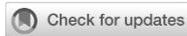


Original Research

Inisiasi Bibit Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) melalui Teknik Kultur *In vitro*



Maria Madelaine Nicole¹, Yanti¹, Listya Utami Karmawan^{1*}

¹ Program Studi Bioteknologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Jakarta – Indonesia

* corresponding author: listya.utami@atmajaya.ac.id

Abstract— *Andaliman (Zanthoxylum acanthopodium DC.) is one of the Indonesian spices that is not easy to be cultivated outside its natural habitat because it requires lower temperatures for its growth. This research aimed to determine the culture technique of andaliman plants using in vitro tissue culture techniques to solve the difficulties of plant cultivation outside its natural habitat. The explants used are seeds and nodal segments. Using seeds, methods were divided into seeds collection and sterilization and initiation. Methods using nodal segments explants were divided into sample collection, nodal sterilization, initiation, and shoot multiplication. Seed sterilization using 60 °C water which was replaced every six hours had lower contamination rate compared to other methods. Unfortunately, seeds germination and dormancy breaking were not exhibited in this research. Nodal segment sterilization using 0,1% (b/v) mercury chloride (HgCl₂) exposed for seven minutes and addition of 100 IU mL⁻¹ nystatin showed fewer contaminations. Multiplication using Murashige-Skoog (MS) media with addition of 1 ppm NAA and 5 ppm BAP (MSN₁B₅) produced nine shoots and produced callus. Overall, both explant sterilizations were successful, but it was recommended to use nodal segments as the explant due to success in producing andaliman plantlet in vitro.*

Keywords: *andaliman, HgCl₂, nystatin, plant tissue culture, woody plant medium*

Abstrak— *Andaliman (Zanthoxylum acanthopodium DC.) adalah salah satu rempah Indonesia yang sulit untuk dibudidayakan di luar habitat aslinya karena membutuhkan suhu rendah untuk pertumbuhannya. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan teknik perbanyakan tanaman andaliman menggunakan teknik kultur jaringan secara in vitro dengan memperhatikan beberapa faktor seperti larutan sterilisasi yang digunakan dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang diberikan. Eksplan yang digunakan adalah biji dan nodus. Metode penelitian dengan eksplan biji meliputi koleksi buah, germinasi, dan inisiasi eksplan. Metode penelitian dengan eksplan nodus dibagi menjadi koleksi biji, inisiasi nodus, dan multiplikasi nodus. Sterilisasi permukaan biji menggunakan air hangat bersuhu 60 °C yang diganti setiap enam jam memiliki tingkat kontaminasi yang paling rendah dibandingkan dengan metode lainnya, tetapi germinasi dan pemecahan dormansi tidak terjadi pada penelitian ini. Sterilisasi permukaan nodus menggunakan larutan merkuri klorida (HgCl₂) 0,1% (b/v) dengan durasi perendaman selama tujuh menit dan 100 IU mL⁻¹ nistatin pada media menunjukkan tingkat kontaminasi yang lebih rendah. Multiplikasi menggunakan media Murashige-Skoog dengan penambahan 1 ppm NAA dan 5 ppm BAP (MSN₁B₅) menghasilkan organ tunas dalam jumlah yang paling banyak yaitu sebanyak sembilan tunas dan terbentuk kalus. Secara keseluruhan, sterilisasi kedua eksplan berhasil dilakukan, tetapi lebih disarankan menggunakan eksplan nodus karena dapat menghasilkan tunas andaliman secara in vitro.*

Kata kunci: *andaliman, HgCl₂, kultur jaringan tanaman, nistatin, woody plant medium*

PENDAHULUAN

Indonesia dikenal sebagai negara yang kaya akan sumber daya alam, terutama komoditas rempah-rempah. Setiap daerah di Indonesia memiliki keunikan yang berbeda-beda. Banyak cara dan usaha dilakukan untuk mengelola rempah-rempah di Indonesia, tetapi sering menghadapi kendala karena budidaya tanaman di Indonesia sebagian besar masih menggunakan cara tradisional, sementara itu, beberapa tanaman cenderung sulit dibudidayakan di luar habitat aslinya. Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) adalah salah satu tanaman rempah endemik khas Sumatra Utara yang sering digunakan oleh masyarakat dari suku Batak sebagai bumbu dalam masakan dan obat-obatan tradisional. Berasal dari famili *Rutaceae*, daya tarik utama tanaman andaliman adalah buahnya yang memiliki aroma seperti jeruk yang dihasilkan dari minyak esensial citronella dan limonene. Selain itu, manfaatnya sebagai obat-obatan tradisional yang memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri menjadikan tanaman ini memiliki nilai ekonomi yang tinggi dan meningkatkan permintaan pasar akan tanaman ini (Napitupulu *et al*, 2020).

