

OPTIMASI STERILISASI EKSPLAN DAUN TANAMAN LIDAH MERTUA (*Sansevieria* sp.) PADA KULTUR *IN VITRO*

Ade Tiyan Handayani^{1*}, Edhi Sandra², dan Hanik Faizah³

^{1&3}Program Studi Biologi, FST, Universitas Islam Negeri Sunan Ampel Surabaya, Indonesia

²Esha Flora Bogor, Indonesia

*E-Mail : h71219016@student.uinsby.ac.id

DOI : <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v10i1.4808>

Submit: 29-01-2022; Revised: 23-02-2022; Accepted: 07-03-2022; Published: 30-06-2022

ABSTRAK: Keberadaan *Sansevieria* sp. sebagai tanaman hias yang banyak manfaat perlu dilestarikan. Namun, perbanyakannya secara konvensional membutuhkan banyak bahan dan waktu lama. Stek daun hanya mampu menghasilkan 1-2 tanaman dalam 2 bulan, dan berhenti saat berusia 5 bulan. Sedangkan pemisahan anakan (*Tillering*) hanya menghasilkan 2-3 tanaman dari 1 rumpun selama 5 bulan. Kultur jaringan dapat menjadi solusinya, tetapi sterilisasi harus dilakukan untuk meminimalisir kontaminasi tanpa mematikan *eksplan*. Penelitian bertujuan untuk mengetahui konsentrasi $HgCl_2$ dan durasi pengocokan yang optimal pada sterilisasi *eksplan* daun *Sansevieria* sp. Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 2 faktor. Faktor pertama yaitu konsentrasi $HgCl_2$ dengan 3 taraf (4%, 7%, dan 10%) dan faktor kedua yaitu durasi pengocokan dengan 4 taraf (3, 5, 7, dan 9 menit). Masing-masing perlakuan termasuk kontrol negatif dilakukan pada saat sterilisasi *eksplan* di dalam *Laminar Air Flow*. Data dianalisis dengan uji ANOVA atau *Kruskal-Wallis*. Dilanjutkan uji BNJ 5% apabila berbeda nyata. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi $HgCl_2$ berpengaruh signifikan terhadap parameter waktu awal kontaminasi, masa steril *eksplan*, dan persentase *eksplan browning*, tapi tidak berpengaruh signifikan terhadap persentase *eksplan* terkontaminasi. Konsentrasi yang terlalu tinggi mampu memperlambat munculnya kontaminasi, memperlama masa steril, tapi mengakibatkan *eksplan browning*. Diketahui bahwa durasi pengocokan *eksplan* dalam $HgCl_2$ tidak berpengaruh signifikan terhadap seluruh parameter. Penggunaan $HgCl_2$ 10% dengan durasi pengocokan 7 menit (H3P3) diketahui paling optimal untuk sterilisasi *eksplan Sansevieria* sp., karena mampu mengurangi kontaminasi eksternal, memperlama masa steril hingga 12,33 HST, dan tidak menyebabkan terlalu banyak *eksplan browning* yaitu 33,33%.

Kata Kunci: Kultur Jaringan, Sterilisasi *Eksplan*, *Sansevieria* sp.

ABSTRACT: The existence of *Sansevieria* sp. as an ornamental plant that has many benefits preserved. However, conventional propagation requires a lot of materials and time long. Leaf cuttings are only able to produce 1-2 plants in 2 months, and stop when they are aged 5 months. While the separation of tillers (*Tillering*) only produces 2-3 plants from 1 clump for 5 months. Tissue culture can be the solution, but sterilization must be done to minimize contamination without killing explants. The research aims to find out optimal concentration of $HgCl_2$ and duration of shaking on the sterilization of *Sansevieria* leaf explants sp.. The research design used a completely randomized design with 2 factors. first factor namely the concentration of $HgCl_2$ with 3 levels (4%, 7%, and 10%,) and the second factor is duration shuffled with 4 levels (3, 5, 7, and 9 minutes). Each treatment includes a negative control performed at the time of explant sterilization in *Laminar Air Flow*. Data analyzed by test ANOVA or *Kruskal-Wallis*. Followed by the 5% BNJ test if it is significantly different. Results show that the concentration of $HgCl_2$ has a significant effect on the parameters of the initial time of contamination, the mass sterility of explants, and percentage of browning explants, but had no significant effect on percentage of contaminated explants. Concentration that is too high can slow down the appearance of contamination, prolonging the sterile period, but causing browning of explants. Known that the duration of explant shaking in $HgCl_2$ had no significant effect on all parameter. The use of 10% $HgCl_2$ with a shaking duration of 7 minutes (H3P3) is known to be the most effective optimal for sterilization of





explants Sansevieria sp. because it is able to reduce external contamination, prolongs the sterile period up to 12.33 HST, and does not cause too many explants browning that is 33.33%.

Keywords: Tissue Culture, Explant Sterilization, *Sansevieria sp.*



Bioscientist : Jurnal Ilmiah Biologi is Licensed Under a [CC BY-SA. Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

PENDAHULUAN

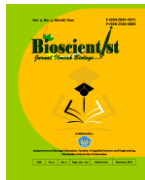
Lidah mertua (*Sansevieria sp.*) termasuk dalam famili *Agavaceae* yang dikenal dengan susunan daun rapat dari batang dan tebal (Anjani *et al.*, 2020). Sebagian besar dari benua Afrika dan dari Asia yang mencakup lebih dari 600 kultivar. Sekitar 100 kultivar terdapat di Indonesia dengan bentuk dan warna menarik. Menurut Badan Antariksa Amerika Serikat, *Sansevieria sp.*, berguna sebagai penyerap berbagai senyawa kimia berbahaya seperti *formaldehid*, *kloroform*, *benzena*, *trikloroetilen*, dan *xilen* (Yusnita *et al.*, 2013). Lebih dari 107 unsur polutan udara mampu diserapnya karena memiliki banyak stomata dan mengandung *pregnane glikosid* sebagai pereduksi polutan hingga menjadi asam organik, gula, dan asam amino. Menurut hasil penelitian *Wolverton Environmental Service*, satu helai daunnya mampu menyerap 0,938 mg *formaldehid* dalam satu jam (Megia *et al.*, 2015). Seratnya mampu menjadi obat gigitan ular, antiseptik, dan antioksidan (Muliati *et al.*, 2017). Serat *S. Trifasciata* yang lembut dapat dijadikan bahan baku industri seperti benang, tali, bahan kap lampu, dan campuran komposit karena memiliki banyak *selulosa* dan sedikit *lignin* (Anjani *et al.*, 2020). Ekstrak akar *S. liberica* diketahui mengandung zat antikanker (Rachmandhika, 2017).

Banyak manfaat dari tanaman lidah mertua, sehingga penting dilakukan perbanyakan, terutama untuk melestarikannya, seperti melalui stek daun dan pemisahan anakan. Namun, metode tersebut memerlukan banyak bahan tanam dan waktu yang relatif lama. Umumnya perbanyakan secara stek daun dalam 2 bulan hanya menghasilkan 1-2 tanaman, dan ketika mencapai usia 5 bulan jumlah tanaman yang diproduksi tidak bertambah. Demikian dengan metode pemisahan anakan, hanya mampu menghasilkan 2-3 anakan dari satu rumpun tanaman dengan 2-3 daun selama 5 bulan (Yusnita *et al.*, 2013).

