

**KAJIAN GLYCOCALYX BAKTERI PADA KONTAMINASI
ULIN (*Eusideroxylon zwageri*) IN-VITRO**

*Study of Glycocalyx Bacterial Contamination on Ulin (*Eusideroxylon zwageri*) In-Vitro*

Asri Insiana Putri

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar Km. 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta 55582
Telp. (0274) 895954, 896080, Fax. (0274) 896080

ABSTRACT

*In-vitro contamination of plant tissue cultures by bacteria is one of the most serious problems in plant micropropagation. Ulin (*Eusideroxylon zwageri*) bacterial contamination in vitro may survive surface sterilization of the explant because they are in interior tissues and some bacterial spores can also survive the sterilization procedure even if they are on the tissue surface. Bacteria secrete some sort of glycocalyx, an outer viscous covering of fibers extending from the bacterium. This study was conducted to examine the colony thickness and to observe the bacteria glycocalyx contaminant of ulin in vitro following three surface explant sterilization treatments with fungisida, detergent, alkohol, HgCl₂ and Na₂ClO₃ as antimicrobial agents. The longer the sterilization time the lesser the bacterial colony thickness formed. Transmission binocular microscopy showed that distribution of glycocalyx material surrounding coccus ulin bacterial contaminant cells were not different with *Pseudomonas aeruginosa*. Bacterial capsule staining showed that ulin bacterial contaminant cells were capsulated like *Streptococcus lactis* or *Enterobacter aerogenes*.*

Key Words : *In-vitro sterilization, bacterial contamination, bacterial colony*

ABSTRAK

Kontaminasi bakteri kultur jaringan *in-vitro* merupakan salah satu masalah paling penting pada kebanyakan tanaman mikro. Kontaminasi ulin (*Eusideroxylon zwageri*) *in-vitro* dapat tetap terjadi walaupun sudah melalui sterilisasi permukaan eksplan karena beberapa bakteri dapat hidup di dalam jaringan tanaman, dan spora bakteri juga tetap hidup di permukaan eksplan setelah sterilisasi. Bakteri menghasilkan *glycocalyx*, lapisan kapsul atau lendir yang menyelimuti sel sebagai pertahanan dari serangan senyawa anti mikrobia yang dipergunakan dalam sterilisasi permukaan eksplan. Kajian ini adalah untuk meneliti ketebalan koloni bakteri kontaminan ulin *in-vitro* dan mengamati secara mikroskopis lapisan *glycocalyx* setelah dilakukan tiga pengujian sterilisasi permukaan eksplan dengan senyawa anti mikrobia fungisida, detergen, alkohol, HgCl₂ dan Na₂ClO₃. Semakin lama waktu

pengujian sterilisasi ketebalan koloni bakteri akan semakin menurun. Dari hasil pengamatan mikroskopis nampak bahwa tidak ada perbedaan distribusi *glycocalyx* yang menyelimuti bakteri yang berbentuk bulat antara kontaminan ulin dan *Pseudomonas aeruginosa*. Pada pengecatan kapsul bakteri secara mikroskopis tidak ada perbedaan antara kapsul sel bakteri kontaminan ulin dengan *Streptococcus lactis* atau *Enterobacter aerogenes*.

Kata Kunci : Sterilisasi *in-vitro*, kontaminasi bakteri, koloni bakteri

I. PENDAHULUAN

Kontaminasi kultur *in-vitro* adalah tumbuhnya mikrobia yang tidak dikehendaki (kontaminan) pada media maupun eksplan selama inkubasi. Kultur dapat terinfeksi satu atau lebih mikrobia seperti bakteri, fungi berfilamen, *yeast*, virus, dan fitoplasma. Kontaminasi merupakan masalah serius yang menghambat keberhasilan untuk mendapatkan kultur akseptik (Leifert & Cassels, 2001). Rerata kegagalan akibat kontaminasi kultur pada beberapa protokol perbanyakan *in-vitro* adalah antara 3% sampai dengan 15% setiap subkultur (Leifert *et al.*, 1994). Di samping komponen media, faktor manusia dan lingkungan, eksplan merupakan sumber utama kontaminasi. Nutrien dan gula pada media maupun dari jaringan tanaman dapat digunakan kontaminan dan secara cepat akan mematikan eksplan (Anonim, 2003b), sehingga kontaminasi akan menurunkan angka hidup *in-vitro* (*in-vitro survival rate*) dan secara ekonomi akan menurunkan tingkat komersial (Herman, 1996).

