



Optimasi Sterilisasi Eksplan Biji Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Menggunakan Natrium Hipoklorit Secara *In vitro*

^{1*}Fauziyah Harahap, ²Elita Asri, ³Ashar Hasairin, ⁴Syahmi Edi, ⁵Cicik Suriani, ⁶Abdul Hakim Daulae, ⁷Nurul Huda Panggabean

^{1,3,4,5,6,7}Program Studi Pendidikan Biologi, Pasca Sarjana, Universitas Negeri Medan, Medan, Indonesia

²Mahasiswa Program Studi Pendidikan Biologi, Pasca Sarjana, Universitas Negeri Medan, Medan, Indonesia

*Corresponding Author e-mail: fauziyahharahap@unimed.ac.id

Received: April 2025; Revised: May 2025; Accepted: June 2025; Published: June 2025

Abstrak: Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh konsentrasi NaOCl dan waktu perendaman terhadap tingkat kontaminasi dan viabilitas eksplan biji manggis secara *in vitro*, serta menentukan kombinasi perlakuan sterilisasi yang optimal. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan YAHDl, Medan, Sumatera Utara. Metode yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan satu faktor perlakuan berupa kombinasi konsentrasi NaOCl dan waktu perendaman. Tiga kombinasi diuji: kombinasi pertama NaOCl 15% dan 10% selama 5 menit, kombinasi kedua NaOCl 20% dan 15% selama 15 menit, dan kombinasi ketiga NaOCl 30% dan 20% selama 25 menit. Setiap perlakuan diikuti dengan pembilasan tiga kali menggunakan akuades steril. Pengamatan dilakukan selama 12 MST. Analisis data menggunakan ANOVA dan uji lanjut Games-Howell untuk membandingkan perbedaan antar perlakuan, sementara sumber kontaminasi dianalisis secara deskriptif kualitatif. Hasil menunjukkan kombinasi pertama paling rendah efektivitasnya, kombinasi kedua lebih baik namun belum maksimal, dan kombinasi ketiga paling efektif menunda kontaminasi dengan tingkat eksplan hidup 86,1%. Kombinasi ketiga juga memberikan penundaan kontaminasi terlama. Sumber kontaminasi utama adalah jamur dan bakteri, menegaskan pentingnya disinfektan efektif. Kombinasi ketiga berpotensi menjadi protokol sterilisasi awal untuk eksplan biji manggis, khususnya bahan tanaman dengan endokarp keras dan mudah terkontaminasi.

Kata Kunci: NaOCl; sterilisasi; kontaminasi; *Garcinia mangostana*; kultur jaringan

Abstract: This study evaluates the effects of NaOCl concentration and immersion time on contamination levels and viability of *in vitro* mangosteen seed explants, aiming to identify the optimal sterilization protocol. Conducted at YAHDl Tissue Culture Laboratory, Medan, Indonesia, a Randomized Complete Block Design tested three treatment combinations: (1) 15% and 10% NaOCl for 5 minutes, (2) 20% and 15% NaOCl for 15 minutes, and (3) 30% and 20% NaOCl for 25 minutes. After immersion, explants were rinsed three times with sterile distilled water. Observations spanned 12 MST, with data analyzed using ANOVA and Games-Howell post hoc tests; contamination sources were qualitatively described. Results showed the first combination had the lowest effectiveness, the second was better but suboptimal, while the third significantly delayed contamination and yielded the highest explant survival rate of 86.1%. The third treatment also prolonged the contamination-free period compared to others. Fungal and bacterial contaminants were predominant, highlighting the need for effective disinfectants against both. These findings indicate that the third combination is a promising sterilization protocol for mangosteen seed explants, especially for hard endocarp tissues prone to contamination.

Keywords: Sodium hypochlorite; sterilization; contamination; *Garcinia mangostana*; tissue culture

How to Cite: Harahap, F., Asri, E., Hasairin, A., Edi, S., Suriani, C., Daulae, A., & Panggabean, N. (2025). Optimasi Sterilisasi Eksplan Biji Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Menggunakan Natrium Hipoklorit Secara *In vitro*. *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*, 13(2), 1450-1468. doi:<https://doi.org/10.33394/bioscientist.v13i2.15281>



<https://doi.org/10.33394/bioscientist.v13i2.15281>

Copyright© 2025, Harahap et al

This is an open-access article under the CC-BY-SA License.



PENDAHULUAN

Manggis (*Garcinia mangostana* L.) merupakan komoditas buah tropis asli Indonesia yang memiliki prospek sangat baik untuk dikembangkan secara agribisnis. Dikenal dengan julukan Queen of Fruits, manggis sangat digemari karena rasa buahnya yang lezat serta kandungan senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antiinflamasi, antibakteri, dan penyembuh luka (Widiastuti *et al.*, 2013). Senyawa-senyawa ini membuat manggis tidak hanya diminati sebagai buah konsumsi segar, tetapi juga memiliki nilai tambah dalam bidang farmasi dan kesehatan. Meskipun

demikian, upaya budidaya tanaman manggis secara mandiri masih menghadapi berbagai kendala, terutama terkait dengan pertumbuhan yang sangat lambat. Tanaman manggis biasanya baru mulai berbuah setelah mencapai umur 12–15 tahun (Ashari & Sunarsih, 2006), yang menjadi tantangan besar dalam hal produktivitas dan efisiensi usaha tani. Pertumbuhan yang lambat ini erat kaitannya dengan sistem perakaran tanaman. Walaupun manggis memiliki akar tunggang yang panjang, akar tersebut hampir tidak memiliki percabangan dan bulu akar yang berfungsi sebagai penyerapan mineral dari tanah. Kondisi ini menyebabkan penyerapan nutrisi menjadi kurang optimal, sehingga mempengaruhi perkembangan tanaman secara keseluruhan. Selain itu, manggis juga memerlukan kondisi lingkungan yang spesifik seperti iklim tropis yang lembap dan tanah yang subur untuk tumbuh dengan baik. Faktor-faktor ini menjadikan budidaya manggis membutuhkan perhatian khusus, baik dari segi pemilihan bibit unggul maupun teknik budidaya yang tepat untuk mempercepat masa pertumbuhan dan meningkatkan hasil panen.

Selain itu, manggis hanya berbuah satu hingga dua kali dalam setahun, dengan setiap buah biasanya menghasilkan hanya satu atau dua biji besar yang layak dijadikan benih. Keterbatasan jumlah benih ini menjadi salah satu kendala utama dalam upaya perbanyakan tanaman secara konvensional. Selain itu, manggis memiliki sifat apomiktik, yaitu perkembangan embrio terjadi tanpa melalui proses penyerbukan dan berasal dari jaringan somatik seperti nukleus, integumen, atau dinding ovarium. Kondisi ini menyebabkan embrio yang terbentuk tidak melalui rekombinasi genetik, sehingga potensi variasi genetik pada bibit yang dihasilkan sangat rendah. Walaupun satu biji manggis dapat mengandung lebih dari satu embrio (*multiple embryos*), daya multiplikasi tanaman ini tetap rendah, sehingga jumlah bibit yang dapat diperoleh melalui metode biji terbatas.

Permasalahan pada budidaya manggis, khususnya terkait lambatnya pertumbuhan, keterbatasan jumlah benih, dan sifat apomiktik yang membatasi variasi genetik serta daya perbanyakan konvensional yang rendah, menunjukkan adanya gap signifikan antara kebutuhan produksi bibit secara massal dan metode yang ada saat ini. Kondisi ini menghambat pengembangan agribisnis manggis secara optimal dan berkelanjutan. Oleh karena itu, solusi inovatif sangat diperlukan untuk mengatasi kendala-kendala tersebut. Salah satu pendekatan yang menjanjikan adalah penerapan teknologi kultur jaringan tanaman (*plant tissue culture*) yang memungkinkan perbanyakan eksplan secara aseptik dalam kondisi *in vitro*. Teknik ini tidak hanya dapat mempercepat produksi bibit dalam jumlah besar, tetapi juga menjamin kemurnian genetik dan kesehatan tanaman yang dihasilkan. Kultur jaringan juga memungkinkan eksplorasi metode sterilisasi eksplan yang efektif, mengingat tingginya risiko kontaminasi pada bahan tanaman manggis yang memiliki endokarp keras dan sifat apomiktik. Pendekatan terbaru dalam penggunaan kombinasi konsentrasi NaOCl dan durasi perendaman sebagai disinfektan berpotensi meningkatkan efektivitas sterilisasi tanpa menimbulkan toksisitas yang merusak viabilitas jaringan. Dengan demikian, pengembangan protokol sterilisasi yang optimal menjadi salah satu fokus utama dalam penelitian ini untuk meningkatkan keberhasilan kultur jaringan manggis. Kombinasi teknologi kultur jaringan dengan optimasi proses sterilisasi ini diharapkan dapat menjawab gap dalam produksi bibit manggis, mempercepat masa pertumbuhan, dan meningkatkan produktivitas agribisnis manggis secara signifikan.

Sebagai solusi, teknik kultur jaringan tanaman telah banyak diterapkan karena memungkinkan perbanyakan tanaman dalam jumlah besar, lebih cepat, dan bersifat bebas patogen. Teknik ini dapat dimodifikasi sesuai kebutuhan spesifik tanaman dan

dilakukan dalam kondisi aseptik (Apriliyani & Wahidah, 2021; Pratiwi *et al.*, 2020). Namun, dalam praktiknya, teknik kultur jaringan manggis kerap mengalami kegagalan yang disebabkan oleh kontaminasi pada eksplan maupun media tanam. Kontaminan utama yang sering dijumpai adalah bakteri dan jamur yang dapat menyebabkan nekrosis serta kematian eksplan, sehingga menurunkan tingkat keberhasilan kultur.