Perbanyakan secara konvensional dianggap lambat, sehingga perlu diatasi dengan metode alternatif untuk menghasilkan bibit bermutu dalam jumlah banyak dan dalam waktu singkat, yaitu melalui kultur jaringan (*in vitro*) yang mengacu pada konsep sifat totipotensi sel tanaman (Sulistiyo *et al.*, 2018). Metode ini dilakukan dengan mengisolasi bagian kecil seperti sel, proto plasma, jaringan atau organ dari tanaman, kemudian menumbuhkannya pada media aseptis untuk menjadi individu baru dengan sifat seperti induknya (Prameswari *et al.*, 2019).

Kultur jaringan dapat dikembangkan untuk meningkatkan hasil tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat, terutama yang berstatus terancam punah, lambat pertumbuhannya atau sulit berkembang (Rahmawati & Sandra, 2021). Namun, salah satu kendalanya adalah jika terjadi kontaminasi, karena dalam





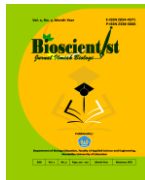
pelaksanaannya membutuhkan kondisi aseptik atau steril. Kontaminan dapat menghambat pertumbuhan *eksplan* menjadi tanaman utuh. Faktor eksternal penyebab kontaminasi yaitu dari lingkungan kerja yang kurang baik, ruangan kultur yang kotor, maupun pelaksanaan prosedur yang ceroboh seperti saat penanaman di enkas atau laminar (Saepudin *et al.*, 2020).

Kontaminasi juga bisa terjadi karena pembuatan media dan instrument kultur kurang steril. Media steril jika terlalu lama disimpan pada tempat lembab dan kotor dapat terkontaminasi meskipun belum digunakan, itu terjadi akibat tingginya tingkat populasi *inokulum* mikro organisme di udara yang lembab maupun suhu terlalu tinggi (Saepudin *et al.*, 2020). Semakin kaya akan nutrisi maka semakin tinggi tingkat kontaminasi suatu media (Saputri *et al.*, 2019). Selain faktor eksternal, terdapat faktor internal penyebab kontaminasi, yaitu dari dalam jaringan *eksplan* yang dapat terjadi akibat prosedur sterilisasi *eksplan* kurang baik. Kontaminasi jenis ini bersifat *endogenous* sehingga tidak bisa hilang jika sekadar sterilisasi permukaan (Fitriani *et al.*, 2019).

Sterilisasi merupakan proses untuk meminimalisir mikroorganisme kontaminan pada kultur jaringan. Agen sterilan yang digunakan di antaranya alkohol, $HgCl_2$, $NaClO$, dan H_2SO_4 pekat (Gantait *et al.*, 2018). Teknik dan sterilan setiap *eksplan* berbeda-beda tergantung dari jenis tanaman atau kepekaan material tanaman (Fitriani *et al.*, 2019). Penggunaan $HgCl_2$ sebagai sterilan belum banyak dilakukan dalam sterilisasi *eksplan* tanaman lidah mertua, akan tetapi sudah banyak digunakan terhadap tanaman lain, seperti pada penelitian Admojo & Prasetyo (2016) yang menggunakan $HgCl_2$ 0,2% selama 3 menit untuk menekan kontaminasi *eksplan petiol* tanaman karet hingga 33%. Penelitian oleh Rahmadi *et al.* (2020) menggunakan $HgCl_2$ 0,1% selama 1 menit juga memperoleh persentase hidup pada *eksplan* tunas tanaman durian sebesar 80%.

Fitriani *et al.* (2019) membuktikan bahwa sterilisasi dengan $HgCl_2$ 0,1% selama 10 menit paling mampu meminimalisir kontaminasi pada *eksplan* daun nilam dibandingkan *clorox* 20% dan $AgNO_3$ 0,1%. Fauzan *et al.* (2017) dalam penelitiannya menggunakan $HgCl_2$ dengan konsentrasi 300 mg/L dapat menekan kontaminasi jamur hingga 100% dan bakteri hingga 75%, serta menghasilkan tingkat *eksplan* aseptik dan hidup sebesar 85% pada 9 hari setelah perlakuan. Sementara pada penelitian Tiwari *et al.* (2012) dengan $HgCl_2$ 0,2% selama 12 menit mengakibatkan *browning* dan kematian *eksplan* tanaman tebu pada hari ke 4-7 setelah tanam.

Menurut Sulistiyo *et al.* (2018), penggunaan merkuri klorida diketahui efektif, tetapi tergolong *toksik* terhadap lingkungan karena sulit untuk diuraikan. Perlakuan pengocokan *eksplan* yang lama dalam $HgCl_2$ berkonsentrasi tinggi dapat memberikan rata-rata *browning* tertinggi, sehingga berkemungkinan menyebabkan kerusakan pada sel tanaman atau kematian *eksplan*. Pada prinsipnya, sterilisasi *eksplan* harus mampu memusnahkan kontaminan tanpa mematikan *eksplan* (Gantait *et al.*, 2018). Penelitian terkait optimasi sterilisasi *eksplan* ini dilakukan untuk mendapatkan kombinasi konsentrasi $HgCl_2$ dan durasi pengocokan *eksplan* di dalamnya yang tepat agar tercapai keberhasilan pada



kultur jaringan lidah mertua, sehingga dapat diterapkan pada penelitian berikutnya.

METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada Juli-September 2021 di *Esha Flora Plant and Culture*, Jl. Kemuning VI Blok M.6 No. 9, Taman Cimanggu, Bogor.

Bahan Eksplan

Tanaman induk *Sansevieria masoniana* untuk sumber *eksplan* terlebih dahulu dipelihara dalam nurseri *Esha Flora* selama 3 bulan. Bagian tanaman yang digunakan sebagai *eksplan* diambil dari daun paling muda yang dipotong bagian atas atau ujungnya, lalu dimasukkan ke dalam botol untuk selanjutnya disterilisasi di luar dan di dalam *Laminar Air Flow* sebelum dilakukan penanaman.

Sterilisasi Alat dan Air Steril

Alat dibungkus koran lalu disterilisasi dengan *autoklaf* \pm 1 jam pada suhu 121°C dengan tekanan 17,5 psi. Saat penanaman, alat diseksi disterilisasi dengan mencelupkannya dalam alkohol 70% dan membakarnya. Air dimasukkan ke dalam botol kultur sebanyak $\frac{3}{4}$ botol. Mulut botol ditutup agak longgar lalu disterilisasi dengan *autoklaf*. Sterilisasi air dilakukan selama \pm 1 jam. Jika sudah, botol ditutup rapat dan disimpan pada ruang inkubasi hingga digunakan.

Pembuatan Media MS

Media yang digunakan adalah media *Murashige-skoog* yang mengandung unsur makro dan mikro (Larutan A-F), $0,2 \text{ gL}^{-1}$ pepton, $0,2 \text{ mL}^{-1}$ PPM, 10 mL^{-1} *Myo-inositol*, 30 gL^{-1} gula, ditambah $0,5 \text{ mL}^{-1}$ BAP. Media diatur derajat keasamannya menjadi 5. 8-7, lalu ditambahkan 6 g L^{-1} pematat. Dididihkan lalu dituangkan ke dalam botol kultur sebanyak \pm $\frac{1}{6}$ botol. Mulut botol ditutup plastik tahan panas dan diikat erat dengan karet. Botol berisi media disterilisasi dalam *autoklaf* pada suhu 121°C dengan tekanan 17,5 psi selama 30 menit.