Berdasarkan jumlah sel atau koloni, bakteri merupakan kontaminan tertinggi pada kultur *in-vitro*, dapat bersifat inisial, laten maupun introduksi. Inisial bila kontaminan dari eksplan

yang kurang sempurna dalam proses sterilisasi; laten bila kontaminan tidak menunjukkan sifat patogenik *in-situ* namun berkembang pada media kultur; introduksi bila kontaminan berasal dari lingkungan laboratorium akibat penanganan sterilisasi alat dan ruang yang kurang baik. Kontaminan bakteri yang sering dijumpai pada kultur *in-vitro* adalah *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, dan *Xanthomonas* (Wolf, 2007). Bila sumber kontaminan dari berbagai macam tanah diuji di media agar maka akan terbentuk koloni bakteri yang sangat bervariasi yaitu: 5-60% *Arthrobacter*, 7-67% *Bacillus*, 3-15% *Pseudomonas*, lebih dari 20% *Agrobacterium*, 2-12% *Alcaligans* dan 2-10% *Flavobacterium*, sedangkan kurang dari 5% dari koloni sel *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Xanthomonas*, *Mycobacterium* dan *Sarcina* (Alexander, 1976). Pada kultur *in-vitro* karakteristik koloni bakteri dapat diamati langsung (*unaided eye*), diantaranya dikenali dengan adanya lendir berwarna putih, coklat, merah muda atau kuning. Seringkali bakteri-bakteri tersebut berasosiasi dengan spora atau miselia fungi (Wolf, 2007). Sedangkan sel

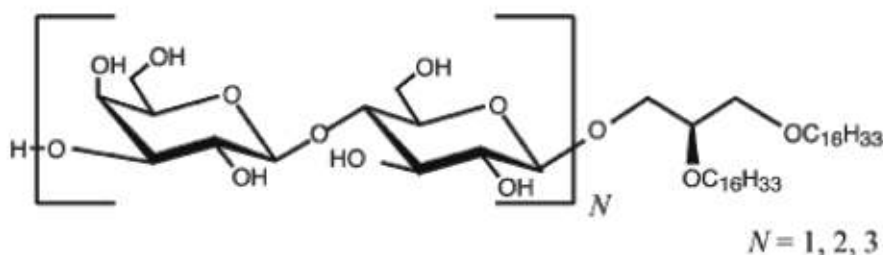
bakteri dapat diamati dengan mikroskop cahaya minimal perbesaran 1.000 kali, berukuran 0,04-5,00 mikron/sel (Alexander, 1976).

Metode sterilisasi eksplan dengan senyawa anti mikrobia dipandang lebih efektif dibandingkan dengan penyaringan, gas, pemanasan, radiasi ultraviolet atau gelombang mikro. Senyawa anti mikrobia yang dipandang efektif untuk sterilisasi permukaan eksplan adalah senyawa kimia: ethanol (*isopropyl alcohol*) 70%; sodium hipoklorit (Na_2ClO_3) 0,5-1,0%; kalsium hipoklorit (CaClO_3) 3,25%; merkuri klorit (HgCl_2) 1,5%; hidrogen peroksida (H_2O_2) 30% (Wolf, 2007). Senyawa kimia tersebut bersifat racun terhadap protoplasma sel mikrobia. Sedangkan untuk kontaminasi laten dipergunakan antibiotik yang bersifat inhibitor pada sintesis dinding sel dengan *penicillin* dan *cephalosporin*, inhibitor sintesis membran sel dengan *tyrothricin* dan *nystatin*, inhibitor sintesis protein dengan *chloramphenicol* dan *tetracycline*, inhibitor metabolisme, fungsi atau struktur DNA dengan *novobiocin* dan *griseofulvin*. Namun penggunaan antibiotik seringkali dihindarkan untuk mencegah terjadinya mutasi genetik resistensi tanaman (Moat, 1979).

Dari banyak penelitian yang telah dilakukan, di samping bakteri dapat bersifat endofitik hidup

secara epifit di dalam sel atau ruang antar sel tanaman (Nagy *et al.*, 2005), bakteri mempunyai struktur pelindung sel *glycocalyx* yang mampu menghambat efektivitas senyawa anti mikrobia sehingga tingkat aseptisitas kultur akan menurun (Brown *et al.*, 1995). *Glycocalyx* adalah substansi eksternal yang menyelimuti sel bakteri, berbentuk *viscous* (lengket), tersusun atas oligo dan rantai polisakarida, polipeptida atau keduanya dari glikolipid, glikoprotein dan trans-membran proteoglikan; struktur kimia *glycocalyx* ditunjukkan pada Gambar 1 (Tortora, *et al.*, 1995; Schneider, 2002).