Untuk mengatasi masalah kontaminasi, proses sterilisasi permukaan eksplan menjadi tahap krusial dalam teknik kultur *in vitro* (Shofiyani *et al.*, 2019). Sterilisasi bertujuan untuk membunuh mikroorganisme seperti bakteri, virus, jamur, dan khamir yang dapat bersaing dalam menyerap nutrisi dari media. Efektivitas sterilisasi sangat bergantung pada jenis bahan sterilan yang digunakan serta durasi perendaman yang tepat, karena larutan sterilan umumnya bersifat toksik terhadap jaringan tanaman jika tidak digunakan secara proporsional (Natasha & Restiani, 2019).

Beberapa studi sebelumnya menunjukkan variasi efektivitas dari berbagai kombinasi sterilisasi. Habibah *et al.* (2013) menjelaskan bahwa sterilisasi dapat dilakukan secara fisik (misalnya melalui suhu, tekanan, radiasi, atau penyaringan) maupun secara kimia menggunakan senyawa seperti fenol, alkohol, klorin, dan natrium hipoklorit (NaOCl). Yuliana (2018) menemukan bahwa H₂O₂ mampu menghasilkan kalus tanaman sirsak dengan tingkat kontaminasi dan browning paling rendah. Lutfiyani (2018) melaporkan tingkat kontaminasi 0% pada daun kemiri menggunakan NaOCl 1% selama 2,5 menit. Fauzan *et al.* (2017) menunjukkan bahwa penggunaan HgCl₂ 300 mg/L pada tanaman jati dapat menghasilkan 85% kultur aseptik.

Namun, hingga kini belum banyak kajian spesifik mengenai optimasi konsentrasi dan durasi perendaman larutan NaOCl yang paling efektif untuk sterilisasi eksplan biji manggis, terutama mengingat sifat endokarp biji yang keras dan mudah terkontaminasi. Kesenjangan inilah yang mendorong dilakukannya penelitian ini. Dengan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi larutan NaOCl dan waktu perendaman terhadap tingkat kontaminasi dan viabilitas eksplan, serta untuk menentukan kombinasi perlakuan yang paling optimal dalam sterilisasi eksplan biji manggis secara *in vitro*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi praktis dalam penyusunan protokol kultur jaringan manggis yang lebih efektif dan aplikatif bagi pengembangbiakan tanaman tropis bernilai ekonomi tinggi ini.

Meskipun berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengembangkan teknik sterilisasi pada tanaman, hingga kini belum ada studi yang secara komprehensif membandingkan pengaruh konsentrasi NaOCl dengan waktu perendaman terhadap tingkat kontaminasi pada eksplan biji manggis. Studi sebelumnya sebagian besar fokus pada penggunaan satu konsentrasi atau waktu tertentu tanpa melihat interaksi kedua faktor tersebut secara mendalam (Shofiyani *et al.*, 2020; Yuliana, 2018). Oleh karena itu, penting untuk melakukan penelitian yang dapat mengoptimalkan kedua variabel tersebut untuk memperoleh hasil sterilisasi yang lebih efektif. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam penyusunan protokol standar sterilisasi untuk tanaman manggis, yang dapat diaplikasikan baik untuk petani maupun industri pembibitan. Dengan adanya protokol yang lebih efektif, diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan perbanyakan tanaman manggis secara *in vitro*, mengurangi risiko kontaminasi, dan mempermudah proses produksi bibit yang bebas patogen (Apriliyani & Wahidah, 2021; Pratiwi *et al.*, 2020). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi pengaruh kombinasi konsentrasi NaOCl dan durasi perendaman terhadap tingkat kontaminasi serta viabilitas eksplan biji manggis, guna mengembangkan kombinasi sterilisasi yang optimal yang dapat digunakan dalam

perbanyak tanaman manggis secara *in vitro* dan memberikan solusi praktis bagi petani atau industri pembibitan manggis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh konsentrasi NaOCl dan waktu perendaman terhadap tingkat kontaminasi serta viabilitas eksplan biji manggis dalam kultur jaringan secara *in vitro*. Secara khusus, penelitian ini mengkaji efektivitas kombinasi perlakuan sterilisasi yang meliputi variasi konsentrasi larutan NaOCl dan durasi perendaman dalam menekan kontaminasi mikroba sekaligus mempertahankan tingkat kelangsungan hidup eksplan. Indikator utama yang diamati meliputi waktu munculnya kontaminasi (dalam hari) sebagai parameter efektivitas sterilisasi, serta persentase eksplan hidup sebagai ukuran viabilitas jaringan tanaman.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan YAHD I Medan selama periode Maret hingga September 2024. Fokus utama penelitian adalah penggunaan eksplan biji manggis sebagai material tanaman untuk kultur jaringan *in vitro*. Eksplan biji dipilih karena merupakan sumber utama perbanyak tanaman manggis secara aseptik yang memungkinkan pengembangan bibit dalam jumlah besar dengan kualitas genetik terjaga. Dalam penelitian ini, digunakan peralatan standar kultur jaringan yang meliputi laminar air flow cabinet untuk menjaga kondisi aseptik, autoklaf untuk sterilisasi media dan peralatan, serta alat-alat laboratorium pendukung seperti mikroskop dan inkubator. Media kultur yang digunakan adalah media Murashige and Skoog (MS) yang ditambah dengan bahan pengatur tumbuh berupa Benzylaminopurine (BAP) pada berbagai konsentrasi yaitu 0 ppm, 2 ppm, 4 ppm, dan 6 ppm. Variasi konsentrasi BAP ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh hormon sitokinin terhadap pertumbuhan dan viabilitas eksplan. Selain media dan alat kultur, bahan-bahan pendukung lainnya juga digunakan dalam proses sterilisasi dan perlakuan eksplan, seperti alkohol 70% dan 96% untuk disinfeksi awal, akuades steril sebagai media pembilasan, deterjen untuk pembersihan, serta bakterisida dan fungisida untuk mengendalikan kontaminasi mikroba. Natrium hipoklorit (NaOCl) dipakai sebagai agen disinfektan utama dengan berbagai konsentrasi dan waktu perendaman sebagai variabel perlakuan. Selain itu, antibiotik amoksisilin digunakan untuk menekan pertumbuhan bakteri selama kultur jaringan. Kombinasi alat dan bahan ini mendukung terciptanya kondisi optimal untuk perbanyak eksplan manggis secara aseptik dan efektif.

Dalam teknik kultur jaringan tanaman, keberhasilan pertumbuhan eksplan sangat bergantung pada efektivitas proses sterilisasi. Kontaminasi oleh mikroorganisme, terutama bakteri dan jamur, merupakan kendala utama yang sering menyebabkan kegagalan kultur jaringan. Mikroorganisme ini dapat berkembang dengan cepat di media kultur, menghambat pertumbuhan eksplan, bahkan menyebabkan kematian jaringan. Oleh karena itu, pemilihan kombinasi sterilisasi yang tepat sangat penting untuk mengoptimalkan kondisi aseptik, meminimalisir risiko kontaminasi, dan menghindari kerusakan jaringan akibat efek fitotoksik dari bahan kimia disinfektan. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan tiga kombinasi sterilisasi biji manggis dengan variasi konsentrasi dan durasi perendaman larutan natrium hipoklorit (NaOCl), sekaligus mengevaluasi dampaknya terhadap waktu munculnya kontaminasi pada media kultur. Salah satu metode sederhana untuk mengidentifikasi sumber kontaminasi adalah dengan mengamati morfologi koloni mikroorganisme yang tumbuh di atas media kultur. Untuk jamur, karakteristik koloni seperti bentuk, warna, tekstur, dan pola pertumbuhan pada media seperti Potato Dextrose Agar (PDA) digunakan untuk membedakan spesiesnya (Sutanto *et al.*, 2018). Sedangkan untuk bakteri, identifikasi didasarkan pada morfologi sel, termasuk bentuk (bulat, batang, spiral),

ukuran dan warna koloni pada media agar nutrisi atau agar MacConkey (Rahman *et al.*, 2016). Dengan pendekatan ini, penelitian dapat memberikan gambaran jelas mengenai efektivitas sterilisasi dan jenis kontaminan yang paling sering muncul, sehingga menjadi dasar pengembangan protokol sterilisasi yang optimal.

Kombinasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan satu faktor perlakuan, yaitu kombinasi konsentrasi larutan NaOCl dan waktu perendaman. Perlakuan terdiri dari tiga kombinasi, yaitu: kombinasi pertama, eksplan direndam terlebih dahulu dalam larutan NaOCl 15% selama 5 menit, kemudian dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan NaOCl 10% selama 5 menit; kombinasi kedua, eksplan direndam terlebih dahulu dalam larutan NaOCl 20% selama 15 menit, kemudian dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan NaOCl 15% selama 15 menit; kombinasi ketiga, eksplan direndam terlebih dahulu dalam larutan NaOCl 30% selama 25 menit, kemudian dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan NaOCl 20% selama 25 menit. Setelah direndam, eksplan biji manggis akan dibilas dengan menggunakan akuades steril sebanyak tiga kali. Setiap perlakuan terdiri dari 36 unit kultur yang diuji pada waktu yang berbeda untuk mengamati perbedaan hasil pada setiap periode pengamatan. Pemilihan ketiga kombinasi didasarkan pada eksperimen pendahuluan yang dilakukan dalam rangka menentukan kombinasi konsentrasi dan waktu yang paling efektif.