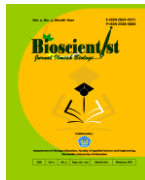
Sterilisasi Ruang Kerja (*Laminar Air Flow*)

Tangan pekerja dan bagian dalam *Laminar Air Flow* disemprotkan dengan alkohol 70%, lalu diusap dengan *tissue* hingga kering. Selanjutnya alat atau bahan kultur juga disemprotkan dengan alkohol 70%, kemudian dimasukkan ke dalam LAF (kecuali *eksplan*). LAF ditutup, lalu dinyalakan UV selama 10 menit-24 jam. Jika sudah, UV dimatikan. *Blower* dan lampu dinyalakan jika ingin digunakan.

Inisiasi dan Sterilisasi *Eksplan*

Mula-mula *eksplan* daun disterilisasi di luar *Laminar Air Flow*. Permukaannya dibersihkan menggunakan alkohol 70% dan dicuci dengan air keran. *Eksplan* dikocok dalam larutan *detergen* 1 gram/100 ml selama 3 menit dan dibilas dengan air, kemudian dimasukkan ke larutan bakterisida dan fungisida 0,2 gram/100 ml selama 30 menit, dibilas dengan air. *Eksplan* dimasukkan dalam botol berisi larutan *Streptomycine* 10%, lalu mulut botol ditutup dengan plastik dan diaerasi selama 2 jam.

Tahap berikutnya yaitu *eksplan* daun disterilisasi di dalam *Laminar Air Flow*. *Eksplan* dimasukkan ke dalam botol berisi air steril sambil dikocok selama 3 menit. *Eksplan* dikocok dalam HgCl_2 dengan konsentrasi dan durasi



pengocokan sesuai perlakuan, lalu dibilas kembali dengan air steril. *Eksplan* dikocok dalam larutan pemutih pakaian (*bayclin*) 15% dan 5% masing-masing selama 7 menit, dibilas dengan air steril, lalu ditiriskan dengan *tissue* steril pada cawan petri.

Penanaman Eksplan

Eksplan dipotong-potong hingga berukuran 0,5x0,5 cm menggunakan *scapel* dan bantuan *pinset*. Mulut botol berisi media dan *pinset* dipanaskan pada api *bunsen*, dimasukkan *pinset* pada air terlebih dahulu, kemudian dilakukan penanaman dengan posisi *eksplan* melintang. Mulut botol dipanaskan kembali dan ditutup dengan lastik, diikat karet, dan diberi label berisi keterangan kode perlakuan, nama tanaman, media, tanggal, dan nama penanam. Penutupan tutup botol dilengkapi lagi dengan *aluminium foil*, dilakukan pengkaretan lagi, dan dilapisi dengan plastik *wrap*.

Penyimpanan dan Pengamatan

Botol berisi *eksplan* disimpan pada rak inkubasi bersuhu 25°C dan penerangan 40 *watt*. Pengamatan dilakukan secara visual hingga 2 MST. Mulai dari hari pertama yaitu pengamatan awal muncul dan jenis kontaminasi, kemudian terhadap parameter lainnya.

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor. Faktor pertama yaitu konsentrasi $HgCl_2$ terdiri dari 3 taraf yaitu 4%, 7%, dan 10%. Faktor kedua adalah durasi pengocokan terdiri dari 4 taraf yaitu 3 menit, 5 menit, 7 menit, dan 9 menit. Penelitian terdiri dari 13 perlakuan, termasuk perlakuan kontrol negatif, dengan 3 kali pengulangan. Parameter yang diamati meliputi waktu awal kontaminasi, masa steril *eksplan*, persentase *eksplan* terkontaminasi, dan persentase pencoklatan (*browning*). Satuan parameter persentase kontaminasi atau pencoklatan (*browning*) adalah berapa banyak *eksplan* terkontaminasi atau *browning* dalam satuan persen (%), dengan rumus hitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Kontaminasi} : \frac{\sum \text{Eksplan /media terkontaminasi}}{\sum \text{Total seluruh h eksplan /media}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Browning} : \frac{\sum \text{Eksplan mengalami pencoklatan}}{\sum \text{Total seluruh h eksplan}} \times 100\%$$

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan aplikasi SPSS 22, dengan uji *Two Way Anova* pada taraf kepercayaan 95%, kemudian untuk data yang berdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *BNJ* 5% pada tingkat signifikansi sebesar 5%. Sedangkan data yang tidak memenuhi syarat normalitas dan homogenitas, dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis*. Jika berbeda nyata dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui beda di antara kelompok perlakuan. Hasilnya dianalisis secara deskriptif atau dibandingkan berdasarkan studi literatur.



HASIL DAN PEMBAHASAN

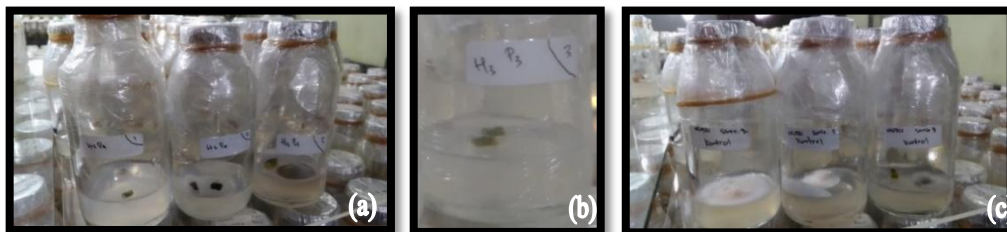
Pemilihan ujung daun *Sansevieria* sp, sebagai *eksplan* bertujuan untuk meminimalisir kontaminasi karena jaringan muda diketahui mengandung lebih sedikit kontaminan dibandingkan bagian lainnya. Selain itu, terdapat sel-sel yang aktif membelah sehingga lebih cepat menunjukkan respon pertumbuhan setelah dikulturkan (Sulistiani & Yani, 2014). Tidak hanya pemilihan *eksplan*, sterilisasi *eksplan* juga mempengaruhi keberhasilan kultur *Sansevieria* sp., hal tersebut dapat diketahui dengan mengamati beberapa parameter seperti waktu awal kontaminasi, masa steril *eksplan*, persentase *eksplan* terkontaminasi, dan persentase *eksplan* mengalami pencoklatan atau *browning*.

Waktu Awal Muncul Kontaminasi (HST)

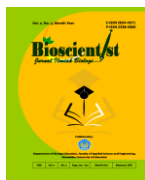
Hasil pengamatan terhadap parameter waktu awal kontaminasi memperlihatkan perbedaan, hal ini dapat dipengaruhi oleh kontaminasi eksternal yang dapat terlihat langsung secara visual (Rahmawati & Sandra, 2021). Umumnya, respon kontaminasi akan semakin cepat jika mikro organisme terdapat di permukaan tanaman, dalam durasi 2x24 jam sudah dapat terlihat. Namun, respon dapat lebih lambat jika terdapat mikro organisme *endofit*, yaitu dalam rentang waktu lebih dari 7 atau bahkan satu bulan (Fitriani *et al.*, 2019).

Pada penelitian ini, kontaminan pertama yang muncul dalam kurun waktu 1-7 HST terjadi pada *eksplan* dengan perlakuan H0P0, H1P1, H1P2, H1P3, dan H2P3. Demikian juga kontaminan yang muncul pertama kali dalam kurun waktu 7-14 HST terjadi pada *eksplan* dengan perlakuan H1P4, H2P1, H2P2, H2P4, H3P1, H3P2, H3P3, dan H3P4.