Bentuk *glycocalyx* berkaitan dengan fungsi senyawa tersebut terhadap sel, yaitu berupa dinding sel bila terorganisasi dengan baik sebagai pembentuk sel itu sendiri, berbentuk kapsul bila lapisan ini tidak dengan mudah tercuci oleh air dan lebih berfungsi sebagai pelindung dinding sel. Kapsul atau kista bakteri dapat digunakan sebagai pelindung pada waktu dormansi sel. Kedua bentuk *glycocalyx* tersebut lebih sebagai lapisan pelindung bagi bagian dalam sel dari faktor lingkungan luar sel yang tidak menguntungkan seperti fagositosis (serangan protozoa atau virus), proses desikasi (kekeringan, dehidrasi) dan senyawa antimikrobia. Sedangkan *glycocalyx* yang mudah tercuci air dan lebih berperan pada proses penjerapan (*trapping*)



Gambar 1. Struktur kimia *glycocalyx* dengan oligolaktose di ujung group dan glikolipid Lac N 1,2,3 (Schneider, 2002).

unsur hara yang dibutuhkan sel disebut lapisan lendir (*slime layers, biofilms*) (Moat, 1979; Vaughan & Malcolm, 1984; Prescott *et al.*, 1996; Black, 1996). Pada lingkungan dengan konsentrasi substrat yang terbatas, sel bakteri dapat memanfaatkan eksoenzim (enzim ekstraseluler) pada *slime layers* tersebut (Tortora *et al.*, 1995).

Identifikasi dan karakteristik bakteri kontaminan kultur *in-vitro* serta mekanisme perlindungan terhadap senyawa anti mikrobial sampai saat ini belum sepenuhnya diketahui (Nagy *et al.*, 2005). Resistensi *glycocalyx* terhadap senyawa anti mikrobial dilaporkan bukan berdasarkan kuantitas *glycocalyx* namun karena interaksi antara *glycocalyx*, sel bakteri dan substrat, serta kekuatan senyawa anti mikrobial terhadap *glycocalyx* sel (Brown *et al.*, 1995). Tingkat perlindungan *glycocalyx* bakteri terhadap proses sterilisasi sangat bervariasi tergantung pada spesies dan lingkungan mikro *in-vitro* (Moat, 1979; Nagy *et al.*, 2005). Beberapa peneliti menduga bahwa mekanisme resistensi *glycocalyx* adalah adanya polianionik *glycocalyx* yang menghambat aktivasi interaksi dengan kation senyawa anti mikrobial pada proses difusi berdasarkan ukuran molekul dan viskositas (Costerton, 1984); sedangkan secara fisik, resistensi sel bakteri berdasarkan pada ketebalan *glycocalyx* (Anderson *et al.*, 1991).

Dengan demikian penelitian tentang *glycocalyx* dan proses sterilisasi sangat penting di dalam upaya menekan tingkat kontaminasi dan menjaga aseptisitas kultur *in-vitro*. Sampel eksplan yang digunakan adalah dari tanaman ulin (*Eusideroxylon zwageri*) karena mempunyai waktu regenerasi *in-vitro* yang nisbi lama (Putri, 2008), sehingga *glycocalyx* pada kontaminan

bakteri yang bersifat internal maupun latentpun akan dapat teramati. Tujuan penelitian ini adalah mengkaji *glycocalyx* bakteri kontaminan kultur ulin dan efektivitas berbagai waktu sterilisasi permukaan terhadap kontaminan bakteri.

II. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (B2PBPTH), Yogyakarta.

Bahan yang digunakan adalah kultur ulin (*Eusideroxylon zwageri*), sumber materi tanaman berasal dari arboretum B2PBPTH, Purwobinangun (di luar rumah kaca). Eksplan dari pucuk tunas tanaman ulin umur 1,5 tahun.

Kultur menggunakan nutrisi makro dan mikro dari media MS (*Murashige & Skoog*), ditambahkan zat pengatur tumbuh BAP (*Benzyl Amino Purin*), auksin NAA (*Naphtalene Acetic Acid*) dan *Gibberelin* serta vitamin *myo-inositol*, *glycine*, *nicotinic acid*, *thiamin-HCl*, *pyridoxin-HCl*. Media ini menggunakan 30 g/l sukrosa sebagai sumber karbon dan 12 g/l agar (kemurnian 84%).