Pengamatan dilakukan sejak 1 MST setelah inisiasi dilakukan hingga 12 MST. Parameter pengamatan pada penelitian ini yaitu waktu pertama munculnya kontaminasi, persentase tanaman hidup, dan sumber kontaminasi. Untuk mengetahui adanya pengaruh yang diberikan oleh ketiga kombinasi sterilisasi terhadap waktu munculnya kontaminasi dan persentase eksplan hidup, analisis data dilakukan menggunakan uji statistik ANOVA satu arah pada taraf signifikansi 5% ($\alpha = 0,05$) dengan bantuan aplikasi SPSS versi 26.0. Sebelum dilakukan ANOVA, terlebih dahulu dilakukan uji prasyarat untuk memastikan validitas data, yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data terdistribusi secara normal, menggunakan uji Shapiro-Wilk atau Kolmogorov-Smirnov tergantung pada jumlah sampel. Uji homogenitas dilakukan menggunakan uji Levene untuk memastikan bahwa varians antar kelompok perlakuan adalah homogen. Apabila hasil uji menunjukkan bahwa data tidak memenuhi asumsi homogenitas, maka dilanjutkan dengan uji ANOVA yang tidak mengasumsikan homogenitas varians, yaitu uji Games-Howell sebagai uji lanjut untuk mengetahui signifikansi perbedaan antar perlakuan secara spesifik. Uji Games-Howell digunakan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan secara lebih spesifik setelah ANOVA menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan. Sumber kontaminasi dicatat untuk mengidentifikasi jenis mikroorganisme yang menyebabkan kontaminasi pada eksplan. Kontaminasi biasanya berasal dari bakteri, jamur, atau khamir yang berkembang pada media kultur setelah perendaman. Sumber kontaminasi dianalisis dengan menggunakan analisis deskriptif kualitatif berdasarkan morfologi dan jenis mikroorganisme yang tampak pada eksplan.

Langkah pertama yang dilakukan pada sterilisasi eksplan biji manggis adalah dengan mengupas kulit manggis lalu memisahkan biji manggis dari daging buahnya. Selanjutnya biji manggis yang telah dipisahkan dari daging buah disikat dengan menggunakan detergen untuk memastikan biji manggis yang akan dijadikan eksplan benar-benar bersih. Selanjutnya biji yang telah disikat bersih, dibilas dengan menggunakan air mengalir. Langkah berikutnya, biji-biji tersebut direndam ke dalam larutan detergen selama 20 menit lalu membilasnya dengan akuades steril dua kali. Pada tahap selanjutnya, biji-biji tersebut dimasukkan ke dalam larutan fungisida dan bakterisida selama dua jam dan dibilas menggunakan akuades steril dua kali. Setelah

memastikan seluruh biji sudah bersih, biji tersebut kemudian diberikan perlakuan sesuai dengan rancangan yang terdapat pada Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 Rancangan perlakuan sterilisasi eksplan biji manggis

Rancangan*	Jumlah Eksplan	Konsentrasi NaOCl	Waktu Perendaman	Keterangan
Kombinasi I	36 botol	15% dan 10%	5 menit	Setiap perendaman
Kombinasi II	36 botol	20% dan 15%	15 menit	akan dibilas dengan
Kombinasi III	36 botol	30% dan 20%	25 menit	akuades steril tiga kali

*sterilisasi dilakukan pada waktu yang berbeda

HASIL DAN PEMBAHASAN

Waktu Muncul Kontaminasi

Tabel di bawah ini menunjukkan waktu munculnya kontaminasi setelah dilakukan sterilisasi. Sterilisasi dilakukan dalam rentang waktu yang berbeda. Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan terhadap ketiga perlakuan, kontaminasi pada perlakuan dengan kombinasi pertama muncul pada 1 MST setelah inisiasi dilakukan. Pada perlakuan dengan kombinasi kedua, kontaminasi muncul pertama kali di awal minggu pertama setelah proses penanaman. Sementara pada perlakuan dengan kombinasi ketiga, kontaminasi muncul pertama kali pada 10 MST.

Tabel 2. Hasil uji ANOVA pengaruh sterilisasi eksplan biji manggis terhadap waktu kontaminasi

	Jumlah Kuadrat	df	Rerata Kuadrat	F	Sig.
Antar Kelompok	1568.389	2	784.194	150.638	.000
Dalam Kelompok	546.611	105	5.206		
Jumlah	2115.000	107			

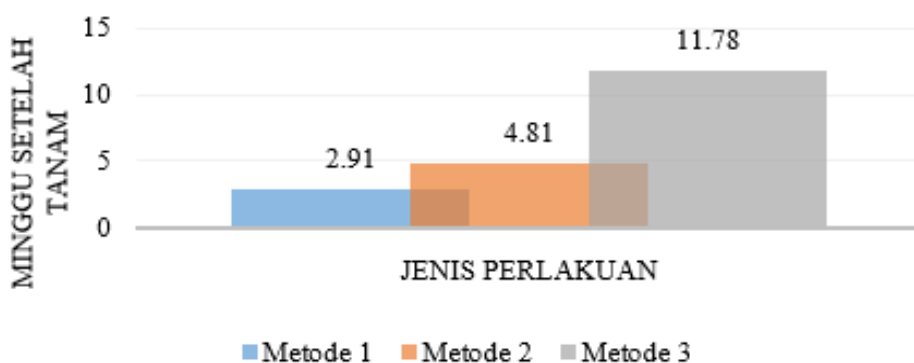
Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa perbedaan antara ketiga kombinasi sterilisasi signifikan secara statistik. Hal tersebut dapat dilihat dari nilai $F = 150.638$ dan $p\text{-value} = 0.000$ ($p < 0.05$). Hal tersebut berarti bahwa setidaknya terdapat satu kombinasi yang secara nyata berbeda efektivitasnya dalam menunda terjadinya kontaminasi pada eksplan. Karena terdapat perbedaan di antara ketiga kombinasi yang dilakukan, maka selanjutnya dilakukan Post-Hoc Test Games-Howell. Hasil dari uji lanjut tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil *post hoc test* games-howell pengaruh sterilisasi terhadap waktu munculnya kontaminasi

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Perbedaan Rerata (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Interval Kepercayaan	
					Batas Bawah	Batas Atas
Kombinasi 1	Kombinasi 2	-1.889*	.651	.014	-3.45	-.33
	Kombinasi 3	-8.861*	.413	.000	-9.87	-7.85
Kombinasi 2	Kombinasi 1	1.889*	.651	.014	.33	3.45
	Kombinasi 3	-6.972*	.522	.000	-8.25	-5.70
Kombinasi 3	Kombinasi 1	8.861*	.413	.000	7.85	9.87
	Kombinasi 2	6.972*	.522	.000	5.70	8.25

*Perbedaan rata-rata signifikan pada tingkat 0,05

Perlakuan dengan kombinasi ketiga secara signifikan memiliki pengaruh paling besar dalam menunda terjadinya kontaminasi pada sterilisasi eksplan biji manggis daripada perlakuan dengan menggunakan kombinasi pertama dan kombinasi kedua. Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa peningkatan konsentrasi dan lamanya waktu perendaman larutan NaOCl berbanding lurus dengan keberhasilan sterilisasi eksplan biji manggis. Hasil pengamatan yang dilakukan pada kombinasi pertama yang diberikan pada eksplan biji manggis menunjukkan bahwa rata-rata kontaminasi muncul pada 2,92 MST. Pada kombinasi kedua, rata-rata kontaminasi muncul pada 4,81 MST. Sementara pada kombinasi ketiga, rata-rata kontaminasi terjadi pada 11,78 MST. Untuk grafik rata-rata waktu munculnya kontaminasi dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik Rata-Rata Waktu Munculnya Kontaminasi

Pengamatan terhadap waktu munculnya kontaminasi dilakukan sejak satu minggu setelah tanam. Rancangan kombinasi pertama dilakukan pada tanggal 30 Maret 2024 dengan menggunakan 36 eksplan biji manggis yang ditanam pada media kultur yang telah disiapkan. Rancangan ini menggunakan sterilan NaOCl 15% dan 10% dengan waktu perendaman masing-masing 5 menit. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, kontaminasi muncul pertama kali pada tanggal 2 April 2024, pada hari ketiga setelah inisiasi dilakukan. Kontaminasi terus berlanjut hingga menyisakan 2 botol eksplan yang bertahan hidup hingga 9 MST. Pada umumnya kontaminasi yang terjadi pada kombinasi ini disebabkan oleh kontaminasi jamur. Kombinasi kedua dilakukan pada tanggal 19 April 2024 dengan menggunakan 36 eksplan biji manggis yang ditanam pada media kultur yang telah disiapkan. Kombinasi kedua menggunakan sterilan NaOCl 20% dan 15% dengan waktu perendaman 15 menit. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, kontaminasi muncul pertama kali pada tanggal 23 April 2024, 3 hari setelah tanam (minggu pertama). Kontaminasi terus terjadi hingga menyisakan 7 botol eksplan yang bertahan sampai pengamatan pada 9 MST, yaitu pada tanggal 21 Juni 2024. Kombinasi ketiga dilakukan pada tanggal 3 Juli 2024 dengan menggunakan 36 eksplan biji manggis yang ditanam pada media kultur yang telah disiapkan. Kombinasi ketiga menggunakan sterilan NaOCl 30% dan 20% dengan waktu perendaman 25 menit. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, kontaminasi muncul pertama kali pada 10 MST, yaitu pada tanggal 12 September 2024. Kontaminasi terus berlanjut hingga minggu terakhir pengamatan, yaitu minggu ke – 12, pada tanggal 21 September 2024.