Tanaman andaliman sulit dibudidayakan di luar habitat aslinya karena membutuhkan suhu lingkungan yang rendah untuk dapat berkembangbiak dan terbatas pada daerah dan

lingkungan tertentu sesuai dengan habitatnya yaitu pada ketinggian 1,500 meter di atas permukaan laut dan suhu 18 °C, sehingga dibutuhkan metode yang dapat membantu mengatasi permasalahan tersebut (Simbolon *et al*, 2018, Siregar 2013). Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa petani andaliman menggunakan bibit liar untuk propagasi tanaman andaliman karena bijinya yang sangat sulit dikecambahkan. Hal inilah yang menjadi kendala dalam hal budidaya tanaman andaliman, sehingga digunakan teknik kultur jaringan.

Keberhasilan kultur jaringan andaliman antara lain ditentukan oleh keberhasilan sterilisasi permukaan dan ZPT yang digunakan dalam tahap multiplikasi. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi terhadap metode yang digunakan oleh varietas andaliman dari daerah Simpang Selayang untuk eksplan biji (Siregar 2013) dan adaptasi metode kultur jaringan dari genus *Zanthoxylum* lainnya untuk eksplan nodus (Purohit *et al*, 2017, Hwang 2005). Penggunaan agen sterilisasi alternatif seperti HgCl₂ serta media *woody plant medium* (WPM) dieksplorasi lebih lanjut dalam penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan teknik perbanyakan tanaman andaliman yang berasal dari Simalungun menggunakan teknik kultur jaringan secara *in vitro* dengan melihat beberapa faktor, yaitu jenis eksplan yang digunakan, metode sterilisasi, dan kombinasi ZPT pada media MS yang digunakan untuk menghasilkan organ tanaman andaliman.

METODE

Penelitian dilaksanakan sejak bulan September 2019 hingga Oktober 2020 di Laboratorium Kultur Sel dan Jaringan Fakultas Teknobiologi, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya, Cisauk, Bumi Serpong Damai. Sampel yang digunakan adalah bagian nodus dan biji andaliman yang diperoleh dari salah satu petani lokal di daerah Simalungun, provinsi Sumatra Utara. Bibit dirawat setiap hari dan biji dikupas dari buahnya.

Germinasi dan Inisiasi Eksplan Biji

Biji andaliman yang diperoleh direndam dalam berbagai perlakuan selama 24 jam; air biasa yang dianggap perlakuan kontrol (K), air hangat bersuhu 60 °C (S1), dan air hangat bersuhu 60 °C yang diganti setiap enam jam sekali (S2) (Siregar 2013). Biji yang tenggelam dalam waktu 24 jam dipindahkan dalam larutan etanol 70% dan diaduk selama lima menit kemudian dipindahkan ke dalam 5.2% larutan natrium hipoklorit (NaClO) dan diaduk selama 10, 15, dan 20 menit (Etsè *et al*, 2011). Setelah itu, biji dibilas akuades steril sebanyak 3×5 menit. Pemecahan dormansi biji dilakukan dengan cara dibakar selama 15 detik kemudian biji dikulturkan ke dalam cawan Petri steril berisi medium Murashige dan Skoog tanpa penambahan ZPT (MS0). Biji diinkubasi pada suhu 20 °C dan dalam keadaan gelap di ruang kultur.