Pengamatan jumlah dan warna kultur terkontaminasi bakteri dilakukan pada kultur eksplan ulin tanpa sterilisasi dibandingkan dengan perlakuan sterilisasi permukaan secara *multiple-reagent* dengan 3 pengujian waktu sterilisasi: Uji 1 = Fungisida 1 x 30 menit, detergen 1 x 10 menit, alkohol 1 x 3 menit, HgCl₂ 1 x 10 menit dan Na₂ClO₃ 1 x 10 menit. Uji 2 = Fungisida 2 x 30 menit, detergen 2 x 10 menit, alkohol 2 x 3 menit HgCl₂ 2 x 10 menit dan Na₂ClO₃ 2 x 10 menit. Uji 3 = Fungisida 3 x 30 menit, detergent 3 x 10

menit, alkohol 3 x 3 menit HgCl₂ 3 x 10 menit dan Na₂ClO₃ 3 x 10 menit. Masing-masing 25 kali ulangan, sehingga memerlukan 100 kultur ulin.

Peralatan yang digunakan adalah *autoclave*, *hotplate*, *shaker*, *lamina-air flow*, lampu spiritus, pinset, tabung reaksi, *petridish* mikroskop binokuler, kamera, *aluminium foil*, *wrapping plastic*, *glove*, *masker*, kertas tissue, label dan alat tulis.

Inkubasi di ruang kultur dengan tingkat kelembaban 60-70%, temperatur rerata harian 24⁰C dan fotoperiode 16 jam dibawah lampu *fluoresence* putih Philips TLD 40 watt. Pengamatan jumlah dan warna kultur terkontaminasi bakteri (tanpa kontaminan fungi) dilakukan setiap minggu sekali selama 3 bulan dari waktu penanaman eksplan *in-vitro*. Pengamatan *glycocalyx* dilakukan secara langsung secara makroskopis dan dibawah mikroskop dengan melakukan goresan (*streak*) berulang kali pada media padat YME (*Yeast Malt Extract*) di *petridish* sampai didapatkan kultur kontaminan murni. Pada penelitian ini tidak dilakukan identifikasi bakteri, pengamatan hanya dari *glycocalyx* yang terbentuk dan dikaji dengan hasil penelitian yang sudah dilakukan dari beberapa sumber pustaka.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Persentase kontaminasi kultur

Hasil pengamatan pengaruh waktu sterilisasi permukaan eksplan terhadap kontaminasi kultur (Tabel 1) menunjukkan bahwa semakin lama waktu sterilisasi yang digunakan dari berbagai reagen anti mikrobia maka kontaminasi bakteri pada kultur semakin menurun. Pada kultur dengan waktu sterilisasi eksplan tertinggi tetap

terjadi kontaminasi bakteri. Hal ini menandakan terjadinya netralisasi senyawa anti mikrobia, atau adanya *glycocalyx* bakteri kontaminan sebagai pelindung sel dari zat yang bersifat racun. Aktifasi interaksi polianionik *glycocalyx* dengan kation senyawa anti mikrobia tersebut akan terhambat pada saat terjadinya proses difusi (Costerton, 1984). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Brown *et al.* (1995) bahwa semakin tinggi waktu difusi (kontak) senyawa anti mikrobia akan meningkatkan interaksi ke lapisan sel yang lebih dalam. Ketahanan terhadap senyawa anti mikrobia tidak berhubungan dengan kegiatan fisiologis sel maupun kuantitas *glycocalyx*, namun lebih kepada waktu interaksi *glycocalyx*, sel bakteri, substrat dan senyawa anti mikrobia.