Peningkatan konsentrasi dan durasi perendaman NaOCl terbukti meningkatkan efektivitas sterilisasi eksplan biji manggis. Kombinasi 3, yang menggunakan konsentrasi tertinggi dan waktu perendaman terlama, memberikan hasil optimal dalam menunda munculnya kontaminasi hingga hari ke-12. Namun, efektivitas ini berpotensi disertai risiko fitotoksik, yang dapat menghambat viabilitas eksplan. Berdasarkan hasil

pengamatan selama 12 MST, kombinasi ketiga terbukti paling efektif dalam menunda munculnya kontaminasi, yang umumnya baru terjadi setelah minggu kedua. Sebaliknya, pada kombinasi pertama dan kedua, kontaminasi mulai tampak hanya beberapa hari setelah tanam. Hal ini konsisten dengan laporan Sulikah *et al.* (2022), yang menyatakan bahwa kontaminasi bakteri umumnya terjadi pada minggu pertama, sedangkan kontaminasi jamur cenderung muncul satu hingga dua minggu setelah tanam. Kombinasi ketiga menggunakan kombinasi NaOCl 30% dan 20% dengan waktu perendaman 25 menit, yang memberikan efek disinfeksi lebih kuat terhadap mikroorganisme kontaminan. Efektivitas tersebut didukung pula oleh Habibah *et al.* (2013), yang menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dan lama waktu perendaman bahan sterilan, semakin besar kemampuannya dalam mengeliminasi mikroba. Menariknya, meskipun sterilan yang digunakan tergolong tinggi, kombinasi ketiga tetap menghasilkan tingkat viabilitas eksplan paling tinggi, yakni sebesar 86,1%. Sebaliknya, kombinasi pertama dan kedua, yang menggunakan konsentrasi dan waktu perendaman lebih rendah, justru tidak menghasilkan eksplan hidup (0%). Hal ini menunjukkan bahwa meskipun larutan NaOCl bersifat toksik pada konsentrasi tinggi (Natasha & Restiani, 2019), dalam konteks eksplan biji manggis yang memiliki endokarp keras, perlakuan tersebut masih ditoleransi oleh jaringan dan efektif dalam mencegah kontaminasi.

Kendati demikian, diperlukan diskusi kritis mengenai kemungkinan adanya kompromi antara efektivitas sterilisasi dan kesehatan jaringan tanaman. Konsentrasi sterilan yang tinggi dan durasi perendaman yang lama memang dapat menurunkan tingkat kontaminasi secara signifikan, namun di sisi lain berpotensi merusak struktur sel eksplan, terutama pada jaringan yang lebih lunak atau sensitif. Menurut George *et al.* (2008), penggunaan senyawa hipoklorit dengan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan menghambat pembelahan sel awal dalam proses kultur. Oleh karena itu, efektivitas suatu kombinasi sterilisasi tidak dapat hanya dinilai dari minimnya kontaminasi, tetapi juga dari kemampuannya menjaga viabilitas dan potensi regeneratif jaringan dalam jangka panjang. Dalam konteks ini, keberhasilan kombinasi ketiga mengindikasikan bahwa eksplan biji manggis, khususnya bagian embrio di dalam endokarp, memiliki toleransi terhadap perlakuan disinfektan yang relatif tinggi. Meskipun demikian, perlu dilakukan evaluasi lanjutan untuk menilai apakah perlakuan ini berdampak negatif terhadap tahap-tahap pertumbuhan berikutnya, seperti pembentukan kalus, tunas, atau akar. Dengan kata lain, meskipun kombinasi ini berhasil mengatasi kontaminasi awal, belum tentu menjamin keberhasilan regenerasi secara keseluruhan. Maka dari itu, keberlanjutan viabilitas dan morfogenesis eksplan perlu menjadi bagian dari parameter evaluasi dalam studi lanjutan.

Menurut Cassells (2012), disinfektan dengan konsentrasi tinggi dapat menyebabkan kerusakan fisiologis pada jaringan tanaman seperti browning (menghitamnya jaringan akibat oksidasi fenol), nekrosis, atau bahkan kematian sel, yang secara langsung berdampak pada rendahnya keberhasilan kultur *in vitro*. Oleh karena itu, meskipun perlakuan pada kombinasi ketiga, yakni sterilisasi menggunakan konsentrasi NaOCl 30% dan 20% secara berurutan selama 25 menit, menunjukkan efektivitas tertinggi dalam menekan kontaminasi, yang ditunjukkan oleh penundaan kemunculan kontaminan hingga 12 MST, tingkat kontaminasi paling rendah, dan persentase eksplan hidup tertinggi sebesar 86,1%, perlu dilakukan pengujian lanjutan untuk memastikan bahwa jaringan tanaman tetap mampu menjalani proses regenerasi, seperti pembentukan kalus, tunas, dan akar, setelah perlakuan sterilisasi tersebut.

Peningkatan konsentrasi dan durasi perendaman NaOCl terbukti meningkatkan efektivitas sterilisasi eksplan biji manggis. Kombinasi 3, yang menggunakan konsentrasi tertinggi (NaOCl 30% dan 20%) dan waktu perendaman terlama (25 menit), mampu menunda munculnya kontaminasi hingga hari ke-12, jauh lebih baik dibandingkan dua kombinasi lainnya. Namun, efektivitas ini berpotensi disertai risiko fitotoksik, yang tidak langsung terlihat dari tingkat viabilitas awal, tetapi bisa memengaruhi proses regenerasi lanjutan. Hal ini sejalan dengan temuan Rout *et al.* (2000), yang menyatakan bahwa fitotoksitas akibat sterilan sering kali tidak tampak dalam tahap awal tetapi dapat mengganggu organogenesis dan embriogenesis pada tahap berikutnya. Studi oleh Daud *et al.* (2012) juga menekankan pentingnya menyeimbangkan antara kemampuan disinfektan dalam mengeliminasi mikroorganisme dengan toleransi jaringan tanaman terhadap paparan kimia. Dalam beberapa kasus, meskipun eksplannya tampak hidup setelah sterilisasi, jaringan yang mengalami stres kimia berat memiliki kemampuan regeneratif yang rendah atau menunjukkan kelainan morfologis. Oleh karena itu, meskipun kombinasi 3 menunjukkan hasil paling optimal dalam menekan kontaminasi dan mempertahankan viabilitas awal, penggunaannya sebagai protokol standar perlu divalidasi lebih lanjut dengan mengamati perkembangan eksplan dalam jangka waktu lebih panjang, termasuk pada tahap morfogenesis dan multiplikasi. Studi oleh Binte *et al.*, (2022) juga menunjukkan bahwa kombinasi sterilisasi yang optimal tidak hanya mempertimbangkan efektivitas menekan kontaminasi, tetapi juga harus mempertahankan kondisi fisiologis jaringan tanaman agar tetap aktif secara metabolik. Seperti dinyatakan oleh George *et al.* (2008), keberhasilan kultur jaringan tidak hanya bergantung pada ketiadaan kontaminasi, tetapi juga pada kemampuan jaringan untuk merespon media secara fisiologis. Dalam konteks ini, Kombinasi 2 dapat dianggap sebagai kompromi antara efektivitas dan potensi kerusakan jaringan.

Wulandari (2014) melakukan penelitian untuk menguji efektivitas NaOCl (1%, 2%, dan 3%) dengan waktu perendaman (2,5, 5, 7,5 menit) pada sterilisasi eksplan tunas aksiler *Eucalyptus pellita*. Hasil terbaik diperoleh pada perlakuan 1% NaOCl selama 7,5 menit, dengan kemunculan kontaminasi rata-rata pada hari ke-19,5 setelah inokulasi. Namun, konsentrasi 3% dengan durasi perendaman 5–7,5 menit menunjukkan efek negatif terhadap pertumbuhan tunas eksplan. Faizal dan Nurmala (2021) menggunakan NaOCl sebagai bahan sterilisasi pada kultur jaringan aksenik ramin (*Gonystylus bancanus*). Hasilnya menyatakan bahwa penggunaan NaOCl yang dikombinasikan dengan alkohol mampu menurunkan tingkat kontaminasi secara signifikan. Parven & Syah (2019) menguji pengaruh penggunaan NaOCl terhadap tingkat kontaminasi dan kemampuan perkecambahan *Ficus religiosa*. Hasil penelitian mereka menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi NaOCl dan durasi perendaman secara umum dapat menurunkan tingkat kontaminasi. Namun, penggunaan konsentrasi tinggi dan waktu perendaman yang terlalu lama berpotensi merusak viabilitas jaringan, menghambat perkecambahan, dan memperlambat proses regenerasi. Oleh karena itu, mereka merekomendasikan penggunaan konsentrasi dan durasi perendaman terendah yang masih efektif secara mikrobiologis untuk meminimalkan risiko toksisitas. Temuan ini sejalan dengan hasil penelitian Wahyudi dan Hidayat (2022), yang menunjukkan bahwa kombinasi bahan sterilan dan waktu perendaman yang tepat dapat secara signifikan menurunkan tingkat kontaminasi, meskipun penelitian tersebut tidak menjelaskan secara spesifik waktu kemunculan kontaminasi.