Inisiasi Eksplan Nodus

Nodus andaliman dibersihkan terlebih dahulu menggunakan air mengalir. Setelah tahapan ini, perlakuan sterilisasi permukaan dibagi menjadi empat percobaan besar. Sterilisasi permukaan pada percobaan pertama (N1) dilakukan dengan mengaduk eksplan pada botol jar berisi larutan etanol 70% selama lima menit, lalu dipindahkan ke dalam larutan Dithane M-45 1% yang ditambahkan dua tetes Tween 20 dan diaduk selama 20 menit (Purohit *et al*, 2017, dengan modifikasi). Eksplan dibilas dengan akuades steril selama lima menit dan diaduk dengan larutan NaClO 5,25% yang ditambahkan dua tetes Tween 20 selama 20 menit (Perez-Tornero, Tallon, & Porras 2010). Eksplan dibersihkan seluruhnya dengan akuades steril sebanyak 3×5 menit. Eksplan dikultur ke dalam botol kaca berisi media MS0.

Sterilisasi permukaan pada percobaan kedua (N2), ketiga (N3), dan keempat (N4) dilakukan dengan pengadukan eksplan dengan larutan etanol 70% selama lima menit dan dibilas dengan akuades steril selama lima menit. Eksplan diaduk dengan larutan merkuri klorida (HgCl₂) 0,1% (b/v) selama tujuh menit dan dibersihkan dengan akuades steril dan diaduk selama 5×10 menit (Purohit *et al*, 2017, dengan modifikasi). Ujung-ujung nodus dibuang

dan dikulturkan ke dalam dua jenis media, yaitu media MS0 dan WPM0. Eksplan pada percobaan kedua (N2) dikultur ke dalam media MS0, sedangkan eksplan pada percobaan ketiga (N3) dan keempat (N4) dikultur ke dalam WPM0. Media WPM0 pada percobaan N4 ditambahkan antifungi berupa nistatin sebanyak 100 IU mL⁻¹. Seluruh eksplan diinkubasi di ruang kultur dengan suhu 20 °C dan dalam keadaan terang. Pengamatan dilakukan setiap tujuh hari sekali, dan keadaan eksplan diamati dan dicatat dengan pemberian skor kondisi dari skala 0 hingga 2.

Multiplikasi Nodus

Setelah pengamatan selama tujuh hari, eksplan yang bebas dari kontaminasi dipindahkan ke dalam media baru untuk dilakukan multiplikasi. Eksplan nodus dipindahkan secara aseptik dari media inisiasi ke dalam media MS yang telah disuplementasi zat pengatur tumbuh (ZPT) berupa kombinasi ZPT golongan auksin yaitu *α-naphthalene acetic acid* (NAA) dengan konsentrasi 1, 5, dan 10 ppm dan ZPT golongan sitokinin yaitu *6-benzylaminopurine* (BAP) dengan konsentrasi 5, 10, dan 15 ppm dengan total sebanyak 9 kombinasi. Media diberi kode jenis media (MS) diikuti dengan konsentrasi NAA (N) dan BAP (B), sebagai contoh MSN₁B₅ menyatakan media MS yang disuplementasi dengan 1 ppm NAA dan 5 ppm BAP. Eksplan diinkubasi di ruang kultur dengan suhu 20 °C dalam keadaan terang (Hwang 2005).

Analisis Statistik

Seluruh data yang didapat melalui tahap germinasi dan inisiasi biji dan inisiasi nodus diolah menggunakan aplikasi IBM®SPSS® for Windows versi 23. Analisis data dilakukan secara non parametrik menggunakan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji lanjut atau *post-hoc stepwise step-down*. Seluruh uji statistik yang dilakukan menggunakan selang kepercayaan 95%.

HASIL DAN BAHASAN

Penapisan biji dilakukan untuk menentukan biji yang memiliki embrio dengan ciri tenggelam dalam air. Biji tersebut jika dibelah menunjukkan adanya embrio di dalamnya yang akan bertumbuh bakal tumbuhan (Siregar 2013). Tahapan pemilihan biji sangat berpengaruh dalam keberhasilan inisiasi menggunakan biji andaliman dan dalam penelitian ini sebanyak 70%-80% biji tenggelam setelah 24 jam perendaman.