B. Ketebalan dan warna koloni bakteri kontaminan

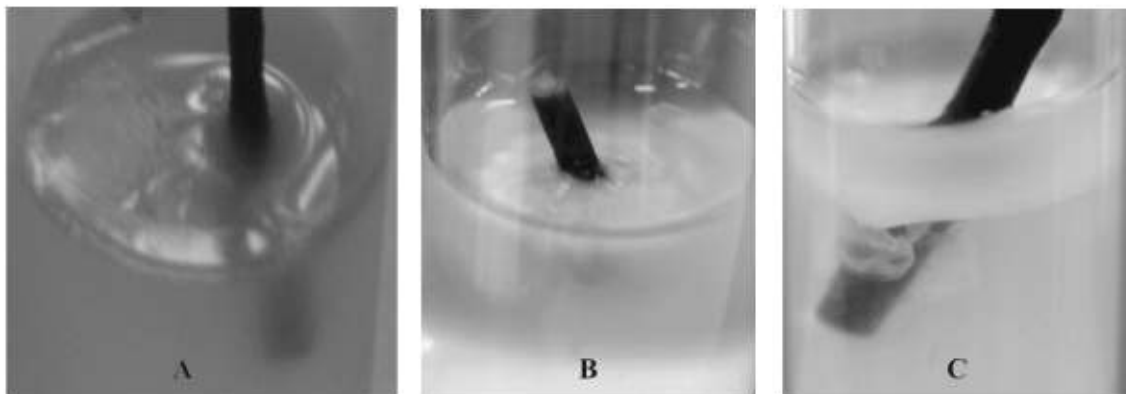
Pada Tabel 1 juga didapatkan bahwa waktu sterilisasi (pada uji 1, 2 dan 3) serta persentase kultur terkontaminasi bakteri berpengaruh positif terhadap ketebalan koloni bakteri. Bila ketebalan koloni bakteri diasumsikan sebagai kuantitas *glycocalyx*, maka semakin lama waktu sterilisasi akan menurunkan kuantitas *glycocalyx* berkaitan dengan kematian sel. Walaupun tidak secara langsung berkaitan dengan interaksi senyawa anti mikrobia, namun secara fisik, ketebalan *glycocalyx* tetap mempengaruhi ketahanan sel bakteri terhadap senyawa anti mikrobia (Anderson *et al.*, 1991).

Pada penelitian ini pengamatan koloni bakteri secara makroskopis hanya berdasarkan warna koloni seperti pada Gambar 2, dan tidak dilakukan identifikasi lebih lanjut. Namun dari

Tabel 1. Hasil pengamatan kontaminan bakteri sampai dengan 3 bulan pengamatan *in vitro*

Uji sterilisasi	Kultur terkontaminasi bakteri (%)	Rerata ketebalan koloni bakteri (mm)*	Keterangan
Uji1	39	7	100 % koloni bakteri berwarna putih
Uji2	36	5	73 % koloni bakteri berwarna putih, 18 % berwarna kuning dan 9 % berwarna merah muda
Uji3	20	1	68 % koloni bakteri berwarna putih, 26 % berwarna kuning dan 6 % berwarna merah muda
Tanpa sterilisasi	52	8	84 % koloni bakteri berwarna putih, 11 % berwarna kuning dan 5 % berwarna merah muda

* pada tabung berdiameter 3 cm



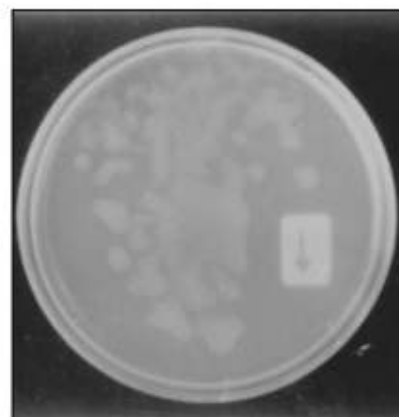
Gambar 2. Warna koloni pada kultur ulin: merah muda (A), kuning (B) dan putih (C)
(Foto oleh: Putri 2009)

perbedaan warna koloni dimungkinkan adanya perbedaan morfologi maupun fisiologi sel bakteri dari satu atau beberapa spesies. Pengamatan mikroskopis hanya dilakukan untuk koloni bakteri yang berwarna putih karena mempunyai persentase yang paling tinggi, setelah dilakukan pemurnian bakteri pada media padat *yeast malt extract* (Gambar 3).

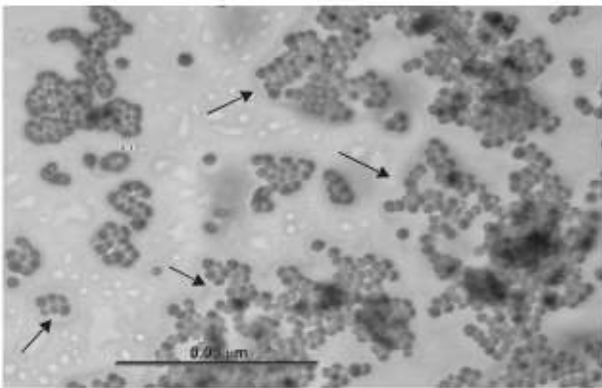
C. *Glycocalyx* bakteri kontaminan

Pengamatan mikroskopis koloni bakteri kontaminan pada kultur ulin nampak pada Gambar 4. *Glycocalyx* bakteri nampak menyelimuti koloni dari hasil pemurnian setelah uji

sterilisasi permukaan eksplan ulin dengan waktu tertinggi. Ketahanan bakteri nampak dari



