100 ml dalam aquadest steril) dan senyawa C (70 ml alkohol dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril) merupakan sterilan yang diaplikasikan pada eksplan dengan penggojokan secara manual masing-masing selama 1 menit di dalam LAF. Sterilisasi awal sebelum perlakuan dilakukan diluar maupun di dalam LAF, sedangkan sterilisasi berulang sesuai waktu inkubasi hanya dilakukan di dalam LAF. Setelah sterilisasi sesuai perlakuan, eksplan ditransfer pada media tanam dan diinkubasi di ruang kultur. Inkubasi eksplan dimaksudkan untuk memberi kesempatan pecahnya dormansi kontaminan berdasarkan waktu tertentu. Perlakuan sterilisasi berdasarkan waktu inkubasi eksplan yaitu pada sterilisasi 1 (24 jam inkubasi), sterilisasi 2 (48 jam inkubasi) dan sterilisasi 3 (72 jam inkubasi) sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Perlakuan sterilisasi berdasarkan waktu inkubasi eksplan ramin.

Perlakuan	Waktu inkubasi
-----------	----------------

	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam	12 bulan (subkultur setiap 1 bulan)
Sterilisasi 1	Di luar LAF (senyawa A) dan di dalam LAF (senyawa B dan C)	Di dalam LAF (senyawa B dan C)	Inkubasi	Inkubasi	Inkubasi
Sterilisasi 2	Di luar LAF (senyawa A) dan di dalam LAF (senyawa B dan C)	Inkubasi	Di dalam LAF (senyawa B dan C)	Inkubasi	Inkubasi
Sterilisasi 3	Di luar LAF (senyawa A) dan di dalam LAF (senyawa B dan C)	Inkubasi	Inkubasi	Di dalam LAF (senyawa B dan C)	Inkubasi

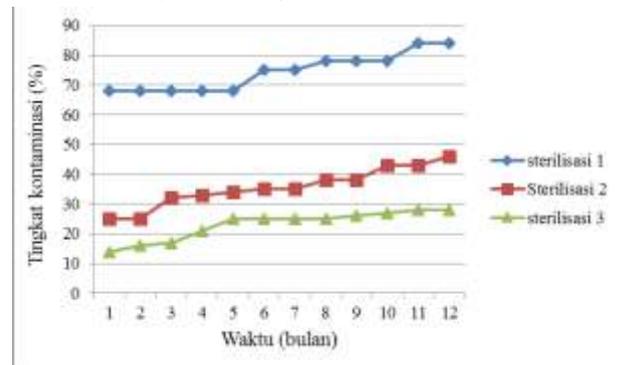
D. Pengamatan dan analisis data

Pengamatan kultur selama 12 bulan sejak awal sterilisasi (0 jam) dilakukan secara kumulatif berdasarkan rata-rata pertambahan kultur terkontaminasi. Pengamatan pemanjangan pucuk tunas dilakukan berdasarkan selisih panjang akhir dikurangi panjang awal dari pangkal eksplan sampai dengan pucuk tunas. Analisis keragaman respon eksplan ramir terhadap perlakuan teknik sterilisasi dilakukan dengan analisis varians menggunakan program SPSS versi 16.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan pengaruh teknik sterilisasi terhadap persentase kontaminasi, menunjukkan respon yang berbeda pada setiap perlakuan (Tabel 2). Pengaruh teknik pengulangan sterilisasi dengan waktu inkubasi *in vitro* menunjukkan rata-rata tingkat kontaminasi terendah sampai 12 bulan ditemukan pada sterilisasi 3 sebesar 28 % dan rata-rata tingkat kontaminasi tertinggi pada sterilisasi 1 sebesar 84 %. Dari ketiga teknik sterilisasi pertambahan tingkat kontaminasi tertinggi terjadi pada bulan pertama (14 % - 68 %). Setelah itu rata-rata pertambahan tingkat kontaminasi sampai bulan ke-12 sebesar 3,50 % pada sterilisasi 1; 1,92 % pada sterilisasi 2 dan

teknik sterilisasi terbaik adalah 1,17 % pada sterilisasi 3 (Gambar 1).



Gambar 1. Tingkat kontaminasi eksplan ramir dengan tiga teknik sterilisasi selama 12 bulan pengamatan.