Tabel 1

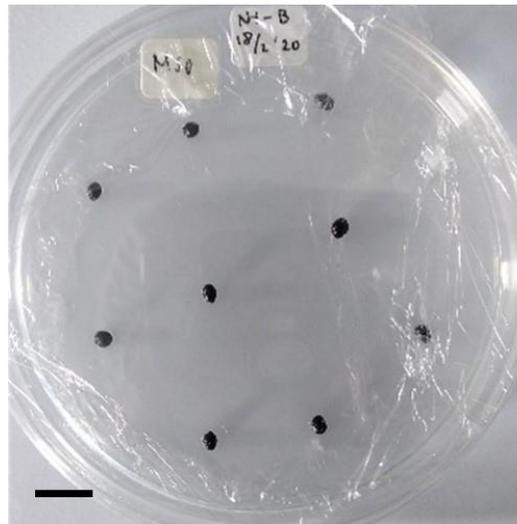
Jumlah Kontaminasi Biji dengan Tiga Metode

Metode	Waktu (menit)	Pengadukan	Kontaminasi ± Standar Error (%)
Perendaman	20		92.86 ± 7.14 ^b
	10		54.17 ± 26.68 ^{ab}
Air Hangat 60 °C, 24 jam (S1)	15		62.50 ± 21.92 ^{ab}
	20		18.52 ± 16.40 ^{ab}
Air Hangat 60 °C, 4×6 jam (S2)	10		0.00 ± 0.00 ^{ab}
	15		0.00 ± 0.00 ^a
	20		0.00 ± 0.00 ^a

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut uji Kruskal-Wallis dengan uji *post-hoc stepwise step-down* pada selang kepercayaan 95%

Perlakuan etanol 70% dan NaClO setelah perendaman bertujuan untuk sterilisasi permukaan dan bergantung pada jenis eksplan yang digunakan, konsentrasi, dan waktu

pengadukan. Konsentrasi NaClO 5.2% sebagai agen sterilisasi dinilai efektif jika dibandingkan dengan kontrol dalam mengurangi angka kontaminasi pada eksplan biji (p : 0.019, Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji *post-hoc stepwise step-down*, Tabel 1). Jika ditinjau berdasarkan variabel waktu pengadukan, waktu pengadukan 20 menit menghasilkan jumlah kontaminasi yang paling rendah yaitu $18.52 \pm 16.40\%$ pada perlakuan air hangat bersuhu $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (S1) dan 0% pada perlakuan air hangat bersuhu $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ yang diganti setiap enam jam sekali (S2) (Gambar 1). Semakin lama waktu sterilisasi permukaan, maka tingkat kontaminasi yang ditunjukkan juga diharapkan semakin menurun (Mahmoud & Al-ani 2016, Setiani, Nurwinda, & Astriany 2018).



Gambar 1. Hasil inisiasi eksplan biji dengan perlakuan air hangat bersuhu $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ yang diganti setiap enam jam sekali (S2) dengan waktu pengadukan 10 menit. Garis skala menunjukkan panjang 1 cm.

Walau demikian, perkecambahan dan pemecahan dormansi biji andaliman pada penelitian ini tidak sesuai dengan penelitian terdahulu oleh Siregar (2013). Menurut penelitian Siregar, perkecambahan biji andaliman seharusnya memakan waktu sekitar 21 hingga 100 hari setelah perkecambahan dengan menggunakan metode penyiraman biji dengan air hangat $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan dibiarkan dingin selama 24 jam (S1). Kesulitan pemecahan dormansi biji dan perkecambahan dikaitkan dengan struktur kulit andaliman yang tebal dan keras (Bodede, Shaik, & Moodley 2015). Hal ini diduga terjadi karena perbedaan varietas sampel yang berasal dari daerah yang berbeda walaupun keduanya berasal dari Sumatera Utara. Sampel Siregar (2013) diambil dari Kelurahan Simpang Selayang, Medan, sedangkan pada penelitian ini diambil dari Kelurahan Purba Dolok. Sel sklerenkim pada berbagai spesies *Zanthoxylum* menyebabkan terhambatnya imbibisi air dan pertukaran gas, termasuk senyawa yang menghambat perkecambahan biji andaliman, yaitu senyawa terpenoid (Siregar 2013).