Sterilisasi menjadi proses terpenting pada kultur jaringan untuk memusnahkan berbagai kontaminan, Sterilisasi instrument, media tanam, maupun *eksplan* yang kurang sempurna memungkinkan kontaminasi terjadi (Nida *et al.*, 2021). Kontaminasi yang muncul kurang dari seminggu termasuk dalam jenis kontaminasi eksternal. Sedangkan jika muncul setelah satu minggu hingga sebulan berikutnya termasuk kontaminasi internal atau bersumber dari mikroba *endofit* yang berasosiasi di dalam jaringan tanaman (Joko & Arwiyanto, 2021). Kontaminasi internal dapat disebabkan akibat unsur hara dari media banyak diserap oleh *eksplan*, lalu memicu bakteri dalam jaringan keluar dan berkembang pada media. Selain itu, keadaan lingkungan *in vitro* yang memiliki banyak unsur hara dan sukrosa dan kelembaban yang tinggi mampu mendorong pertumbuhan mikroba *endofit* (Wulandari *et al.*, 2017).



Gambar 1. *Eksplan* Terkontaminasi. a) Jamur; b) Bakteri; dan c) Jamur dan Bakteri.



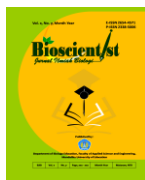
Kontaminasi pada berbagai perlakuan muncul mulai hari kedua setelah tanam sampai akhir pengamatan dengan sumber yang didominasi oleh jamur berwarna putih hingga kehitaman seperti pada gambar 1a. Jamur yang mendominasi diduga akibat adanya kontak antara daun dengan udara yang mengandung spora jamur. Banyaknya jamur yang tumbuh membuat *eksplan* tidak mempunyai ruang untuk tumbuh dalam botol, sehingga pertumbuhannya terhambat dan mati (Shofiyani *et al.*, 2020). Kontaminasi jamur ditandai dengan garis seperti benang *miselium* atau *hifa* akibat terdapat spora atau koloni jamur yang lama-kelamaan menyebar di permukaan dan membuat media tanam menjadi abu-abu, putih, merah muda, coklat, hijau, bahkan hitam (Rahmadi *et al.*, 2020).

Jamur yang muncul berkemungkinan berjenis *Mucor* dan *Rhizopus* dengan ciri *hifa* seperti benang putih hingga kehitaman, dan tampak sporangiumnya pada *eksplan* (Izzatinnisa *et al.*, 2020). Penelitian yang dilakukan Andriyani & Heriansyah (2021) terhadap Anggrek Alam memperlihatkan adanya kontaminasi jamur yang didominasi dari kelas *deuteromycetes* dan *zygomycetes* dengan sebagian besar koloninya berwarna putih dan abu-abu, tumbuh simetris, serta bertekstur kasar (Andriyani & Heriansyah, 2021).

Bakteri sebagai kontaminan tidak banyak muncul pada *eksplan* karena pada penelitian ini media tanam yang digunakan telah ditambahkan biosida, serta menggunakan antibiotik saat sterilisasi di luar *Laminar Air Flow*. *Plant Presentative Mixture* (ppm) adalah biosida golongan *isotiazolon* yang dicampurkan dalam media tanam untuk mencegah kontaminasi pada kultur jaringan (Hanida, 2017). Antibiotik *streptomycine* mampu meminimalisir kontaminan berupa bakteri dengan sifat bakteriostatik, yaitu menghambat metabolisme bakteri dengan dosis tidak lebih dari 10 ppm, jika lebih akan berpotensi menjadi bakterisida atau memusnahkan bakteri bahkan mematikan *eksplan* (Jabbar *et al.*, 2020).

Kontaminasi oleh bakteri ditandai dengan terdapatnya lendir putih hingga kekuningan di permukaan media sehingga membuat kondisi sekitarnya terlihat lebih basah karena adanya lendir (Rahmadi *et al.*, 2020). Seperti pada gambar 1b. Kontaminasi bakteri yang sering terjadi pada kultur jaringan dapat disebabkan antara lain oleh *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, dan *Staphylococcus* (Shofiyani *et al.*, 2020). Tidak hanya salah satu dari jamur atau bakteri, keduanya juga dapat muncul sekaligus sebagai sumber kontaminasi. Seperti pada *eksplan* dengan perlakuan HOP0 di 14 MST yang terlihat pada gambar 1c.

Data pengamatan memenuhi syarat normalitas (Sig. 0,096) dan homogenitas (Sig. 0,217), sehingga dilakukan uji *Two-Way Anova*. Diketahui bahwa variabel durasi pengocokan dan interaksi kedua variabel bebas menunjukkan nilai signifikansi $> 0,05$, yang artinya tidak terdapat pengaruh signifikan terhadap waktu awal kontaminasi. Sedangkan variabel konsentrasi memperoleh nilai signifikansi $0,000 < 0,05$ yang artinya terdapat pengaruh perlakuan berbagai konsentrasi $HgCl_2$, sehingga perlu dilanjutkan dengan uji BNJ 5% untuk mengetahui perbedaan nyata di antara kelompok perlakuan.



Tabel 1. Hasil Uji *Two-Way* Anova terhadap Parameter Waktu Awal Kontaminasi *Eksplan*.

Durasi Pengocokan	Konsentrasi HgCl ₂ (%)				Sig.		
	H0 (kontrol)	H1 (4%)	H2 (7%)	H3 (10%)	Konsentrasi HgCl ₂	Durasi Pengocokan	Interaksi Kedua Faktor
P0 (kontrol)	2.33	-	-	-			
P1 (3 menit)	-	6.33	8.33	11			
P2 (5 menit)	-	7.33	8.66	11.33	0.000	0.708	0.806
P3 (7 menit)	-	6	7.66	13.33			
P4 (9 menit)	-	8	8	13.66			
BNJ 5%	2.33 ^c	6.91 ^b	8.16 ^b	12.33 ^a			

Keterangan:

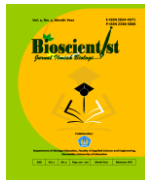
Nilai yang diikuti huruf berbeda (a,b,c) mengartikan adanya pengaruh nyata pada taraf uji BNJ 5%.

Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa perlakuan H3P4 (HgCl₂ 10% dengan durasi pengocokan 9 menit) mempunyai rata-rata tertinggi, yaitu 13,66 hari. Sedangkan rata-rata terendah sebesar 2,33 hari diperoleh dari kontrol negatif (H0P0), yang mana memunculkan kontaminasi dari jamur dan bakteri lebih cepat dibandingkan perlakuan lainnya. Kemudian pada perlakuan H1P2 (HgCl₂ 4% dengan durasi pengocokan 3 menit) yang memunculkan kontaminasi lebih cepat yaitu dari jamur. Perlakuan sterilisasi *eksplan* tersebut dianggap kurang optimal karena tidak mampu menekan kontaminasi eksternal maupun internal. Sedangkan yang paling lama memunculkan kontaminasi adalah *eksplan* dengan perlakuan H3P4 (HgCl₂ 10% dengan durasi pengocokan 9 menit) yaitu pada 13-14 HST.

Berdasarkan hasil uji lanjutan BNJ 5%, yang paling berbeda nyata adalah konsentrasi HgCl₂ 10% (rata-rata 12,33) terhadap konsentrasi lainnya, terutama terhadap perlakuan kontrol (rata-rata 2,33) dengan beda rata-rata tertinggi sebesar 10 hari. Sedangkan yang tidak berbeda nyata ditunjukkan pada konsentrasi HgCl₂ 4% (rata-rata 6,91) terhadap 7% (rata-rata 8,16), meskipun keduanya masih memiliki beda rata-rata sebesar -1,25 hari. Penggunaan HgCl₂ 10% menjadi yang paling mampu menghambat kontaminasi hingga di 14 HST.