Penelitian serupa pada biji manggis menunjukkan tantangan yang serupa, di mana biji manggis memiliki struktur yang keras dan sedikit memungkinkan untuk

melakukan perbanyakan secara konvensional. Proses sterilisasi yang efektif penting dalam upaya perbanyakan biji manggis secara kultur jaringan, di mana sterilisasi yang optimal akan mengurangi kontaminasi mikroorganisme seperti jamur dan bakteri tanpa merusak jaringan tanaman yang memiliki daya regenerasi rendah. Seperti yang ditemukan pada penelitian ini, meskipun kombinasi konsentrasi NaOCl tertinggi dan durasi perendaman terlama terbukti efektif dalam mengurangi kontaminasi, perlu dicatat bahwa hal ini dapat berisiko pada viabilitas jaringan, sehingga penting untuk mempertimbangkan keseimbangan antara efektivitas sterilisasi dan kelangsungan hidup eksplan manggis. Kontaminasi pada eksplan kultur jaringan dapat berasal dari berbagai sumber, baik eksternal maupun internal. Sumber eksternal meliputi mikroorganisme yang masuk ke dalam media kultur, seperti bakteri, jamur, dan semut, serta dari peralatan, botol kultur, dan lingkungan kerja yang kurang steril. Sementara itu, kontaminasi internal yang disebabkan oleh mikroorganisme yang sudah ada dalam jaringan eksplan sangat sulit diatasi, karena teknik sterilisasi permukaan hanya menghilangkan kontaminasi luar dan tidak dapat membunuh kontaminan yang terdapat di dalam jaringan eksplan itu sendiri. Eksplan yang sudah terkontaminasi tidak dapat disterilisasi ulang, sehingga menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan viabilitas eksplan, yang pada akhirnya dapat mengakibatkan kematian eksplan akibat kekurangan nutrisi yang dibutuhkan untuk regenerasi.

Persentase Eksplan Hidup

Tabel di bawah ini menunjukkan hasil uji ANOVA yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi yang berbeda terhadap persentase eksplan biji manggis yang hidup selama dua belas minggu pengamatan. Berdasarkan hasil uji ANOVA diketahui bahwa perlakuan tiga kombinasi sterilisasi berbeda memberikan pengaruh yang signifikan terhadap persentase eksplan biji manggis yang dapat bertahan hidup. Hasil uji ANOVA dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji ANOVA pengaruh sterilisasi terhadap persentase eksplan hidup

	Jumlah Kuadrat	df	Rerata Kuadrat	F	Sig.
Antar Kelompok	4693.722	2	2346.861	28.088	.000
Dalam Kelompok	2757.250	33	83.553		
Jumlah	7450.972	35			

Berdasarkan hasil uji ANOVA tersebut, diketahui bahwa ketiga kombinasi sterilisasi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap persentase eksplan biji manggis yang dapat bertahan hidup, dengan nilai F sebesar 28,088 dan nilai signifikansi (p) sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Hasil ini mengindikasikan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara setidaknya dua kelompok perlakuan (Field, 2013). Untuk mengidentifikasi perbedaan spesifik antar pasangan perlakuan, dilakukan uji lanjut Games-Howell, yang direkomendasikan pada kondisi varians yang tidak homogen (Howell, 2012). Hasil uji lanjut Games-Howell dapat dilihat pada Tabel 5 berikut.

Tabel 5. Hasil uji lanjut *games-howell* pengaruh sterilisasi terhadap persentase eksplan hidup

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Perbedaan Rerata (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Interval Kepercayaan	
					Batas Bawah	Batas Atas
Kombinasi 1	Kombinasi 2	-5.2500	4.5465	.492	-16.674	6.174
	Kombinasi 3	-26.4167*	3.1546	.000	-34.883	-17.950
Kombinasi 2	Kombinasi 1	5.2500	4.5465	.492	-6.174	16.674
	Kombinasi 3	-21.1667*	3.3398	.000	-30.136	-12.197
Kombinasi 3	Kombinasi 1	26.4167*	3.1546	.000	17.950	34.883
	Kombinasi 2	21.1667*	3.3398	.000	12.197	30.136

*Perbedaan rata-rata signifikan pada tingkat 0,05.

Berdasarkan hasil uji lanjut, tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara Kombinasi 1 (perendaman NaOCl 15% dan 10% selama masing-masing 5 menit) dan Kombinasi 2 (NaOCl 20% dan 15% selama masing-masing 15 menit) dengan nilai p sebesar 0,492. Namun, perbedaan yang signifikan ditemukan antara Kombinasi 3 (NaOCl 30% dan 20% selama masing-masing 25 menit) dibandingkan dengan Kombinasi 1 dan Kombinasi 2, masing-masing dengan nilai $p < 0,001$. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi dan durasi perendaman NaOCl pada Kombinasi 3 secara signifikan meningkatkan viabilitas eksplan. Efektivitas Kombinasi 3 diduga berkaitan dengan kemampuannya dalam menekan mikroorganisme kontaminan secara optimal tanpa menyebabkan kerusakan fisiologis pada jaringan tanaman, sebagaimana dijelaskan oleh George *et al.*, (2008) dan Cassells (2012), yang menyatakan bahwa keberhasilan sterilisasi dalam kultur jaringan bergantung pada keseimbangan antara daya desinfektan dan toleransi jaringan tanaman terhadap bahan kimia yang digunakan. Dengan demikian, Kombinasi 3 dapat direkomendasikan sebagai perlakuan sterilisasi yang paling efektif dalam meningkatkan keberhasilan inisiasi eksplan biji manggis secara *in vitro*.

Persentase eksplan hidup merupakan parameter yang diukur untuk mengetahui kemampuan eksplan beradaptasi dalam media kultur. Pengamatan persentase eksplan dilakukan untuk melihat jumlah eksplan yang dapat bertahan dalam media yang telah disediakan. Tabel di bawah merupakan hasil rekapitulasi pengamatan eksplan hidup selama 12 MST.

Tabel 6. Persentase eksplan hidup setelah 12 MST

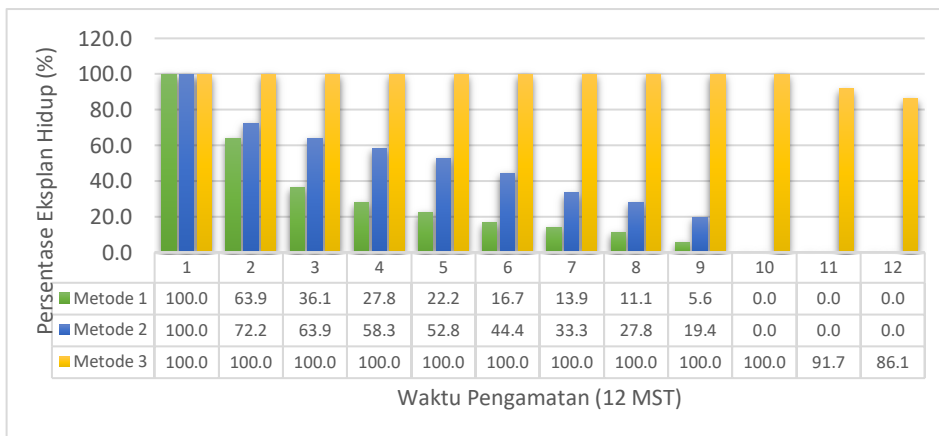
Minggu Ke	Perlakuan Sterilisasi*		
	Kombinasi 1	Kombinasi 2	Kombinasi 3
1	100.0	100.0	100.0
2	63.9	72.2	100.0
3	36.1	63.9	100.0
4	27.8	58.3	100.0
5	22.2	52.8	100.0
6	16.7	44.4	100.0
7	13.9	33.3	100.0
8	11.1	27.8	100.0
9	5.6	19.4	100.0
10	0.0	0.0	100.0

Minggu Ke	Perlakuan Sterilisasi*		
	Kombinasi 1	Kombinasi 2	Kombinasi 3
11	0.0	0.0	91.7
12	0.0	0.0	86.1

*kombinasi sterilisasi dilakukan pada waktu yang berbeda

Berdasarkan Tabel 6 di atas, diketahui bahwa sterilisasi dengan menggunakan Kombinasi I, menghasilkan 36,1% eksplan hidup setelah pengamatan 3 MST, kemudian setelah 6 MST menjadi 16,7%. Pada minggu ke – 9 berkurang lagi menjadi 5,6% dan pada akhir pengamatan di 12 MST, tidak ada lagi eksplan hidup yang tersisa. Pada percobaan dengan Kombinasi II, mampu menghasilkan 72% eksplan hidup setelah pengamatan 3 MST, kemudian setelah 6 MST menjadi 44,4%. Pada minggu ke – 9 berkurang lagi menjadi 19,4% dan pada akhir pengamatan di 12 MST, tidak ada lagi eksplan yang tersisa. Pada percobaan dengan Kombinasi III, mampu menghasilkan 100% eksplan hidup hingga minggu kesembilan setelah tanam. Namun, pada pengamatan yang dilakukan setelah 12 MST tersisa 86,1% eksplan yang dapat bertahan hidup.