Perlakuan penggantian air hangat sebanyak empat kali dalam kurun waktu 24 jam dan penggunaan suhu tinggi pada penelitian ini belum menunjukkan hasil yang memuaskan walaupun berhasil mengurangi tingkat kontaminasi berupa bakteri hingga 90% (Tabel 1). Beberapa kontaminan seperti cendawan maupun bakteri memiliki sifat mudah terdegradasi oleh suhu tinggi sehingga kontaminan di permukaan biji dapat berkurang (Escamilla, Rosso, & Zhang 2019). Penggunaan air hangat awalnya ditujukan untuk perlakuan germinasi bertujuan untuk membuat lunak permukaan biji sehingga imbibisi air dapat lebih mudah terjadi dan pembakaran biji berperan dalam melunakkan permukaan luar biji (Nelson *et al*, 2012). Namun demikian perlakuan air hangat ini diduga justru merusak embrio biji sehingga tidak terjadi perkecambahan dan germinasi biji. Semakin tinggi intensitas panas yang terpapar oleh biji, maka semakin besar kemungkinan embrio akan rusak dan biji mengalami mortalitas (Walters, Midgley, & Somers 2004).

Nodus sebagai sumber eksplan lainnya menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan eksplan biji. Efektivitas metode sterilisasi eksplan nodus dinilai berdasarkan jumlah kontaminasi yang terjadi (Tabel 2). Percobaan N2 menghasilkan jumlah kontaminasi paling rendah dan menunjukkan efektivitas yang paling tinggi menurut skor kondisi yang hampir mencapai angka dua. Keadaan eksplan pada percobaan keempat terlihat segar dan tidak menunjukkan adanya kontaminasi (Gambar 2).

Tabel 2

Jumlah Kontaminasi Nodus dengan Empat Percobaan

Percobaan	Metode	Media	Kontaminasi (%)	Skor Kondisi ± Standar Error (%)
N1	NaClO	MSO	87.50	0.13 ± 0.13 ^a
N2		MSO	0.00	1.50 ± 0.50 ^b
N3	HgCl ₂	WPMO	50.00	0.50 ± 0.50 ^{ab}
N4		WPMO + Nistatin	31.03	1.38 ± 0.13 ^b

Keterangan: 0 = kontaminasi, 1 = tidak ada kontaminasi dan tidak hidup; 2 = tidak ada kontaminasi dan hidup. Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata menurut uji Kruskal-Wallis dengan uji *post-hoc stepwise step-down* pada selang kepercayaan 95%



Gambar 2. Hasil inisiasi nodus andaliman percobaan N4, yaitu dengan larutan sterilisasi berupa HgCl₂ dan media WPMO yang ditambahkan nystatin. Garis skala menunjukkan panjang 1 cm.

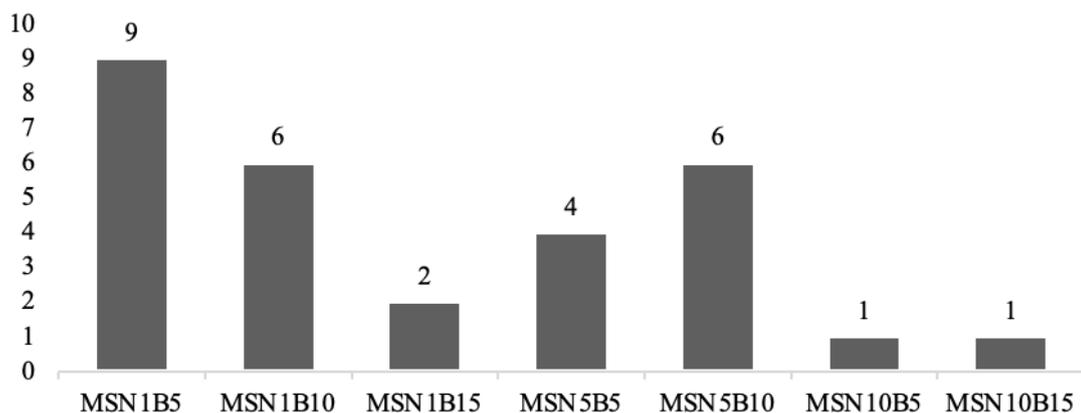
Tahapan inisiasi nodus juga menggunakan beberapa larutan sterilisasi seperti etanol 70%, Dithane M-45 1%, NaClO 5.2%, dua tetes Tween 20, dan HgCl₂ 0,1% (b/v). Dithane M-45 merupakan fungisida *broad spectrum* yang berfungsi untuk mengurangi resiko kontaminasi atau penyakit pada tanaman yang disebabkan oleh cendawan (Sari & Noli 2014). Penambahan Tween 20 pada percobaan N1 berfungsi sebagai surfaktan untuk mengurangi tegangan permukaan, sehingga larutan sterilisasi dapat merata secara menyeluruh pada permukaan eksplan (Elbasheer *et al*, 2019).