Konsentrasi paling efektif menghambat kemunculan kontaminan secara berturut-turut yaitu 10% > 7% > 4% > 0%. Semakin rendah konsentrasi HgCl₂, maka semakin cepat sumber kontaminasi muncul. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Fauzan *et al.* (2017) bahwa semakin tinggi konsentrasi HgCl₂, maka semakin mampu menekan pertumbuhan jamur dan bakteri. Namun, dalam penggunaannya perlu diperhatikan terkait durasi perendaman atau lama pengocokan *eksplan* di dalamnya, karena pada konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menurunkan pertumbuhan dan perkembangan kultur. Seperti pada penelitian Anthony *et al.* (2015) yang memperlihatkan bahwa penggunaan HgCl₂ 0,15%





selama 15 menit membuat tingkat keberhasilan kultur *eksplan* jati menjadi rendah. Hal ini akibat dosis terlalu tinggi dan menyebabkan kerusakan jaringan tanaman.

Masa Steril *Eksplan* Tanaman Lidah Mertua (HST)

Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa perlakuan H3P3 (HgCl₂ 10% dengan durasi pengocokan 7 menit) dan H3P4 (HgCl₂ 10% dengan durasi pengocokan 9 menit) mempunyai rata-rata tertinggi terhadap parameter masa steril *eksplan* jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya, yaitu 12,33 hari. Sedangkan kontrol negatif mempunyai rata-rata terendah yaitu 1,33 hari. Perlakuan H1P4, H2P1, H2P2, H3P1, H3P2, H3P3, dan H3P4 mampu memberikan pengaruh terbaik untuk mencegah kontaminasi eksternal, baik oleh jamur atau bakteri. Namun, belum dapat menghilangkan kontaminasi internal. Kontaminasi internal memang sulit dihilangkan karena kontaminasi sitstemik ini berasal dari dalam *eksplan*. Setidaknya pemberian antibiotik *streptomycine* dapat meminimalisir spektrum bakteri. Antibiotik lain yang dapat digunakan yaitu *amoxcillin* dan *chloramphenicol* dengan konsentrasi tertentu (Rahmawati & Sandra, 2021).

Data pengamatan memenuhi syarat normalitas (sig. 0,102) dan homogenitas (sig. 0,168) sehingga dapat dilanjutkan pada uji *Two-Way* Anova. Diketahui bahwa nilai signifikansi variabel durasi pengocokan dan interaksi kedua variable bebas > 0,05 yang artinya tidak berpengaruh terhadap masa steril *eksplan*. Sedangkan nilai signifikansi variabel konsentrasi yaitu 0,000 < 0,05 yang artinya terdapat pengaruh pemberian berbagai perlakuan konsentrasi HgCl₂, lalu dilanjutkan uji BNJ 5%.

Tabel 2. Hasil Uji *Two-Way* Anova Pengaruh Variabel terhadap Parameter Masa Steril *Eksplan* Tanaman Lidah Mertua.

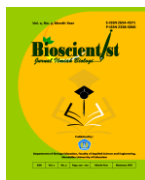
Durasi Pengocokan	Konsentrasi HgCl ₂ (%)				Sig.	Durasi Pengocokan	Interaksi Kedua Faktor
	H0 (kontrol)	H1 (4%)	H2 (7%)	H3 (10%)			
P0 (kontrol)	1.33	-	-	-	0.000	0.696	0.793
P1 (3 menit)	-	5.33	7.33	10			
P2 (5 menit)	-	6.33	7.67	10.33			
P3 (7 menit)	-	5	6.67	12.33			
P4 (9 menit)	-	7.33	7	12..33			
BNJ 5%	1.33 ^c	6.00 ^b	7.17 ^b	11.25 ^a			

Keterangan:

Nilai yang diikuti huruf berbeda (a,b,c) mengartikan adanya pengaruh nyata pada taraf uji BNJ 5%.

Berdasarkan hasil uji BNJ 5%, yang paling berbeda nyata adalah konsentrasi HgCl₂ 10% (rata-rata 11,25) terhadap konsentrasi lainnya, terutama





terhadap perlakuan kontrol (rata-rata 1,33) dengan beda rata-rata tertinggi sebesar 9,92 hari. Sedangkan yang tidak berbeda nyata adalah perlakuan HgCl_2 4% (rata-rata 6,00) terhadap 7% (rata-rata 7,17) meskipun masih memiliki beda rata-rata - 1,17 hari. Konsentrasi dengan tingkat keefektifan tertinggi ke terendah yaitu $10\% > 7\% > 4\% > 0\%$. Penggunaan HgCl_2 pada konsentrasi 10% menjadi yang paling mampu memperlama masa steril *eksplan*. Penggunaan HgCl_2 dalam konsentrasi rendah atau dalam waktu yang singkat tetap dapat menekan kontaminan, hasil ini sejalan dengan penelitian Fauzan *et al.*, (2017) yaitu pada sterilisasi *eksplan T. grandis* menggunakan HgCl_2 100 mg/L selama 3 menit mampu menghasilkan tingkat aseptik sebesar 53,33%. Sedangkan dengan HgCl_2 300 mg/L selama 3 menit berhasil meningkatkan kultur aseptik terbaik hingga 85%.

Unsur Hg dapat mempengaruhi toksisitas atau kematian bakteri dan jamur. Garam merkuri dari reaksi $\text{Hg}^{2+} + 2\text{Cl}^-$ dalam bentuk padat atau kristal akan bereaksi secara ionik (H^+ dihidrasi dalam air) menghasilkan HgCl_2 . HgCl_2 dapat larut dalam air sehingga mudah dan cepat untuk diabsorpsi. Aktivitas *ion* Hg^{2+} terfokus pada membran sel yang berkaitan dengan *ion* Na^+ dan K^+ ATP-ase sehingga terjadi gangguan pertukaran *ion* intra seluler dan ekstra seluler pada sel (Fauzan *et al.*, 2017).

Dalam menghambat aktivitas kontaminan, HgCl_2 akan menurunkan aktivitas protein dengan meningkatkan grup *thiol* (-SH). Unsur merkuri akan menangkal sisi fungsional yang berikatan dengan grup -SH sebagai bagian katalitik enzim untuk menonaktifkan beberapa enzim. Merkuri menginduksi peningkatan akumulasi dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada sel, meningkatkan peroksidasi lipid, mendegradasi protein, dan mematikan sel (Admojo & Prasetyo, 2016).

Eksplan dengan masa steril yang lama juga dapat didukung oleh perlakuan sterilisasi *eksplan* di dalam *Laminar Air Flow* yang menggunakan kombinasi bahan sterilan seperti alkohol, cairan pemutih pakaian (*bayclin*), dan HgCl_2 dengan konsentrasi bertingkat, serta dibilas menggunakan *aquades* atau air steril (Sandra, 2013). *Bayclin* mengandung *Natrium Hipoklorit* yang bersifat racun dan dapat membunuh mikro organisme kontaminan (Zulkifli & Sari, 2017). Begitu pula dengan alkohol sebagai desinfektan, senyawa organik ini mempunyai gugus *hidroksil* (-OH) yang dapat terikat pada *atom karbon* atau *hydrogen* lain (Zuhria & Dona, 2021). Sedangkan HgCl_2 atau Merkuri klorida adalah antiseptik yang dapat berkombinasi dengan protein selular dan mendenaturasikannya. Penggunaannya dianjurkan sebentar saja karena termasuk *toksik*, dapat merusak dan mematikan *eksplan* (Rahmadi *et al.*, 2020).