Tingkat kontaminasi eksplan ramir selama 12 bulan pengamatan menunjukkan bahwa pada sterilisasi 1 tidak mempunyai tingkat kontaminasi yang berbeda selama 5 bulan pertama. Sterilisasi 2 tidak mempunyai tingkat kontaminasi yang berbeda selama 2 bulan pertama dan sterilisasi 3 tidak mempunyai tingkat kontaminasi yang berbeda antara bulan ke-2 dan bulan ke-3. Perbedaan ini ditengarai adanya peran pengulangan sterilisasi, semakin tinggi pengulangan sterilisasi mengakibatkan rendahnya stabilitas kontaminasi sampai periode waktu tertentu.

Secara konvensional, sterilisasi permukaan eksplan dilakukan dengan beberapa cara diantaranya dengan perendaman etanol (Zin, Sarmin, Ghadin, Basri, & Sidik, 2015),

perendaman sikloheksana, pencucian dengan sodium hipoklorit dan penyimpanan semalam dalam lemari pendingin (Webster, Mitchell, & Ahmad, 2003) serta perendaman etanol, perendaman natrium klorat dan pencucian dengan kalsium hipoklorit karbonat dan sodium azida (Madhurama, Sonam, Gupta, & Kharwar, 2014). Metode-metode sterilisasi tersebut belum mempertimbangkan kondisi dorman kontaminan sebagai parameter *in vitro*. Keterbaruan dalam penelitian ini adalah menggunakan perlakuan waktu untuk menekan kondisi dormansi kontaminan dengan modifikasi metode dasar konvensional sterilisasi permukaan eksplan tanaman yang berasal dari alam agar efektifitas kultur aksenik ramin lebih meningkat. Beberapa perlakuan sterilisasi berulang dengan jangka waktu inkubasi tertentu pada penelitian ini dimaksudkan agar senyawa steraltan (senyawa anti mikrobial) dapat bereaksi terhadap sel-sel mikrobial kontaminan sewaktu bebas dari kondisi dorman.

Tabel 2. Analisis keragaman teknik sterilisasi terhadap tingkat kontaminasi.

Sumber variasi	df	Jumlah kuadrat	Nilai F	Nilai P	F tabel
Teknik sterilisasi	2	8570,07	231,78	0,01*	3,28
Galat	33	610,08			
Total	35	9180,15			

Keterangan: * : berbeda nyata pada taraf 5%

Dormansi adalah suatu kondisi untuk mempertahankan hidup dari lingkungan yang tidak menguntungkan dan dapat terjadi pada jamur maupun bakteri sebagai kontaminan utama pada permukaan jaringan eksplan (*exogenously dormant*) maupun di dalam jaringan eksplan (*endogenously dormant*) (Jones & Lennon, 2010). Lingkungan tidak menguntungkan dalam hal ini adalah akibat proses-proses sterilisasi senyawa-senyawa kimia sterilan. Kontaminan dapat tumbuh cepat atau lambat berkaitan dengan dormansi. Kontaminan akan berkembang cepat secara kompetitif pada lingkungan kultur yang mempunyai

ketersediaan nutrisi tinggi, dan akan berkembang lambat menggunakan strategi anabiosis (pengurangan metabolisme sel pada waktu tertentu saat keadaan lingkungan tidak menguntungkan) selama mengalami dormansi (Rappé & Giovannoni, 2003).

Berbagai penelitian mengenai sterilisasi permukaan eksplan pada perbanyakan *in vitro* menunjukkan perbedaan teknik pada setiap jenis dan umur pohon dengan kombinasi jenis sterilan maupun waktu sterilisasi, sehingga memerlukan penelitian individual spesies untuk protokol kultur jaringan. Kontaminasi *in vitro* sebesar 3 % sampai dengan 15 % setiap subkultur untuk jenis tanaman hias seperti *Hemerocallis*, *Astilbe* atau *Delphinium*) dinilai pada taraf kewajaran. Kontaminasi *in vitro* terbaik untuk tanaman buah dengan sterilan bukan logam (NaOCl dan CaCl₂) sebesar 17,69 ± 2,47 % dan dengan sterilan logam (HgCl₂ dan AgNO₃) sebesar sekitar 13,27 ± 1,92 % menjadi standar yang digunakan saat ini (Leifert & Waites, 1994).