Inisiasi menggunakan agen sterilisasi HgCl₂ secara keseluruhan menunjukkan jumlah kontaminasi yang lebih rendah dibanding menggunakan NaClO (87.50%), dan jumlah kontaminasi terendah ditunjukkan oleh percobaan N2 dengan tingkat kontaminasi sebesar 0% (p: 0.003, Kruskal-Wallis dilanjutkan dengan uji *post-hoc stepwise step-down*, Tabel 2).

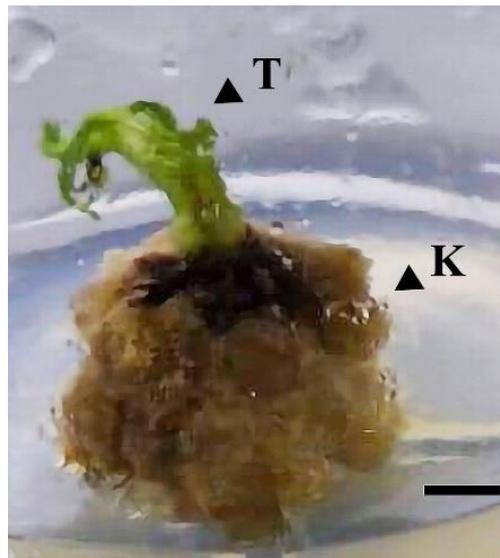
Walaupun percobaan N2, N3, dan N4 menggunakan metode sterilisasi yang sama menggunakan HgCl₂, percobaan N2 menghasilkan jumlah kontaminasi terendah dibandingkan dengan dua perlakuan lainnya. Salah satu faktor ada atau tidaknya kontaminasi pada kultur jaringan tanaman, selain melihat dari efektivitas metode sterilisasi, juga melihat dari kondisi tanaman yang dikulturkan. Keberadaan bakteri atau cendawan endofit pada eksplan yang dikulturkan dapat mempengaruhi jumlah kontaminasi yang dihasilkan jika metode sterilisasi eksplan kurang efektif dalam menekan pertumbuhan bakteri atau cendawan (Volk *et al*, 2022).

Penggunaan HgCl₂ dan media yang ditambahkan nistatin yang bersifat fungisidal atau fungistatik pada percobaan N4 mengurangi kontaminasi yang terjadi akibat bakteri dan cendawan, sehingga mendukung tahapan sterilisasi eksplan (Huh *et al*, 2015, Dos Santos *et al*, 2017). Penggunaan nystatin pada percobaan N4 bertujuan untuk mengurangi kontaminasi yang disebabkan oleh cendawan tetapi tidak efektif untuk mengurangi kontaminasi bakteri karena tidak memiliki aktivitas antibakterial. Walaupun pertumbuhan bakteri dapat dihambat pada percobaan N4, kontaminasi cendawan mendominasi jenis kontaminan yang ditemukan pada percobaan N4. Hal ini disebabkan karena nistatin bekerja lebih efektif pada beberapa genus cendawan seperti *Candida*, *Blastomyces*, dan *Histoplasma* (Baldino *et al*, 2021). Konsentrasi HgCl₂ yang digunakan tidak bersifat fitotoksik terhadap eksplan, dibuktikan dengan adanya eksplan pada percobaan N3 yang tetap dapat berkembang. Pemilihan waktu tujuh menit menghasilkan fitotoksisitas yang rendah dan dapat mengendalikan jumlah kontaminasi (Mahmoud & Al-ani 2016). Skor kondisi diukur dengan angka nol hingga dua. Semakin mendekati angka dua, berarti tahapan inisiasi yang dilakukan semakin efektif dalam mengurangi tingkat kontaminasi. Skor kondisi paling tinggi ditunjukkan oleh percobaan N2, sehingga dapat dikatakan bahwa inisiasi percobaan N2 menunjukkan efektivitas yang paling tinggi di antara seluruh percobaan.