Persentase *Eksplan* Terkontaminasi (%)

Kontaminasi memang mudah terjadi pada *eksplan* daun karena organ tersebut mempunyai banyak *stomata* dan permukaan *epidermis* yang memungkinkan jamur dan bakteri masuk, lalu berkembang dan hidup pada jaringan daun. Hal ini sesuai penelitian Heriansyah & Indrawanis (2020), serta Juarna (2016), bahwa dalam perbanyakannya menggunakan *eksplan* daun rentan terkendala pada tingginya serangan kontaminan *endofit* di dalam jaringan.

Data persentase *eksplan* terkontaminasi di 14 HST tidak berdistribusi normal (sig. 0,000) dan tidak *homogen* (sig. 0,000). Hal tersebut disebabkan karena ada *range* yang terlalu tinggi atau terlalu rendah, sehingga sebarannya tidak rata. Sehingga menggunakan uji non-parametrik *Kruskall-Wallis*. Berdasarkan Tabel 3, diketahui bahwa interaksi kedua variabel bebas memperoleh nilai signifikansi $> 0,05$ yang artinya tidak berpengaruh terhadap persentase *eksplan* terkontaminasi. Dengan demikian optimasi terhadap sterilisasi menggunakan variasi konsentrasi $HgCl_2$ dan durasi pengocokan *eksplan* di dalamnya masih perlu dilakukan lebih lanjut agar akurat, sehingga didapatkan metode sterilisasi yang sesuai.

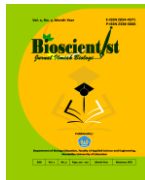
Tabel 3. Hasil Uji *Kruskall-Wallis* Berbagai Pengaruh Variabel terhadap Parameter Persentase *Eksplan* Terkontaminasi di 14 HST (%).

Durasi Pengocokan	Konsentrasi $HgCl_2$ (%)				Sig.
	H0 (kontrol)	H1 (4%)	H2 (7%)	H3 (10%)	
P0 (0 menit)	100	-	-	-	
P1 (3 menit)	-	100	100	83.33	
P2 (5 menit)	-	100	100	100	0,99
P3 (7 menit)	-	100	100	33.33	
P4 (9 menit)	-	100	83.33	66.66	

Diketahui bahwa rata-rata persentase kontaminasi tertinggi hingga 100% didominasi oleh *eksplan* dengan perlakuan konsentrasi $HgCl_2$ yang rendah dan waktu pengocokan *eksplan* yang singkat, antara lain H0P0, H1P1, H1P3, H1P4, H2P1, H2P3, dan H3P2. Sementara itu, perlakuan H2P4 dan H3P1 memiliki rata-rata persentase kontaminasi yang sama, yaitu 83,33% dan perlakuan H3P4 memiliki rata-rata persentase sebesar 66,66%. Sedangkan untuk rata-rata persentase *eksplan* terkontaminasi di bawah 50% yaitu hanya perlakuan H3P3 ($HgCl_2$ 10% dengan durasi pengocokan 7 menit) sebesar 33,33%.

Merkuri klorida ($HgCl_2$) termasuk bahan sterilan yang sangat kuat dan paling mampu meminimalisir kontaminasi meskipun pada konsentrasi rendah (Fauzan *et al.*, 2017). Sebagaimana penelitian yang dilakukan Daud *et al.* (2012) dengan konsentrasi $HgCl_2$ 0,1% selama 15-30 detik, ternyata masih dapat menghasilkan *eksplan* daun dan ruas batang *Aquilaria malaccensis* aseptik sebesar 83-90%. Sedangkan pada penelitian Mekonnen *et al.* (2013) dengan konsentrasi 0,1% selama 10 menit mampu meningkatkan *eksplan* hidup dari tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) hingga 73,33%.

Tingginya persentase kontaminasi yang masih terjadi pada beberapa perlakuan diduga terjadi akibat terlalu rendahnya konsentrasi $HgCl_2$, misalnya dengan konsentrasi 4%. Pada kondisi tersebut, $HgCl_2$ menjadi kurang meresap dan tidak dapat mengendalikan kontaminasi pada *eksplan* daun. Kontaminasi tidak



dapat dihindari jika pengocokan *eksplan* dalam sterilan terlalu singkat, karena mikroba berkemungkinan masih terbawa di permukaan *eksplan* (Nida *et al.*, 2021).

Permasalahan juga dapat terjadi saat konsentrasi sterilan terlalu tinggi, ini dapat merusak dan mematikan *eksplan*, karena umumnya sterilan seperti HgCl₂ memiliki sifat *toksik* terhadap jaringan Larutan HgCl₂ bersifat antiseptik dan mengandung *ion* merkuri untuk menekan munculnya kontaminan, tapi ketika melepaskan *ion* Hg²⁺ dapat menjadi penyebab *toksik* pada proses presipitasi protein sehingga dapat menghambat aktivitas *enzim* dan memiliki sifat *korosif* (Shofiyani *et al.*, 2020).

Persentase Eksplan Browning (%)

Suatu *eksplan* dapat mengalami pencoklatan (*browning*) hingga perlahan menghitam dan mati akibat pertumbuhan dan perkembangan jaringan terhambat. Kondisi tersebut terjadi karena senyawa *fenol* dalam *eksplan* teroksidasi menjadi *quinon* akibat penggunaan bahan tanam dari jaringan dewasa yang tidak marismatik, sterilisasi berlebihan, ketidakcocokan penggunaan media, kurang mendukungnya lingkungan kultur, maupun faktor teknis ketika penanaman seperti penggunaan *scapel* dan *pinset* yang masih panas dan lamanya proses pengeringan *eksplan* setelah disterilisasi dari sterilan (Fitriani *et al.*, 2019).

Data pengamatan persentase *eksplan browning* pada 14 HST diketahui tidak berdistribusi normal (sig. 0,000) dan tidak *homogen* (sig. 0,000). Dengan demikian, data tidak memenuhi syarat untuk dilanjutkan pada Uji *Two-Way* Anova. Namun, dilanjutkan menggunakan uji non-parametrik *Kruskall-Wallis* dan hasilnya disajikan pada Tabel 4.

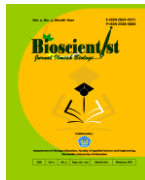
Tabel 4. Hasil Uji *Kruskall-Wallis* Berbagai Pengaruh Variabel terhadap Parameter *Eksplan Browning* di 14 HST (%).

Durasi Pengocokan	Konsentrasi HgCl ₂ (%)				Sig.
	H0 (Kontrol)	H1 (4%)	H2 (7%)	H3 (10%)	
P0 (Kontrol)	0	-	-	-	0.028
P1 (3 menit)	-	0	0	16.66	
P2 (5 menit)	-	0	0	33.33	
P3 (7 menit)	-	0	0	33.33	
P4 (9 menit)	-	0	0	83.33	

Berdasarkan Tabel 4, diketahui bahwa interaksi variable konsentrasi HgCl₂ dengan variable waktu pengocokan *eksplan* berpengaruh signifikan terhadap persentase *eksplan browning* di 14 HST, sehingga perlu dilakukan uji lanjutan. Hasil Uji *Dunn's Test Post Hoc Kruskall-Wallis* menyatakan bahwa perlakuan yang berbeda nyata (Sig. < 0,05) yaitu H3P4 terhadap H0P0, H1P1, H1P2, H1P3, H1P4, H2P1, H2P2, dan H2P3, H2P4 (Sig. 0,001) dengan beda rata-rata tertinggi sebesar 83,33%. Selain itu, ada H3P4 terhadap H3P1 (Sig. 0,019) sebesar 66,67%, dan H3P4 terhadap H3P2 dan H3P3 (Sig. 0,03) dengan beda rata-rata 50%.