Rata-rata tingkat pertambahan kontaminasi pada perbanyakan kultur jaringan pohon lambat tumbuh ramin dengan sumber eksplan dari alam sebesar 28% eksplan terkontaminasi sampai dengan 12 kali subkultur termasuk rendah. Perbedaan potensi pertumbuhan dan status metabolik endogen jenis tanaman (Chern, Hosokawa, Cherubini, & Cline, 1993) menyebabkan perbedaan tingkat interaksi dengan lingkungan makro maupun mikro, sehingga mengakibatkan perbedaan diversitas kontaminan kultur jaringan. Penggunaan agen sterilisasi yang tepat merupakan upaya penting untuk mendapatkan lingkungan pertumbuhan optimal dan kapasitas regenerasi eksplan pada kultur jaringan (Ahmad, Hafeez-Ur-Rahman, Ahmed, & Laghari, 2003). Penelitian ini menggunakan agen sterilisasi sodium hipoklorit (NaClO), pembentuk dua substansi setelah pelarutan dalam aquadestilasi yaitu asam hipoklorous (HOCl) dan ion hipoklorit yang kurang aktif. Senyawa ini berperan penting dalam oksidasi dan disinfeksi serta dapat lebih menurunkan

tingkat kontaminasi bila digunakan bergantian dengan alkohol, dibandingkan tanpa alkohol (Ndakidemi, Mneney, & Ndakidemi, 2013). Namun demikian, beberapa penelitian menunjukkan bahwa kontaminasi tetap terjadi dan terdapat 19 jenis kontaminan bakteri maupun jamur yang teridentifikasi berasosiasi dengan kultur jaringan di berbagai lingkungan laboratorium (Oduyayo, Amusa, Okutade, & Ogunsanwo, 2007).

Kematian eksplan pada penelitian ini terjadi pada kultur terkontaminasi maupun tidak terkontaminasi. Pada kultur terkontaminasi terjadi 100 % kematian eksplan, sedangkan pada

kultur tidak terkontaminasi terjadi kematian tertinggi pada sterilisasi 2. Jumlah eksplan yang menunjukkan respon hidup tertinggi terjadi pada perlakuan sterilisasi 3. Kematian eksplan mengakibatkan tidak adanya respon nodul maupun pertumbuhan tunas terhadap media hormon. Hal ini ditengarai disebabkan karena adanya senyawa sterilan yang bersifat fitotoksik sehingga meracuni jaringan tanaman (Mng'omba, Sileshi, du Toit, & K., 2012). Tidak seluruh eksplan ramin memberikan respon inisiasi terhadap media kultur. Jumlah eksplan dari kultur terkontaminasi dan tidak terkontaminasi ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Jumlah eksplan pada kultur terkontaminasi dan tidak terkontaminasi*.

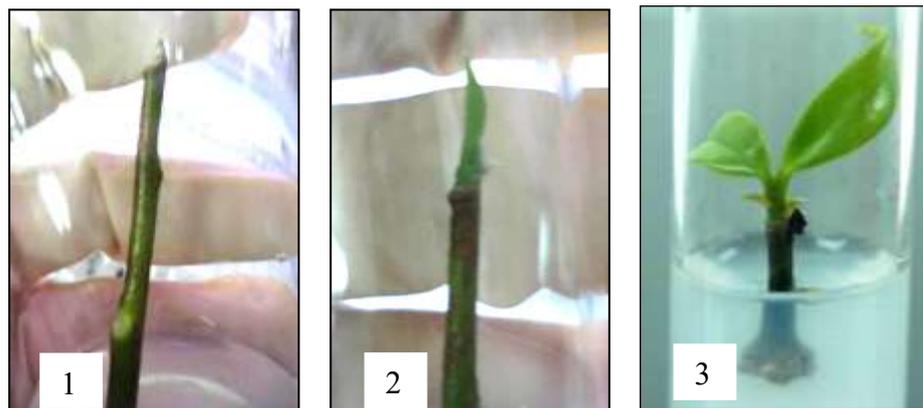
Sterilisasi	Jumlah eksplan (N)	Jumlah eksplan terkontaminasi	Jumlah eksplan tidak terkontaminasi		Jumlah kultur aksenik	Rata-rata pemanjangan tunas (cm)
			Mati	Hidup		
1	50	42	4	4	4	3,79 ^a
2	50	23	17	10	10	3,93 ^a
3	50	14	13	23	23	5,91 ^b