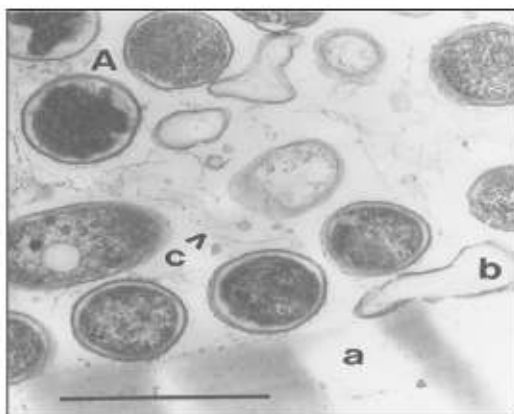
Gambar 3. Koloni bakteri (berlendir putih) setelah dilakukan pemurnian pada media padat *yeast malt extract* (Foto oleh: Putri, 2009)



Gambar 4. Pengamatan mikroskopis (1.000 x) *glycocalyx* (arah anak panah) bakteri kontaminan pada kultur ulin. Pengecatan bakteri dengan safranin 0,5% (Foto oleh: Putri 2009)

kebanyakan sel masih utuh belum mengalami *lysis* atau mati.

Dibandingkan dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang telah diperlakukan dengan senyawa anti mikrobia *povidone-iodine* selama 2 menit, nampak *glycocalyx* menyelimuti sel dan terdapat sel yang telah *lysis* (Gambar 5). Walaupun pengamatan dilakukan dengan mikroskop elektron namun lapisan luar *glycocalyx* tidak nampak, diperkirakan ketebalan *glycocalyx* pada pengamatan tersebut adalah sekitar 160 μm (Schneider *et al.*, 2002)

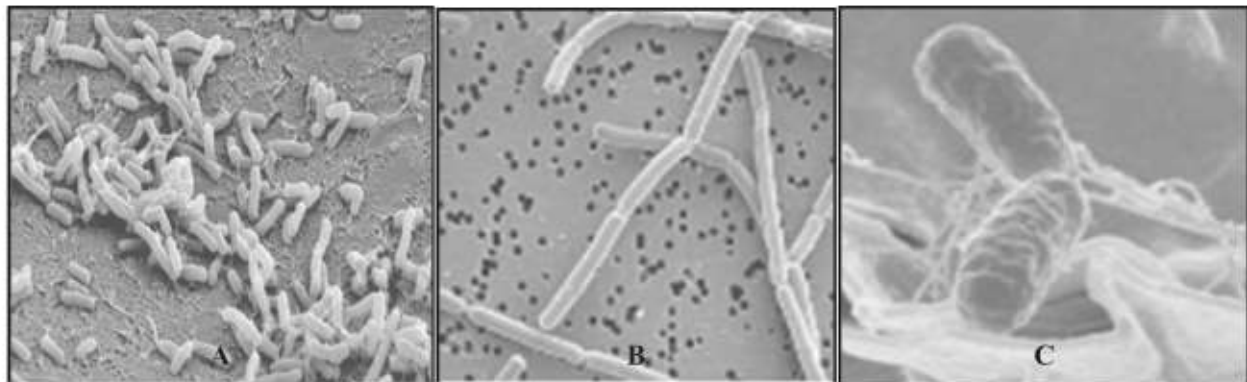


Gambar 5. Pengamatan mikroskopis (elektron) *glycocalyx Pseudomonas aeruginosa*. Pengecatan bakteri dengan *alcian blue* (c), bakteri *lysis*/mati (b) dan substrat (a). Skala bar 1 μm (Foto oleh: Schneider *et al.*, 2002)