Dari ketiga kombinasi di atas, dapat dilihat bahwa Kombinasi III mampu menghasilkan persentase eksplan hidup paling banyak setelah pengamatan 12 MST, yaitu 86,1%. Persentase eksplan hidup ditunjukkan melalui eksplan yang mampu bertahan hidup yang ditandai dengan daun berwarna hijau, tidak mengalami browning atau pencokelatan dan tidak mengalami kontaminasi. Gambar 2 merupakan grafik yang menggambarkan persentase eksplan hidup yang setelah mendapat perlakuan sterilisasi yang menggunakan tiga kombinasi sterilisasi yang berbeda.



Gambar 2. Grafik pengaruh sterilisasi terhadap persentase eksplan hidup

Premanath & Bhat (2011) melakukan sterilisasi eksplan Hibiscus rosa-sinensis. Dalam penelitian ini, eksplan internodal yang disterilisasi dengan larutan Clorox 10% selama 15 menit menunjukkan tingkat kontaminasi yang rendah dan hampir semua eksplan bertahan hidup. Namun, eksplan ujung tunas yang disterilisasi dengan Clorox 30% selama 10 menit tidak bertahan hidup. Perlakuan terbaik untuk eksplan ujung tunas adalah perendaman dalam Clorox 5% selama 40 menit, yang menghasilkan tingkat kelangsungan hidup yang lebih tinggi. Abebe & Feyyisa (2013) menggunakan NaOCl 1,5% selama 10 menit diikuti dengan etanol 70% selama 10 detik pada sterilisasi eksplan daun B. Huillensis menghasilkan tingkat kontaminasi yang rendah serta persentase eksplan hidup yang tinggi. Penambahan fungisida cefotaxime 0,03 mg/L dalam media kultur juga meningkatkan persentase eksplan yang bersih dan hidup. Namun, konsentrasi NaOCl yang terlalu tinggi dapat merusak jaringan tanaman

dan menurunkan viabilitas eksplan. Lase *et al.* (2023) mengevaluasi efektivitas berbagai konsentrasi NaOCl dan waktu perendaman terhadap tingkat kontaminasi dan persentase eksplan hidup pada kultur jaringan pisang. Hasil menunjukkan bahwa perlakuan dengan NaOCl 25% selama 30 menit menghasilkan persentase eksplan hidup tertinggi, yaitu 30%, dengan tingkat kontaminasi yang rendah. Namun, secara umum, persentase eksplan hidup pada semua perlakuan berada di bawah 50%, menunjukkan perlunya optimasi lebih lanjut. Nugroho & Andriani (2024) melakukan sterilisasi eksplan *Elaeocarpus grandiflorus* dengan menggunakan NaOCl dan $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. Hasilnya menunjukkan eksplan yang disterilisasi dengan NaOCl menunjukkan tingkat kontaminasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kalsium hipoklorit ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$). Namun, eksplan yang disterilisasi dengan NaOCl memiliki kemampuan pemulihan dan pertumbuhan yang lebih baik, dengan persentase eksplan hidup mencapai 80% pada perlakuan tertentu. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun tingkat kontaminasi awal lebih tinggi, eksplan yang disterilisasi dengan NaOCl memiliki potensi regenerasi yang lebih tinggi.

Dalam kultur *in vitro*, sterilisasi dan kualitas eksplan merupakan faktor penting dalam pertumbuhan. Selain sterilisasi eksplan, sterilisasi pada proses transfer atau inokulasi juga dapat mempengaruhi persentase eksplan hidup. Persentase eksplan hidup juga dipengaruhi oleh sumber eksplan. Eksplan yang diperoleh melalui subkultur, yaitu eksplan hasil kultur *in vitro* sehingga eksplan dalam keadaan steril. Eksplan yang diperoleh dari lapang merupakan eksplan yang harus disterilisasi dengan kombinasi yang tepat agar eksplan dapat tumbuh dan bertahan hidup. Media tanam yang digunakan pada kultur *in vitro* juga mempengaruhi persentase eksplan hidup. Eksplan dapat bertahan hidup karena adanya reaksi positif tanaman terhadap media yang diberikan sehingga tanaman mampu beradaptasi dalam media tersebut.

Sumber Kontaminan

Salah satu kendala paling krusial dalam kultur jaringan *in vitro* adalah kontaminasi mikroorganisme, yang dapat terjadi pada setiap tahap dari proses kultur, mulai dari inisiasi, pemeliharaan, hingga aklimatisasi planlet. Kontaminasi ini dapat muncul akibat berbagai sumber, baik eksternal maupun internal, yang meliputi eksplan yang digunakan, kebersihan ruang kultur, peralatan yang digunakan, serta media kultur yang dipersiapkan untuk percobaan. Sumber eksternal kontaminasi biasanya melibatkan partikel mikroorganisme yang terkontaminasi melalui udara ruang kultur, peralatan yang tidak steril, atau media kultur yang terkontaminasi oleh mikroba dari luar. Sumber internal kontaminasi lebih sulit diatasi karena sering kali mikroorganisme sudah ada di dalam eksplan itu sendiri, baik pada jaringan permukaan maupun jaringan internal.

Kontaminasi dalam kultur jaringan *in vitro* dapat berasal dari berbagai sumber, baik eksternal maupun internal. Sumber eksternal meliputi kebersihan ruang kultur, peralatan yang digunakan, serta media kultur yang terkontaminasi mikroorganisme. Sumber internal, terutama pada eksplan biji manggis, lebih sulit diatasi karena mikroorganisme dapat berada pada jaringan eksplan itu sendiri, baik di permukaan maupun dalam jaringan internal. Penelitian oleh Abdullah *et al.* (2022) menunjukkan bahwa eksplan yang tidak cukup disterilisasi memiliki potensi untuk menampung mikroorganisme pada bagian internal maupun eksternal jaringan. Dalam penelitian ini, mikroba seperti jamur dan bakteri yang ada pada eksplan sebelum perlakuan sterilisasi berpotensi menyebabkan kontaminasi jika tidak ditangani dengan prosedur sterilisasi yang efektif. Oleh karena itu, penting untuk memastikan bahwa eksplan manggis yang digunakan dalam percobaan bebas dari kontaminan sebelum dilakukan proses kultur *in vitro* (Sulikhah *et al.*, 2022).

Ciri-Ciri Kontaminan

Mikroorganisme kontaminan pada kultur *in vitro* memiliki ciri-ciri yang berbeda. Jamur dapat ditandai dengan benang-benang halus yang berwarna putih atau hijau, sementara bakteri menyebabkan pembentukan lendir berwarna putih kekuningan pada permukaan media. Penelitian oleh Wulandari *et al.* (2017) menyatakan bahwa jamur seperti *Fusarium* dan *Aspergillus* sering menjadi penyebab utama kontaminasi pada eksplan *in vitro*. Dalam penelitian ini, pengamatan terhadap jenis kontaminasi yang muncul pada eksplan biji manggis sangat penting, karena jenis dan waktu munculnya kontaminan dapat mempengaruhi efektivitas sterilisasi yang diterapkan. Misalnya, kontaminasi jamur pada eksplan biji manggis sering kali muncul setelah satu hingga dua minggu, sementara bakteri dapat muncul lebih cepat, dalam beberapa hari setelah inokulasi.

Jenis dan Penyebab Kontaminasi Jamur

Jamur *Fusarium* dan *Aspergillus* adalah penyebab umum kontaminasi dalam kultur jaringan tanaman. Penelitian oleh Parven & Syah (2019) menunjukkan bahwa jamur ini dapat tumbuh cepat dalam media kultur yang kaya nutrisi dan kondisi yang lembab. Dalam penelitian sterilisasi eksplan biji manggis ini, penurunan tingkat kontaminasi jamur dapat dicapai melalui penggunaan NaOCl dengan konsentrasi yang tepat dan durasi perendaman yang sesuai. Akan tetapi, penggunaan konsentrasi yang terlalu tinggi berisiko menyebabkan kerusakan pada jaringan eksplan, seperti pembakaran jaringan atau browning, yang dapat mempengaruhi kemampuan regeneratifnya (Cassells, 2012).

Jenis dan Penyebab Kontaminasi Bakteri

Kontaminasi bakteri pada eksplan biji manggis, seperti yang ditemukan dalam penelitian ini, sering disebabkan oleh bakteri patogen dari lingkungan atau peralatan yang kurang steril. Bakteri *Pseudomonas* dan *Bacillus* adalah dua jenis bakteri yang umum ditemukan dalam kultur jaringan tanaman (Sulikah *et al.*, 2022). Bakteri dapat merusak eksplan dengan cara bersaing mendapatkan nutrisi atau menyebabkan pembusukan jaringan. Dalam penelitian ini, perlakuan dengan NaOCl diharapkan dapat mengurangi tingkat kontaminasi bakteri, namun perlu diperhatikan bahwa penggunaan NaOCl dalam konsentrasi tinggi dan waktu perendaman yang lama dapat berisiko mengarah pada efek fitotoksik yang merusak jaringan eksplan manggis (Cassells, 2012).