Multiplikasi nodus andaliman menghasilkan kalus dan organ tunas. Keberadaan kedua organ menggambarkan efek dari penambahan kombinasi ZPT terhadap perkembangan eksplan (Gambar 3 dan 4). Multiplikasi nodus andaliman menggunakan dua ZPT yaitu NAA dan BAP. NAA merupakan ZPT golongan auksin yang banyak digunakan dalam kultur jaringan dan berperan dalam pembelahan sel dan pembentukan akar (Phuyal *et al*, 2018), sementara BAP adalah ZPT golongan sitokinin (senyawa turunan adenin) yang berperan dalam merangsang pembentukan tunas (Purohit *et al*, 2017). Secara umum, kedua ZPT ini dimiliki setiap tanaman dalam jumlah yang berbeda-beda dan penambahan ZPT secara eksternal biasanya efektif dalam jumlah sedikit. Multiplikasi nodus pada penelitian ini menghasilkan organ seperti tunas dan kalus. Jumlah tunas terbanyak didapat dari kombinasi ZPT NAA 1 ppm dan BAP 5 ppm (MSN₁B₅, Gambar 3, Gambar 4) dan kalus dihasilkan oleh kombinasi MSN₁B₅, MSN₅B₅, dan MSN₅B₁₀. Banyaknya tunas dihasilkan dari konsentrasi BAP yang lebih besar daripada konsentrasi NAA, sehingga pembentukan tunas menjadi maksimal pada kombinasi ZPT ini. Kalus dihasilkan pada kadar auksin dan sitokinin yang seimbang, ditunjukkan oleh ketiga kombinasi ZPT.



Gambar 3. Jumlah tunas dari hasil multiplikasi nodus pada media MS yang disuplementasi NAA dan BAP.



Gambar 4. Hasil multiplikasi nodus dengan kombinasi zat pengatur tumbuh MSN₁B₅, yaitu kombinasi NAA 1 ppm dan BAP 5 ppm. Garis skala menunjukkan panjang 1 cm, huruf “T” menunjukkan tunas dan huruf “K” menunjukkan kalus.

SIMPULAN

Secara umum, tahapan sterilisasi biji andaliman berhasil dilakukan, tetapi tidak disarankan untuk menggunakan eksplan ini karena tahapan germinasi dan pemecahan dormansi tidak terjadi. Tahapan inisiasi eksplan nodus dilakukan dengan menggunakan larutan sterilisasi berupa HgCl₂ 0,1% (b/v) dengan durasi perendaman selama tujuh menit dan penambahan 100 IU mL⁻¹ nistatin pada media pertumbuhan. Penggunaan ZPT dengan kombinasi NAA 1 ppm dan BAP 5 ppm pada media MS menghasilkan organ tanaman yang lebih beragam dan dalam jumlah yang lebih banyak dibanding perlakuan kombinasi ZPT lainnya, yaitu dihasilkan tunas dan kalus. Penggunaan media WPM sebagai media multiplikasi dapat dipelajari lebih lanjut untuk membandingkan jumlah organ atau kalus yang dihasilkan eksplan pada media multiplikasi yang berbeda.

PUSTAKA ACUAN

- Baldino, MEL, Medina-Silva, R, Sumiensi, J, Figueiredo, MA, Salum, FG & Cherubini, K 2021, 'Nystatin effect on chlorhexidine efficacy against *Streptococcus mutans* as planktonic cells and mixed biofilm with *Candida albicans*', *Clin Oral Investig*, Vol. 26, No. 1, pp. 633–642.
- Bodede, O, Shaik, S, & Moodley, R 2015, 'Germination response of *Zanthoxylum capense* (small knobwood) seeds to different pre-treatment protocols', *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*.
- Elbasheer, YHA, Alem, SA, Lbadri, E, Osman, E, & Sheehama, J 2019, 'Feasible surface sterilization protocol for microbial contamination of some forest trees on in vitro cultures explants', *Acta Scientific Microbiology*, Vol. 2, No. 5, pp. 55–60.
- Escamilla, D, Rosso, ML, & Zhang, B 2019, 'Identification of fungi associated with soybeans and effective seed disinfection treatments', *Food Science and Nutrition*, Vol. 7, No. 10, pp. 3194–3205.
- Etsè, KD, Aidam, AV, Souza, C De, Crèche, J, & Lanoue, A 2011, 'In vitro propagation of *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam., an endangered African medicinal plant', *Acta Bot. Gallica.*, Vol. 158, No. 1, pp. 47–55.