Keterangan: *sampai 12 kali subkultur, inkubasi 1 bulan setiap subkultur

Tingginya kematian eksplan di kultur yang tidak terkontaminasi pada perlakuan sterilisasi 2 ditengarai karena pada periode waktu tertentu. Kontaminan endogen terbebas dari kondisi dorman akibat kondisi lingkungan yang lebih menguntungkan dibandingkan perlakuan sterilisasi 1 maupun sterilisasi 3. Hal ini mengakibatkan kerusakan sel-sel jaringan dan perubahan kimia hormon yang bersifat tidak dapat balik (*irreversible*). Waktu periode spesifik dengan konsentrasi agen sterilisasi tertentu dapat terjadi pada pohon lambat tumbuh seperti halnya ramin yang diperoleh langsung dari alam yang dikenal mempunyai mikrobial kontaminan endogen maupun eksogen yang sulit dikendalikan merupakan upaya penting untuk protokol kultur aksenik. Kultur aksenik merupakan salah satu upaya pula untuk menjaga setrilitas tanaman dari serangan patogen selama inkubasi atau pada waktu pengiriman materi ke wilayah lain. Cassells (2016) melaporkan bahwa kontaminan jamur endogen atau endofitik dapat berubah menjadi patogen tanaman inang bila

kultur aksenik tidak didapatkan pada kondisi lingkungan *in vitro*.

Hasil pengamatan pemanjangan tunas aksiler pada kultur aksenik ramin (Tabel 3) menunjukkan bahwa pengulangan sterilisasi berpengaruh positif terhadap rata-rata panjang tunas. Panjang tunas pada perlakuan sterilisasi 3 lebih tinggi tinggi dan berbeda nyata dibandingkan perlakuan lain setelah 12 bulan pengamatan. Hal ini dimungkinkan karena tingginya pengaruh toksisitas agen sterilisasi pada sel-sel kontaminan, sehingga meningkatkan perolehan kultur aksenik dan memberi kesempatan pertumbuhan jaringan eksplan yang lebih besar. Kontaminan yang dapat bertahan pada perlakuan sterilisasi 3 ditengarai berkaitan dengan kemampuannya untuk membentuk kondisi dormansi yang lebih lama. Pemanjangan tunas pada kultur aksenik, diawali dengan adanya respon nodul terhadap media kultur dan menandakan kesesuaian kesetimbangan hormon auksin dan sitokinin, sampai dengan terbentuknya daun (Gambar 2).



Gambar 2. Pemanjangan tunas pada kultur aksenik ramin: inisiasi tunas pucuk (1), pemanjangan tunas (2) dan pemanjangan tunas diikuti dengan pembentukan daun (3)

IV. KESIMPULAN

Teknik sterilisasi eksplan ramin berdasarkan waktu inkubasi pada perlakuan sterilisasi berulang menggunakan sterilan bukan logam berpengaruh nyata terhadap beberapa parameter yaitu: 1) rata-rata tingkat pertambahan kontaminasi, 2) peningkatan perolehan kultur jaringan aksenik, dan 3) peningkatan panjang tunas eksplan, hal ini ditengarai akibat faktor dormansi kontaminan eksternal maupun internal pada eksplan. Sterilisasi 3 yaitu sterilisasi berulang dengan masa inkubasi selama 72 jam merupakan teknik terbaik untuk eksplan ramin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan beserta staf atas segala sarana dan prasarana, demikian pula penghargaan kepada Asia Pulp and Paper serta staf atas bantuan finansial maupun material yang telah diberikan selama penelitian. Ucapan terima kasih kami sampaikan pula kepada Endin Izudin, Suprihati, Arif Setiawan dan Rudi Hartono atas segala bantuan teknis yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, T., Hafeez-Ur-Rahman, Ahmed, C. M. S., & Laghari, M. H. (2003). Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF 677. *Pakistan Journal of Botany*, 35(3), 331–338.
- Cassells, A. C. (2016). Detection and Elimination of Microbial Endophytes and Prevention of Contamination in Plant Tissue Culture. In R. N. Trigiano & D. J. Gray (Eds.), *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology* (p. 608). CRC Press.
- Chern, A., Hosokawa, Z., Cherubini, C., & Cline, M. G. (1993). Effects of Node Position on Lateral Bud Outgrowth in the Decapitated Shoot of *Ipomoea nil*. *The Ohio Journal of Science*, 93(1), 11–13.
- Cobrado, J., & Fernandez, A. (2016). Common Fungi Contamination Affecting Tissue-cultured Abaca (*Musa textiles* Nee) during Initial Stage of Micropropagation. *Asian Research Journal of Agriculture*, 1(2), 1–7. <https://doi.org/10.9734/ARJA/2016/28353>
- Da Silva, J. A. T., Winarto, B., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Zeng, S. (2016). Tissue disinfection for preparation of *Dendrobium* in vitro culture. *Folia Horticulturae*, 28(1), 57–75. <https://doi.org/10.1515/fhort-2016-0008>
- Dworkin, J., & Shah, I. M. (2010). Exit from dormancy in microbial organisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 890–896.
- Elbasheer, Y. H. A., & Osman, E. E. (2017). Effective and economical explants surface sterilization protocol for microbial contamination of field grown explants in vitro cultures of some forest trees; *Acacia*