Dampak Kontaminasi terhadap Eksplan

Kontaminasi mikroorganisme pada eksplan biji manggis dapat menghambat proses regenerasi tanaman, seperti pembentukan kalus atau tunas. Penelitian oleh Wahyudi & Hidayat (2022) menunjukkan bahwa tingkat kontaminasi yang tinggi dapat mengurangi kemampuan eksplan untuk berkembang dan beregenerasi, bahkan menyebabkan kematian eksplan. Oleh karena itu, tujuan utama dari perlakuan sterilisasi adalah untuk menurunkan atau bahkan menghilangkan kontaminasi mikroorganisme tersebut tanpa merusak kemampuan eksplan untuk berkembang dan beregenerasi. Dalam penelitian ini, penurunan tingkat kontaminasi diharapkan dapat meningkatkan viabilitas dan regenerasi eksplan biji manggis.

Waktu Munculnya Kontaminasi dan Implikasinya

Waktu munculnya kontaminasi pada eksplan biji manggis juga menjadi faktor penting yang dipertimbangkan dalam penelitian ini. Kontaminasi bakteri biasanya muncul dalam waktu beberapa hari setelah inokulasi, sementara jamur biasanya memerlukan waktu lebih lama, sekitar satu hingga dua minggu. Penelitian oleh

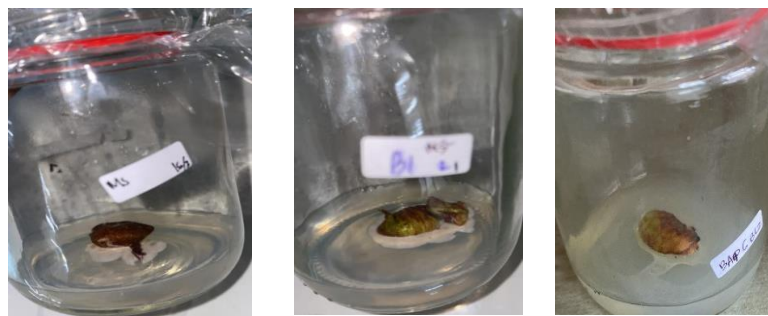
Abdullah *et al.* (2022) menyatakan bahwa waktu munculnya kontaminasi dapat berpengaruh pada jenis dan durasi perlakuan sterilisasi yang perlu diterapkan untuk menghindari kontaminasi. Dalam penelitian ini, perlakuan NaOCl dengan konsentrasi dan durasi yang berbeda akan diuji untuk menentukan apakah waktu kemunculan kontaminasi dapat ditunda atau dikendalikan lebih baik tanpa mengorbankan kesehatan jaringan eksplan.

Handoyowati (2016) menyatakan bahwa setiap bahan yang dijadikan eksplan memiliki tingkat kontaminasi yang berbeda, tergantung dari jenis tanaman, bagian tanaman yang dijadikan eksplan, morfologi permukaan, lingkungan tumbuh, kondisi tanaman, dan waktu pengambilan eksplan.



Gambar 3. Penampakan kontaminasi jamur pada eksplan biji manggis (Dokumentasi Pribadi Laboratorium Kultur Jaringan YAHDl)

Gambar 3 menunjukkan penampakan kontaminasi jamur pada eksplan biji manggis berdasarkan hasil pengamatan di ruang kultur. Kontaminasi jamur ditunjukkan dengan adanya miselium berwarna putih yang terdapat di sekitar eksplan. Miselium yang menyebar di sekitar eksplan akan menyebabkan kematian pada eksplan. Pancaningtyas & Nafi'ah (2020) menyatakan bahwa jamur kontaminan yang sering ditemukan pada kultur *in vitro* antara lain *Fusarium*, *Penicilium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Cylindrocarpus*, dan *Aspergillus*. Jamur berkembang biak dengan menggunakan spora. Spora jamur dapat bertahan dalam waktu yang lama, selama lingkungan masih menyediakan air dan kelembaban masih terjaga.



Gambar 4. Penampakan kontaminasi bakteri pada eksplan biji manggis (Dokumentasi Pribadi Laboratorium Kultur Jaringan YAHDl)

Kontaminasi bakteri dapat dideteksi dengan terbentuknya selaput bening yang membayang menutupi media berupa lendir di permukaan media dan berubah menjadi putih kekuningan seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 4. Kontaminasi dapat menyebar dari waktu ke waktu, menutupi permukaan media, dan menghambat pertumbuhan eksplan (Abdullah *et al.*, 2022). Aktivitas bakteri pada eksplan dapat mengganggu jaringan eksplan sehingga dapat menyebabkan kematian pada eksplan. Kontaminasi bakteri dalam kultur jaringan dapat terjadi melalui berbagai jalur, salah satunya adalah melalui bekas luka pada eksplan yang memungkinkan mikroorganisme masuk dan mengkontaminasi media serta eksplan itu sendiri. Wati *et al.* (2020)

mengungkapkan bahwa bakteri dapat masuk melalui luka eksplan dan berkembang biak di dalam media kultur, yang berpotensi merusak struktur eksplan seperti akar, serta menghambat proses perbanyakan dan pertumbuhan tanaman. Dampak yang serupa juga ditemukan oleh Leifert (1992), yang menyatakan bahwa kontaminasi bakteri dapat menyebabkan pembusukan akar pada eksplan dan berpotensi menyebabkan kematian tanaman. Namun, karakteristik kontaminasi pada biji manggis mungkin memiliki perbedaan dengan tanaman lain yang telah diteliti sebelumnya, mengingat biji manggis memiliki sifat fisik dan kimia yang berbeda. Misalnya, biji manggis memiliki lapisan pelindung yang lebih keras yang dapat mempengaruhi penetrasi zat disinfektan dan potensi penyerapan mikroorganisme (Sulikhah *et al.*, 2022). Oleh karena itu, penting untuk menilai apakah prosedur sterilisasi yang diterapkan untuk tanaman lain, seperti yang dijelaskan oleh Leifert (1992) dan Wati *et al.* (2020), dapat diaplikasikan secara langsung pada biji manggis, atau perlu disesuaikan dengan kondisi spesifik dari eksplan tersebut.

Dalam konteks ini, penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas sterilisasi NaOCl pada biji manggis, dengan mempertimbangkan sifat unik biji manggis serta perbedaan pada tingkat kerentanannya terhadap kontaminasi bakteri. Pengaruh perlakuan sterilisasi terhadap pertumbuhan dan regenerasi eksplan biji manggis, baik dalam menekan kontaminasi maupun dalam mempertahankan viabilitas jaringan, akan menjadi fokus utama analisis ini. Kontaminasi bakteri dapat diamati mulai hari ke 4 setelah proses penanaman dilakukan sementara kontaminasi jamur dapat diamati sejak 1 MST hingga 4 MST. Kontaminasi dapat disebabkan oleh sumber kontaminan pada saat proses penanaman eksplan dilakukan. Kontaminasi dapat berasal dari peralatan, eksplan, media, ruang atau prosedur penanaman yang salah. Kontaminasi eksplan yang dikultur dapat terjadi akibat adanya kontaminasi eksternal atau internal. Kontaminasi eksternal dapat dilakukan melalui sterilisasi permukaan. Kontaminasi internal sulit untuk diatasi karena sterilisasi permukaan tidak dapat membunuh kontaminan yang terdapat di dalam jaringan (Abdullah *et al.*, 2022).

Pengetahuan tentang waktu munculnya kontaminasi bakteri dan jamur serta sumber-sumber kontaminasi yang dapat terjadi selama proses penanaman eksplan ini sangat penting untuk meningkatkan keberhasilan kultur jaringan. Dengan pemahaman tersebut, prosedur sterilisasi yang lebih efektif dapat dikembangkan untuk meminimalisir kontaminasi, baik eksternal maupun internal, dan memastikan kelangsungan hidup eksplan yang optimal. Oleh karena itu, penelitian ini memiliki aplikasi praktis dalam pengembangan protokol sterilisasi yang lebih efisien, khususnya untuk tanaman seperti biji manggis, yang dapat membantu petani dan industri pembibitan dalam memperoleh tanaman sehat dan bebas kontaminasi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa kombinasi NaOCl 30% dan 20% selama 25 menit (kombinasi ketiga) merupakan yang paling efektif dalam menunda kontaminasi pada eksplan biji manggis, dengan persentase eksplan hidup mencapai 86,1%. Sementara itu, kombinasi pertama (NaOCl 15% dan 10% selama 5 menit) menunjukkan efektivitas yang paling rendah, menghasilkan 0% eksplan hidup. Kombinasi kedua (NaOCl 20% dan 15% selama 15 menit) memberikan hasil yang lebih baik, namun masih belum maksimal, dengan 0% eksplan hidup. Temuan ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi NaOCl dan semakin lama durasi perendaman, semakin efektif dalam mengurangi kontaminasi, meskipun masih perlu penelitian lanjutan untuk memastikan tidak adanya efek toksisitas terhadap jaringan tanaman. Kontaminasi yang terdeteksi selama penelitian berasal dari bakteri dan

jamur, yang menegaskan pentingnya kontrol mikroorganisme dalam kultur *in vitro*. Penelitian ini memberikan kontribusi penting dalam pengembangan protokol sterilisasi yang lebih efektif untuk perbanyakan tanaman manggis, yang berpotensi bermanfaat bagi industri pembibitan dan sektor pertanian.