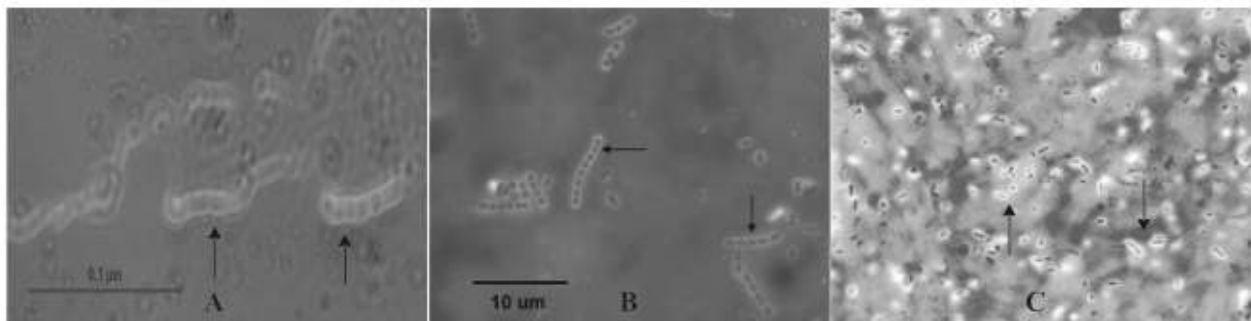
Alkohol 70% pada pengujian sterilisasi di samping untuk mematikan kontaminan permukaan eksplan dan menghilangkan gelembung udara, juga untuk meningkatkan daya antar desinfektan HgCl_2 dan Na_2ClO_3 (Anonim^a, 2003). Semakin tinggi waktu yang digunakan untuk sterilisasi diharapkan serangan senyawa anti mikrobia akan dapat masuk ke lapisan sel yang lebih dalam, namun kerusakan jaringan eksplan untuk menjaga proses fisiologis tetap menjadi pertimbangan penting.

Sebagai perbandingan pembentukan *glycocalyx* pada beberapa bakteri dapat ditunjukkan pada Gambar 6. Bentuk sel bakteri kontaminan ulin yang bulat (*coccus*) nisbi mempunyai luas permukaan tiap sel yang lebih kecil dibandingkan *Agrobacterium*, *Lactobacillus* maupun *Streptococcus* yang berbentuk batang (*rods*). Permukaan *glycocalyx* sel yang tersusun atas rantai oligo dan polisakarida dari glikolipid, glikoprotein dan trans-membran proteoglikan akan menentukan stabilitas struktur membran plasma melalui berbagai kombinasi kekuatan fisik seperti daya elektrostatis, interaksi *van der Waals* atau ikatan hidrogen (Schneider *et al.*, 2002). Luas permukaan tiap sel bakteri (sesuai bentuk dan ukuran sel), substrat dan *glycocalyx* yang dihasilkan akan menentukan stabilitas struktur membran plasma dan ketahanan sel bakteri (Brown *et al.*, 1995).

Pengecatan kapsul bakteri kontaminan ulin, *Streptococcus lactis* dan *Enterobacter aerogenes* ditunjukkan pada Gambar 7. Kapsul merupakan bentuk *glycocalyx* berkaitan dengan fungsi senyawa tersebut terhadap sel yaitu sebagai pelindung pada waktu dormansi dan pelindung bagian dalam sel dari faktor lingkungan luar sel yang tidak menguntungkan seperti fagositosis



Gambar 6. Pengamatan mikroskopis (elektron) *glycoalyx* yang menyelimuti bakteri *Agrobacterium* (A) (Foto oleh: Tzvira *et al.* 2007), *Lactobaccillus* (B) (Foto oleh: Kaiser 2009) dan *Streptococcus* (C) (Foto oleh: Kaiser 2009).



Gambar 7. Pengamatan mikroskopis (1.000 x) kapsul bakteri kontaminan pada ulin (A) (Foto oleh: Putri 2009), bakteri *Streptococcus lactis* (B) (Foto oleh: Kaiser 2009) dan bakteri *Enterobacter aerogenes* © (Foto oleh: Kaiser 2009).

(serangan protozoa atau virus), proses desikasi (kekeringan, dehidrasi) dan senyawa anti-mikrobia (Moat, 1979; Vaughan & Malcolm, 1984; Prescott *et al.*, 1996; Black, 1996).

Senyawa anti mikrobia diantaranya yang dipergunakan dalam penelitian ini pada umumnya mengandung merkuri dan klor dalam bentuk garam atau fenol. Semakin tinggi substitusi klor atau merkuri di posisi meta pada senyawa anti mikrobia akan semakin sulit didegradasi oleh kemampuan enzimatik bakteri dan lebih bersifat toksik (Atlas & Bartha, 1987).

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Pengujian sterilisasi permukaan eksplan tunas pucuk ulin (*Eusideroxylon zwageri*) dengan senyawa anti mikrobia fungisida 3 x 30 menit, detergent 3 x 10 menit, alkohol 3 x 3 menit $HgCl_2$ 3 x 10 menit dan Na_2ClO_3 3 x 10 menit menghasilkan kontaminasi kultur terendah yaitu 20%.
2. Pengujian waktu sterilisasi tersebut menghasilkan rerata ketebalan koloni bakteri kontaminan ulin *in-vitro* terendah yaitu 1 mm pada tabung diameter 3 cm.
3. Pada pengamatan mikroskopis nampak bahwa tidak ada perbedaan distribusi *glycoalyx*

yang menyelimuti bakteri yang berbentuk bulat antara kontaminan ulin dan *Pseudomonas aeruginosa*; namun belum nampak adanya kematian sel/*lysis* pada kontaminan ulin seperti pada *P. Aeruginosa*.