- Huh, YS, Lee, JK, Kim, IJ, Kang, BG, & Lee, KY 2015, 'Effect of biocide addition on plantlet growth and contamination occurrence during the in vitro culture of blueberry', *Journal of Plant Biotechnology*, Vol. 42, No. 2, pp. 111–116.
- Hwang, SJ 2005, 'An efficient in vitro propagation of *Zanthoxylum piperitum*', *Acta Hort.*, Vol. 676, pp. 89–94.
- Mahmoud, SN & Al-ani, NK 2016, 'Effect of different sterilization methods on contamination and viability of nodal segments of *Cestrum nocturnum* L', *International Journal of Research Studies in Biosciences*, Vol. 4, No. 1, pp. 4–9.
- Napitupulu, FIR, Wijaya, CH, Sulistiyan, Prangdimurti, E, Akyla, C, Yakhin, LA & Indriyani, S 2020, 'Comparison of Several Processing Methods in Preserving the Flavor Properties of Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) Fruit', *J Eng Technol Sci*, Vol. 52, No. 3, pp. 399–412.
- Nelson, DC, Flematti, GR, Ghisalberti, EL, Dixon, KW, & Smith, SM 2012, 'Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation', *Annual Review of Plant Biology*.
- Perez-Tornero, O, Tallon, CI, & Porras, I 2010, 'An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments', *Plant Cell Tiss Organ Cult*, Vol. 100, No. 3, pp. 263–271.
- Phuyal, N, Jha, PK, Raturi, PP, Gurung, S, & Rajbhandary, S 2018, 'Effect of growth hormone and growth media on the rooting and shooting of *Zanthoxylum armatum* stem cuttings', *Banko Janakari*, Vol. 28, No. 2, pp. 3–12.
- Purohit, S, Jugran, AK, Bhatt, ID, Palni, LMS, Bhatt, A, & Nandi, SK 2017, 'In vitro approaches for conservation and reducing juvenility of *Zanthoxylum armatum* DC: an endangered medicinal plant of Himalayan region', *Trees - Structure and Function*, Vol. 31, No. 3, pp. 1101–1108, Springer Berlin Heidelberg.
- Dos Santos, AG, Marquês, JT, Carreira, AC, Castro, IR, Viana, AS, Mingeot-Leclercq, MP, De Almeida, RFM, & Silva, LC 2017, 'The molecular mechanism of Nystatin action is dependent on the membrane biophysical properties and lipid composition', *Physical Chemistry Chemical Physics*.
- Sari, EM & Noli, A 2014, 'Pengaruh penggunaan fungisida (Dithane M-45) terhadap pertumbuhan tanaman jagung (*Zea mays* L.) dan kepadatan spora fungi mikoriza arbuskula (FMA)', *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, Vol. 3, No. 3, pp. 188–194.
- Setiani, NA, Nurwinda, F, & Astriany, D 2018, 'Pengaruh desinfektan dan lama perendaman pada sterilisasi eksplan daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson ex. F.A Zorn) Fosberg)', *Biotropika - Journal of Tropical Biology*.
- Simbolon, WI, Kardhinata, EH, Bangun, MK, & Simatupang, S 2018, 'Identifikasi karakter morfologis andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) di beberapa kabupaten di Sumatera Utara', *Jurnal Agroekoteknologi FP USU*, Vol. 6, No. 4, pp. 745–756.
- Siregar, BL 2013, 'Perkecambahan dan pematangan dormansi benih andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.)', *J. Agron. Indonesia*, Vol. 41, No. 3, pp. 249–254.
- Volk, GM, Bonnart, R, de Oliveira, ACA & Henk, AD 2022, 'Minimizing the deleterious effects of endophytes in plant shoot tip cryopreservation', *Applications in Plant Sciences*.
- Walters, M, Midgley, JJ, & Somers, MJ 2004, 'Effects of fire and fire intensity on the germination and establishment of *Acacia karroo*, *Acacia nilotica*, *Acacia luederitzii* and *Dichrostachys cinerea* in the field', *BMC Ecology*.