REKOMENDASI

Berdasarkan hasil percobaan ini, diharapkan agar penelitian yang berhubungan dengan optimasi sterilisasi eksplan dapat terus dilakukan untuk mengoptimalkan pengaruh dari bahan sterilan yang akan digunakan dalam perbanyakan yang dilakukan secara *in vitro* sehingga dapat meminimalisir terjadinya kontaminasi baik yang berasal dari bakteri maupun jamur. Penelitian mendalam juga penting untuk dilakukan guna mengeksplor pengaruh bahan sterilan terhadap eksplan maupun terhadap sumber kontaminan. Dalam aplikasi praktis, penelitian ini dapat memberikan referensi untuk pemilihan bahan sterilisasi permukaan eksplan pada perbanyakan tanaman secara *in vitro*. Untuk eksperimen awal, kombinasi 3 dapat digunakan untuk menjamin eksplan bebas kontaminasi. Namun untuk regenerasi dan subkultur, disarankan untuk melakukan evaluasi viabilitas jaringan setelah eksplan mendapat perlakuan dengan menggunakan kombinasi 3. Setelah itu dapat dilakukan uji tambahan seperti pengamatan morfologi eksplan pasca perlakuan dan uji tumbuh untuk mengonfirmasi efek fitotoksik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih banyak kepada semu pihak yang telah berkontribusi dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, R., et al. 2022. Faktor Kontaminasi Kultur Jaringan pada Eksplan Biji Duku (*Lansium domesticum* Corr.) Menggunakan Media Murashige and Skoog. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi*, 5(1). UIN Raden Fatah Palembang.
- Abdullah, R., et al. (2022). Kontaminasi mikroorganisme dalam kultur jaringan *in vitro* pada tanaman. *Journal of Plant Tissue Culture*, 8(3), 156-165.
- Abebe, Y., & Feyissa, T. (2013). Micropropagation of *Bersama abyssinica* Fresen from shoot tip explants. *American Journal of Plant Sciences*, 4(11), 2081–2087.
- Apriliyani, R. & Wahidah, B. F. (2021). Perbanyakan Anggrek *Dendrobium* sp. Secara *in vitro*: Faktor-Faktor Keberhasilannya. *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, 1(2), 33-46. <https://doi.org/10.24252/filogeni.v1i2.21992>.
- Ashari & Sunarsih. 2006. Manggis Komoditas Unggulan Tasikmalaya. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 28(1): 27-28.
- Binte, N. A., et al. (2022). Optimization of Surface Sterilization Protocols for *In vitro* Culture of Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 10(2), 90–94.
- Cassells, A. C. (2012). Pathogen and Biological Contamination Management in Plant Tissue Culture. *In Plant Cell Culture Protocols* (pp. 51–64). Humana Press.
- Cassells, A. C. (2012). Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: Phytopathogens, culture contaminants, and sanitation. *Methods in Molecular Biology*, 877, 57–80. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_5
- Daud, N., Taha, R.M., & Noor, N.M. (2012). Effects of different sterilization methods on contamination and germination of African violet explants. *African Journal of Biotechnology*, 11(77), 14265–14270.

- Faizal, A., & Nurmala, S. (2021). Pengaruh Teknik Sterilisasi Eksplan Terhadap Tingkat Perolehan Kultur Jaringan Aksenik Ramin (*Gonystylus bancanus*). *Jurnal Akademik*, 4(2), 45–53.
- Fauzan, Y.S.A, Supriyanto, Tajuddin T. 2017. *Efektivitas Merkuri Klorida (HgCl₂) Pada Sterilisasi Tunas Samping Jati (Tectona grandis) In vitro*. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT).
- Field, A. (2013). *Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics* (4th ed.). SAGE Publications.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3rd ed.). Springer.
- Habibah, N., Sumadi, & Ambar, S. 2013. Optimasi Sterilisasi Permukaan Daun dan Eliminasi Endofit pada Burahol. *Biosaintifika*, 5(2), 94-99.
- Habibah, S., Wulandari, R., & Ariani, E. (2013). Teknik Sterilisasi Eksplan untuk Kultur Jaringan. *Jurnal Bioteknologi Tropis*, 1(2), 45–50.
- Handoyowati. 2016. Ketahanan Kultur Kencur (*Kaempferia galanga* L.) secara *in vitro* pada Konsentrasi Sterilan dan Jenis Eksplan yang Berbeda. *Skripsi. Agroteknologi*.
- Howell, D. C. (2012). *Statistical methods for psychology* (8th ed.). Cengage Learning.
- Lase, S. N., Barus, E., & Pakpahan, P. (2023). Pengaruh lama perendaman larutan pemutih (NaOCl) terhadap pertumbuhan eksplan pisang (*Musa spp.*) secara *in vitro*. *Jurnal Esaprom*, 4(1), 77–82.
- Leifert, C. (1992). Bacterial Contamination in Tissue Culture Systems and its Management. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 28, 106-112.
- Natasha, A., & Restiani, R. (2019). Pengaruh Sterilan terhadap Viabilitas Eksplan pada Kultur Jaringan. *Jurnal Hortikultura Indonesia*, 10(1), 13–20.
- Nugroho, D. W., & Andriani, R. (2024). The optimal sterilizing compound and culture medium in *Elaeocarpus grandiflorus* (L.) *in vitro* shoot induction. *Indonesian Journal of Tropical Plant Research*, 8(1), 15–22.
- Pancaningtyas, S. & Nafi'ah, R. (2020). Identifikasi Jamur Kontaminan pada Tahap Inisiasi Eksplan Kultur *In vitro* Kakao (*Theobroma cacao* L.). Surabaya: *Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*.
- Parveen, S., & Shah, T. M. (2019). Effect of sodium hypochlorite on control of *in vitro* contamination and seed germination of *Ficus religiosa*. *Journal of Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 29(1), 65–70.
- Parven, A., & Syah, M. (2019). Efek NaOCl Terhadap Kontaminasi Dan Perkecambahan Ficus Religiosa. *Journal of Plant Biotechnology*, 12(2), 89-98.
- Pratiwi, D. R., Wening, S., Supena, N., Sediawati, R. D., & Yenni, Y. (2020). Kultur Jaringan Kelapa Sawit. *WARTA Pusat Penelitian Kelapa Sawit*, 25(1),
- Premanath, M. S., & Bhat, R. (2011). Micropropagation of *Hibiscus rosa-sinensis* L. using shoot tip and nodal explants. *American Journal of Plant Sciences*, 2(4), 450–455. 1-10. <https://doi.org/10.22302/iopri.war.warta.v25i1.8>.
- Rout, G.R., Samantaray, S., & Das, P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, 18(2), 91–120.
- Shofiyani, A., Purnawanto, A.M., Zahara, R., & Aziz, A. 2019. Pengaruh Berbagai Sterilan dan aktu Perendaman Terhadap Keberhasilan Sterilisasi Eksplan Daun Kencur (*Kaempferia galanga* L.) pada Teknik Kultur *In vitro*. *Seminar Nasional Hasil Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat IV Tahun 2019* (pp.668-678). Purwokerto: LPPM-Universitas Muhammadiyah Purwokerto.
- Sulikah, D., Kurniasih, R.A., & Hartini, S. (2022). Kajian Kontaminasi Eksplan pada Kultur *In vitro*. *Buletin Agrohorti*, 10(3), 102–108.

- Sulikah, E., *et al.* (2022). Sterilisasi Eksplan dan Pengendalian Kontaminasi dalam Kultur Jaringan Tanaman. *Advances in Plant Science*, 22(1), 45-52.
- Sulikah., Yulianti, F., dan Azmi, T,K,K. 2022. Induksi Tunas Ubi Jalar Kuning Aksesori Arnet Secara *In vitro* dengan Pemberian BAP. *Gontor Agrotech Science Journal*, 8(2): 65-74.
- Trimalasari, D. (2024). Uji Efektivitas Natrium Hipoklorit (NaOCl) dalam Mengurangi Tingkat Kontaminasi Eksplan Tulang Daun Durian Secara *In vitro*. *Skripsi. Fakultas Pertanian : Universitas Sriwijaya*.
- Wahyudi, A., & Hidayat, T. (2022). Pengembangan kombinasi teknik sterilisasi eksplan guna meningkatkan keberhasilan kultur jaringan tanaman. *Seminar Nasional Pertanian Berkelanjutan VIII*.
- Wahyudi, I., & Hidayat, D. (2022). Pengaruh Sterilisasi Naocl Terhadap Tingkat Kontaminasi Dan Viabilitas Eksplan. *Plant Tissue Culture Studies*, 15(1), 58-65.
- Wati, R. *et al.* (2020). Pengaruh Sterilisasi NaOCl pada Kontaminasi Bakteri dalam Kultur Jaringan Tanaman. *Journal of Plant Science*, 9(3), 225-233.
- Widiastuti, A., Sobir, Suhartanto, M.R. 2013. Analisis Keragaman Genetik Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Diradiasi dengan Sinar Gamma Berdasarkan Penanda ISSR. *J. Bioteknologi*. 10(1): 15-22.
- Wulandari, A., *et al.* (2017). Pengaruh sterilisasi NaOCl terhadap pengendalian kontaminasi jamur dan bakteri dalam kultur jaringan tanaman. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 6(4), 320-329.
- Wulandari, I. S. (2014). Efektivitas natrium hipoklorit (NaOCl) pada sterilisasi eksplan tunas aksiler *Eucalyptus pellita*. *Skripsi, Universitas Gadjah Mada*. UGM ETD.
- Yuliana, N. 2018. Optimasi Sterilisasi Eksplan dan Pengaruhnya Terhadap Kestabilan *In vitro* Tunas Vegetatif Tanaman Sirsak (*Annona muricata* L. Var Ratu). *Tesis. Institut Teknologi Sepuluh Nopember*.