4. Pada pengecatan kapsul bakteri nampak secara mikroskopis tidak ada perbedaan antara kapsul sel bakteri kontaminan ulin dengan *Streptococcus lactis* atau *Enterobacter aerogenes*.

B. Saran

1. Identifikasi sel dan analisis serta ketahanan *glycocalyx* yang menyelimuti bakteri kontaminan ulin terhadap senyawa anti mikrobia perlu dilakukan.
2. Jenis senyawa anti mikrobia dan waktu sterilisasi paling efektif untuk kontaminan *in-vitro* perlu diuji.

DAFTAR PUSTAKA

Alexander, M. 1976. Introduction to Soil Microbiology. Second ed. John Wiley & Sons. New York, USA.

Anderson, R. L., R. W. Vess, J. H. Carr, W. W. Bond, A. L. Panlilio, and M. S. Favero. 1991. Investigating of Intrinsic *Pseudomonas cepacia* Contamination in Commercially Manufactured Poridone-Iodine. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 12:297-302

Anonim. 2003a. Phyto Technology Laboratories Inc. 2003. www.phytotechlab.com.

Anonim. 2003b. Sterile Culture Techniques. Phyto Technology Laboratories, Inc. www.phytotechlab.com

Atlas R. M. And R. Bartha. 1987. Microbial Ecology, Fundamental and Applications. 2nd Ed. The Benjamin/Cummings Pub. Company. Inc. California, USA.

Black, J.G. 1996. Microbiology. Principles and Applications. Third Edition. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. pp. 78-82, 84-90.

Brown, M. L., H.C. Aldrich and J.J. Gauthier. 1995. Relationship between Glycocalyx and Povidone-Iodine Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) Biofilms. Depart. of Biology, Alabama Univ. and Depart. of Microbiology & Cell Science, Florida Univ. Applied and Environmental Microbiology. p:187-193. American Society for Microbiology.

Costerton, J. W. 1984. The Etiology and Persistence of Cryptic Bacterial Infections: a hypothesis. Rev. Infect. Dis. 3(suppl.): S608-S616.

Herman, E.B. 1996. Microbial Contamination of Plant Tissue Cultures, Recent Advances in Plant Tissue Culture. Agricell Report. Volume 4, April 1996.

Kaiser, G. E. 2009. Laboratory Manual for BIOL 230. The Community College of Baltimore County, Catonsville Campus. UK.

Leifert, C. and Cassells, A. C. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 37:133-138; 2001.

Leifert, C., Morris, C. E. and Waites, W. M. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems

- in-vitro. Crit. Rev. Plant Sci. 13:139-182; 1994.
- Moat, A. G. 1979. Microbial Physiology. Marshall University, New York. John Wiley & Sons.
- Nagy, J.K., S. Sule, and J. P. Sampaio. 1995. In-vitro Cellular & Developmental Biology.: Plant Columbia:Jul/Aug 2005. Vol. 41, Iss. 4, p. 520-524 (5 pp.).
- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. 1996. Microbiology. Third Edition. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, IA. pp. 40-72.
- Putri, A. I. 2008. Pengembangan Teknik Pembiakan Vegetatif Mikro Ulin (*Eusideroxylon zwageri*). Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, Yogyakarta, Indonesia.
- Schneider, M.F., K. Lim, G. G. Fuller and M. Tanaka. 2002. Rheology of Glycocalix Model at Air/Water Interface. Biophysics Laboratory, Technical University of Munich, Garching, Germany and Department of Chemical Engineering, Stanford University, Stanford, USA.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. 1995. *Microbiology. An Introduction*. Fifth Edition. The Benjamin/Cummings Publishing, Co., Inc., Redwood City, CA, pp. 70-90.
- Tzfira, T. and V. Citovsky. 2007. *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. Springer Pub. ISBN 0387722890, 9780387722894.
- Vaughan, D. and R.E. Malcolm. 1984. Influence of Humic Substances on Growth and Physiological Processes In Soil Organic Matter and Biological Activity. Vaughan, D. and R.E. Malcolm (Eds.). Kluwer Academic Publishers Group.
- Wolf, J. B. 2007. Tissue Culture Methods. Department of Biological Sciences, University of Maryland. Baltimore County 1000 Hilltop Circle Baltimore MD 21250.