Persentase *eksplan browning* terendah ditunjukkan oleh perlakuan kontrol, H1P1, H1P2, H1P3, H1P4, H2P1, H2P2, H2P3, dan H2P4 yaitu sebesar 0% atau





tidak terjadi pencoklatan *eksplan* dari awal hingga akhir pengamatan. Sedangkan persentase *browning* tertinggi dicapai oleh *eksplan* dengan perlakuan H3P4 sebesar 83,33%. Hal tersebut membuktikan bahwa semakin tinggi konsentrasi dan semakin lama pengocokan *eksplan* di dalamnya dapat mengakibatkan pencoklatan (*browning*). Hasil tersebut sejalan dengan hasil penelitian Tiwari *et al.* (2012) terhadap *eksplan* tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) yang mengalami *browning* dan mati pada 4-7 HST akibat disterilisasi menggunakan HgCl₂ 0,2% selama 12 menit. Penggunaan HgCl₂ dalam sterilisasi memerlukan durasi waktu yang singkat karena bersifat *toksik* dan dapat merusak *eksplan* (Rahmadi *et al.*, 2020).

Ion merkuri (Hg²⁺) dapat menjadi racun karena proses presipitasi protein menghambat aktivitas *enzim* dan dapat bertindak sebagai bahan yang sangat *korosif* (Fauzan *et al.*, 2017). Konsentrasi HgCl₂ yang terlalu tinggi dalam pemaparan yang lama saat sterilisasi *eksplan* akan berdampak buruk terhadap *eksplan* daun lidah mertua. HgCl₂ akan merusak sel-sel yang ada, sehingga pertumbuhan dan perkembangannya terhambat. Hal ini ditandai dengan *browning* dan lama-kelamaan akan terkontaminasi bahkan mati (Sulistiyo *et al.*, 2018).

Pada penelitian Fauzan *et al.* (2017), perlakuan sterilisasi terbaik terhadap *eksplan* tunas samping jati yaitu dengan menggunakan HgCl₂ 300 mg/L dalam waktu 3 menit, hal tersebut juga didukung oleh ukuran *eksplan* yang kecil, yaitu (1 cm dan diameter 0,2 mm) sehingga memudahkan dalam proses sterilisasi dan mengurangi tingkat *browning*. Sebagaimana juga pada hasil penelitian Singh & Patel (2016) terhadap tanaman delima, yang mana umur tunas dan ukuran *eksplan* mempengaruhi tingkat *browning*. Berdasarkan hasil penelitiannya menyatakan bahwa semakin tua dan panjang *eksplan* (> 1,5cm) maka akan semakin meningkat persentase *browning* karena mengandung banyak senyawa *polifenol*. Proses pembilasan saat sterilisasi adalah upaya untuk mengeluarkan *fenol* pada *eksplan* sehingga dapat menghambat proses *browning* (Handayani *et al.*, 2021).

SIMPULAN

Pemberian variasi perlakuan konsentrasi HgCl₂ berpengaruh signifikan terhadap parameter waktu awal kontaminasi, masa steril *eksplan*, dan persentase *eksplan browning*, tapi tidak berpengaruh signifikan terhadap persentase *eksplan* terkontaminasi. Konsentrasi HgCl₂ yang terlalu tinggi mampu memperlambat munculnya kontaminasi, sehingga masa sterilnya menjadi lama, tapi berpotensi mengakibatkan *eksplan browning*. Diketahui bahwa durasi pengocokan *eksplan* dalam HgCl₂ tidak berpengaruh signifikan terhadap seluruh parameter. Penggunaan HgCl₂10% dengan durasi pengocokan 7 menit (H3P3) diketahui paling optimal untuk sterilisasi *eksplan Sansevieria* sp. karena mampu mengurangi kontaminasi eksternal, memperpanjang masa steril *eksplan* hingga 12,33 HST, dan tidak menyebabkan terlalu banyak *eksplan browning* yaitu 33,33%.





SARAN

Penggunaan HgCl_2 dengan konsentrasi 10% selama 7 menit dapat digunakan untuk mengurangi kontaminasi eksternal pada kultur jaringan *Sansevieria* sp., tetapi juga perlu dilakukan penelitian kembali terkait teknik sterilisasi *eksplan* dengan konsentrasi berbeda maupun dengan jenis sterilan lain untuk mengurangi kontaminasi internal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada *Esha Flora* yang telah memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

- Admojo, L., dan Prasetyo, N.E. (2016). Pengaruh Sterilan terhadap Tingkat Kontaminasi pada Kultur Petiol dan Midrib Daun Tanaman Karet (*Hevea Brasiliensis* Muell Arg.) Klon Pb 330. *Jurnal Penelitian Karet*, 34(2), 151-164.
- Andriyani D., dan Heriansyah, P. (2021). Identifikasi Jamur Kontaminan pada Berbagai *Eksplan* Kultur Jaringan Anggrek Alam (*Bromheadia finlaysoniana* (Lind.) Miq. *Agro Bali: Agricultural Journal*, 4(2), 192-199.
- Anjani, R.T., Haq, B.N., dan Andriana, Y.F. (2020). Eksplorasi Teknik Tapestri dan Pewarnaan Serat Lidah Mertua untuk Bahan Alternatif Aksesoris Fesyen. *Jurnal IKRA-ITH Humaniora*, 4(3), 219-228.
- Anthony, T., Anees, P.V.M., Kumar, V., Sangamithra, D., Philip T., and Santhoshkumar, A.V. (2015). Application of Mercuric Chloride and Charcoal in Micro-Propagation of Teak (*Tectona grandis*). *Indian Journal Tropical Biodiversity*, 23(2), 157-166.
- Daud, N.H., Jayaraman, S., and Mohamed, R. (2012). Methods Paper: an Improved Surface Sterilization Technique for Introducing Leaf, Nodal and Seed Explants of *Aquilaria Malaccensis* from Field Sources into Tissue Culture. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol*, 20(2), 55-58.
- Fauzan, Y.S.A., Supriyanto., dan Tajuddin, T. (2017). Efektivitas Merkuri Klorida (HgCl_2) pada Sterilisasi Tunas Samping Jati (*Tectona grandis*) In Vitro. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 4(2), 78-84.
- Fitriani, Y., Wijana, G., dan Darmawati, I.A.P. (2019). Teknik Sterilisasi dan Efektivitas 2,4-D terhadap Pembentukan Kalus *Eksplan* Daun Nilam (*Pogostemoncablin* Benth) in Vitro. *J. Agric. Sci. and Biotechnol*, 8(1), 41-52.
- Gantait, S., Kundu, S., dan Das, P.K. (2018). Acacia: An Exclusive Survey on In Vitro Propagation. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Science*, 17(2), 77-13.
- Handayani, E., Irsyadi, M.B., dan Aris, I., Alawiyah, R.L.M.N., Ayuningtias, N., Permatasari, F., dan Rineksane, I.A. (2021). Optimasi Sterilisasi Endosperma Kepel (*Stelethocarpus burahol* [Bl] Hook F. & Th) secara In Vitro. *Jurnal BIO-EDU*, 6(2), 113-121.