- senegal as a model. *Basic Research Journal of Microbiology*, 4(2), 12–17. Retrieved from <http://basicresearchjournals.org/microbiology/abstract/Elbadri and Yahia.html>
- Hermayani, N., Retnoningsih, A., & Rahayu, E. S. (2016). International Conference on Recent Trends in Physics 2016 (ICRTP2016). *Journal of Physics: Conference Series*, 755, 11001. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/755/1/011001>
- Jones, S. E., & Lennon, J. T. (2010). Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(13), 5881–5886. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912765107>
- Kusuma, R., Kustiawan, W., & Ruchaemi, A. (2016). Sterilization Method For In Vitro Propagation Explant Embryo Of Durio Kutejensis (Hassk .) & Becc From Kalimantan. *International Journal of Scientific & Technology Research*, 5(10), 1–6.
- Leifert, C., & Waites, W. M. (1994). Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control points. In P. J. Lumsden, J. R. Nicholas, & W. J. Davies (Eds.), *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture* (1st ed.). Netherlands: Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-011-0790-7_42
- Madhurama, G., Sonam, D., Gupta, U. P., & Kharwar, R. N. (2014). No Title. *African Journal of Microbiology Research*, 8(2), 184–191.
- Mng'omba, S. A., Sileshi, G., du Toit, E. S., & K., A. F. (2012). Efficacy and Utilization of Fungicides and Other Antibiotics for Aseptic Plant Cultures. In D. Dhanasekaran (Ed.), *Fungicides for Pland and Animal Diseases* (pp. 245–254). InTech Europe. <https://doi.org/10.5772/1130>
- Ndakidemi, C. F., Mneney, E., & Ndakidemi, P. A. (2013). Development of Sanitation Protocol for Leaf Explants of B . huillensis for in Vitro Culture, 2013(December), 2425–2430.
- Odutayo, O. I., Amusa, N. A., Okutade, O. O., & Ogunsanwo, Y. R. (2007). Determination of the sources of microbial contaminants of cultured plant tissues. *Plant Pathology Journal*, 6(1), 77–81.
- Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol.*, 57, 369–94.
- Webster, S. A., Mitchell, S. A., & Ahmad, M. H. (2003). A novel surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown medicinal explants intended for in vitro culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 1–8. Retrieved from <http://www.kitchenculturekit.com/surfaceSterilizationMitchell2003.pdf>
- Wood, T. K., Knabel, S. J., & Kwan, W. (2013). Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7116–7121. <https://doi.org/10.1128/AEM.02636-13>
- Zin, N. M., Sarmin, N. I., Ghadin, N., Basri, D. F., & Sidik, N. M. (2015). *Antimicrobials Synthetic and Natural Compounds*. (D. Dhanasekaran, N. Thajuddin, & A. Panneerselvam, Eds.). CRC Press. Retrieved from <https://www.crcpress.com/Antimicrobials-Synthetic-and-Natural-Compounds/Dhanasekaran-Thajuddin-Panneerselvam/p/book/9781498715621#googlePreviewContainer>