- Hanida, M.A. (2017). Potensi Biosida Ekstrak Buah dan Daun Belimbing Wuluh Pada Pertumbuhan Biji Kacang Hijau Secara In Vitro. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Heriansyah, P., dan Indrawanis, E. (2020). Uji Tingkat Kontaminasi Eksplan Anggrek *Bromheadia finlysoniana* L. miq dalam Kultur In-Vitro dengan Penambahan Ekstrak Tomat. *Jurnal Agroqua*, 18(2), 223-232.
- Izzatinnisa., Utami, U., dan Mujahidin, A. (2020). Uji Antagonisme beberapa Fungsi Endofit pada Tanaman Kentang terhadap *Fusarium oxysporum* secara In Vitro. *Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya*, 2(1), 18-25.
- Jabbar, F.B.A., Ardiansyah., dan Darsiani. (2020). Pengaruh Pemberian Antibiotik terhadap Sintasan dan Pertumbuhan Eksplan Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* secara In Vitro. *Journal of Fisheries and Marine Science*, 2(1), 92-97.
- Joko, T., dan Arwiyanto, T. (2021). Karakteristik Morfologi dan Fisiologi Bakteri Endofit dan Rizo bakteri dari Tanaman Cengkeh Sehat. *Jurnal Agro Wiralodra*, 4(1), 1-8.
- Juarna, K.S. (2016). Uji Tingkat Kontaminasi *Eksplan Centella asiatica* (L.) Urban (Pegagan) dalam Kultur In Vitro melalui Perbandingan Dua Metode Sterilisasi. *Jurnal Pro-Life*, 3(2), 119-128.
- Megia, R., Ratnasari., dan Hadisunarso. (2015). Karakteristik Morfologi dan Anatomi, serta Kandungan Klorofil Lima Kultivar Tanaman Penyerap Polusi Udara *Sansevieria trifasciata*. *Jurnal Sumberdaya Hayati*, 1(2), 34-40.
- Mekonnen, T., Diro, M., and Sharma, M. (2013). An Alternative Safer and Cost Effective Surface Sterilization Method for Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Explants. *African Journal of Biotechnology*, 12(44), 28-32.
- Muliati., Nurhidayah, T., dan Nurbaiti. (2017). Pengaruh NAA, BAP, dan Kombinasinya pada Media MS terhadap Perkembangan Eksplan *Sansevieria macrophylla* Secara In Vitro. *Jom Faperta*, 4(1), 1-13.
- Nida, K., Luaeliyah, M., Nurchayati, Y., Izzati, M., dan N. Setiari. (2021). Pertumbuhan Kecambah Kentang (*Solanum tuberosum* L.) secara In Vitro pada Konsentrasi NaClO dan Waktu Sterilisasi yang Berbeda. *Life Science*, 10(1), 2-22.
- Prameswari, M.A., Karno., dan Anwar, S. (2019). The Effect of BAP and Kinetin Concentrations for Shoot Induction on Teak (*Tectona grandis* L.) with In Vitro Method. *Journal Tropical Crop Science And Technology*, 1(2), 93-107.
- Rachmandhika, Y. (2017). Regenerasi Tanaman Lidah Mertua (*Sansevieria liberica*) menggunakan BA (6-Benzyladenine) dan NAA (α -Naphthaleneacetic acid) Secara In Vitro. *Skripsi*. Fakultas Pertanian. Universitas Jember.
- Rahmadi, A.N., Wicaksana, B., Nurhadi, E., Suminar S.R.T., Pakki., dan Mubarok, S. (2020). Optimasi Teknik Sterilisasi dan Induksi Tunas



- Tanaman Durian (*Durio zibethinus* Murr) 'Kamajaya' Lokal Cimahi secara In Vitro. *Jurnal Kultivasi*, 19(1), 1083-1088.
- Rahmawati, D., dan Sandra, E. (2021). *Buku Panduan Praktik Teknologi Kultur Jaringan di Laboratorium Bioteknologi*. Bogor: Seameo Biotrop.
- Sandra, E. (2013). *Cara Mudah Memahami dan Menguasai Kultur Jaringan Skala Rumah Tangga*. Bogor: Penerbit IPB Press.
- Saepudin, A., Yulianto, Y., dan Aeni, R.N. (2020). Pertumbuhan Eksplan In Vitro Anggrek Hibrida *Dendrobium* pada Beberapa Media Dasar dan Konsentrasi Air Kelapa. *Media Pertanian*, 5(2), 97-115.
- Saputri, M., Rahmawati, M., dan Kesumawati, E. (2019). Pertumbuhan Tunas Pisang Barangan akibat Pemberian Benzyl Amino Purin dan Arang Aktif secara In Vitro. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pertanian*, 4(1), 73-90.
- Shofiyan, A., Purnawanto, A.M., dan Aziz, R.Z.A. (2020). Pengaruh Berbagai Jenis Sterilan dan Waktu Perendaman terhadap Keberhasilan Sterilisasi Eksplan Daun Kencur (*Kaempferia galanga* L) pada Teknik Kultur In Vitro. *Agritech*, 22(1), 29-39.
- Singh, P., and Patel, R.M. (2016). Factors Affecting in Vitro Degree of Browning and Culture Establishment of Pomegranate. *African Journal of Plant Science*, 10(2), 43-49.
- Sulistiani, E., dan Yani, S.A. (2014). *Kultur Jaringan Rumput Laut Kotoni (*Kappaphycus alvarezii*)*. Bogor: SEAMEO BIOTROP.
- Sulistiyo, R.H., Luthfiyyah, Z., Susilo, B., Dalimartha, L.N., Wiguna, E.K., Yuliana, N., dan Prasetyo, E.N. (2018). Pengaruh Teknik Sterilisasi dan Komposisi Medium terhadap Pertumbuhan Tunas Eksplan Sirsak Ratu. *BIOEDUKASI: Jurnal Pendidikan Biologi*, 11(1), 1-5.
- Tiwari A.K., Tripathi S., Lal, M., and Mishra, S. (2012). Screening of Some Chemical Disinfectants for Media Sterilization During in Vitro Micropropagation of Sugarcane. *Sugar Tech*, 14(4), 364-369.
- Wulandari, A.S., Sulistiani, E., dan Agustian, E.L. (2017). Respon Pertumbuhan Tunas Saninten (*Castanopsis argentea* (Blume) A.DC.) terhadap Pemberian Zat Pengatur Tumbuh BAP dan IAA Secara In Vitro. *Jurnal Silvikultur Tropika*, 8(3), 208-214.
- Yusnita., Wahyuningsih, T., Sulistiana, P., dan D. Hapsoro. (2013). Perbanyak In Vitro *Sansevieria trifasciata* 'Lorentii': Regenerasi Tunas, Pengakaran, dan Aklimatisasi Planlet. *J. Agron. Indonesia*, 41(1), 70-76.
- Zuhria, M., dan Dona, F. (2021). Penggunaan Alkohol untuk Kepentingan Medis Tinjauan Istihsan. *JOLSIC*, 9(1), 40-49.
- Zulkifli., dan Sari, P.L. (2017). Pengaruh Konsentrasi Bayclin pada Pencucian II dan BAP pada Media MS terhadap Pertumbuhan Eksplan Tanaman Pisang Klutuk (*Musa Paradisiaca*. L) Secara In Vitro. *Jurnal Dinamika Pertanian*, 33(2), 163-168.