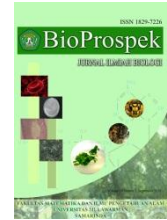




Bioprospek

<https://fmipa.unmul.ac.id/jurnal/index/Bioprospek>



STERILIZATION EFFECTIVENESS OF RUBBER LEAF EXPLANT (*Hevea brasiliensis*) IN IN-VITRO CULTURE

Mila Lukmana^{1*} dan Linda Rahmawati²

^{1,2} Program Studi Budidaya Tanaman Perkebunan, Politeknik Hasnur Jl. Adhyaksa No. A2-A4 Komplek Kayu Tangi Permai, Banjarmasin, Kalimantan Selatan, 70125

INFO ARTIKEL

Terkirim 2 Juni 2017
Diterima 3 Februari 2018
Online 18 April 2018

Kata kunci.
Leaf explant
rubber tree
Hevea brasiliensis
sterilization

ABSTRAK

Rubber (*Hevea brasiliensis*), are the commodities that have the potential to be developed. Rubber cultivation is currently only rely on rootstocks obtained from seeds in the nursery, so availability is limited by seasons and seed viability. Tissue culture techniques to address challenges to obtain seeds in large quantities in a short time. Tissue culture are often faced with the problem of contamination, so that the required ingredients for the success of the sterilizing effective planting rubber leaf explants in vitro. Variables observed among other things, the speed of contamination of explants, number of explants of living, the number of types of contaminants, the number of sources of contaminants as well as the number of explants browning and not because browning. Sterilization treatment in this study, namely P1 without sterilization in LAFC, P2 with 70% alcohol, P3 combination treatment NaOCl 20% and 70% alcohol, P4 uses a combination of HgCl₂ a 0.01% and NaOCl 10% and P5 using 70% alcohol and H₂O₂ 17.6 % (v/v). The results showed that the treatment P1 bacterial contamination of 60% and mushrooms 85%, P2 bacterial contamination by 90% and mushrooms 10%, P3 bacterial contamination 92.5% and mildew 17.5%, P4 bacterial contamination 72.5% and fungi 10% and the treatment P5 with 65% of bacterial contamination without contamination of mushrooms. Best results are obtained by using the P5 treatment Alcohol 70% for 1 minute and H₂O₂ 17.6% (v / v) for 20 minutes can remove contaminants fungi and suppress bacterial contamination percentage of 65% to 30 days after planting.

1. Pendahuluan

Tanaman karet (*Hevea brasiliensis*) merupakan salah satu komoditas perkebunan yang berperan sebagai sumber

pendapatan, kesempatan kerja, devisa, pendorong pertumbuhan ekonomi di wilayah sekitar perkebunan karet serta berperan dalam pelestarian lingkungan dan sumberdaya hayati. Prospek tersebut akan menyebabkan usaha perkebunan karet

Korespondensi: milalukmana@gmail.com
bioprospek@fmipa.unmul.ac.id

meningkat yang berimbas pada meningkatnya kebutuhan bibit karet.

Salah satu hal yang perlu dipersiapkan dalam budidaya tanaman karet adalah batang bawah. Pengadaan batang bawah secara klonal diperlukan karena saat ini batang bawah berasal dari biji, sehingga ketersediaannya dibatasi musim, yaitu satu kali dalam setahun (Abbas dan Ginting, 1981; Sundari et al., 2015) dan viabilitas biji. Disamping itu meskipun menggunakan klon batang atas yang sama, batang bawah asal biji ternyata menunjukkan variasi morfologi dan produksi yang cukup tinggi antar tanaman (Martiansyah et al., 2013). Klon-klon karet anjuran untuk batang bawah, seperti AVROS 2037, GT 1, BPM 24, PB 260, RRIC 100 dan PB 330 (Balai Penelitian Sembawa, 2010; Hartawan, 2012).

Perbanyak karet secara konvensional sulit menjawab tantangan prospek karet yang tinggi terkait dengan pemenuhan kebutuhan bibit yang banyak dalam waktu relatif singkat. Salah satu teknologi alternatif untuk menjawab tantangan tersebut adalah teknik kultur in-vitro atau kultur jaringan.

Dalam pelaksanaan teknik kultur jaringan tumbuhan, tantangan pertama yang harus diselesaikan adalah meniadakan kontaminan dalam kultur. Seperti dilaporkan Habibah et al., (2013) optimasi sterilisasi eksplan daun Burahol dengan menggunakan perlakuan sterilisasi kombinasi NaOCl, fungisida dan bakterisida masih terjadi kontaminasi jamur. Kontaminasi yang sering terjadi disebabkan oleh bahan tanam (eksplan) tumbuhan yang berasal dari lapangan mengandung debu, kotoran dan kontaminan baik pada permukaan maupun jaringan. Indonesia yang memiliki iklim tropis juga merupakan kondisi yang disukai untuk tumbuhnya mikroorganisme kontaminan seperti jamur dan bakteri. Hal tersebut menjadikan tahap sterilisasi sering kali menjadi kendala utama keberhasilan perbanyak secara in vitro. Menurut Colgecen et al. (2011) kontaminan yang berasal dari eksplan, seperti bakteri dan jamur dapat mengurangi produktivitas

dan tingkat keberhasilan kultur. Pada kultur *Arnebia densiflora* Ledeb. kontaminasi berhasil ditekan serta memberikan hasil pembentukan kalus terbaik dengan menggunakan campuran methylchloroisothiazolinone, methylisothiazolinone, magnesium chloride, magnesium nitrate, potassium sorbate, dan sodium benzoate pada konsentrasi 2% - 3%.

Tantangan tahap sterilisasi, yaitu memperoleh bahan sterilan dengan konsentrasi yang mematikan mikroorganisme tapi tidak mematikan eksplan. Sebab bahan sterilan kimia umumnya bersifat racun bagi tanaman (eksplan). Pada penelitian ini digunakan daun karet muda sebagai eksplan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas bahan sterilan dalam sterilisasi eksplan daun tanaman karet dalam kultur in-vitro.

2. Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli sampai dengan September 2016 di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Lambung Mangkurat (ULM) Banjarbaru Kalimantan Selatan. Bahan eksplan yang digunakan adalah daun muda bibit karet klon PB 260. Daun karet kemudian dipotong dengan ukuran $\pm 1 \times 2$ cm. Bahan yang digunakan untuk sterilisasi adalah alkohol 70%, NaOCl 10% (v/v) dan 20% (v/v), HgCl₂ 0.01% dan H₂O₂ 17.6% (v/v).

Pembuatan Woody Plant Medium (WPM)

Pembuatan media diawali dengan pembuatan larutan stock unsur makro, unsur mikro, vitamin dan ZPT. Untuk medium WPM ditambahkan 1.5 ppm 2.4 D, 30 g L⁻¹ sukrosa, 7 g L⁻¹ agar dan 2 g L⁻¹ arang aktif. Media WPM ditetapkan pada pH 5.8, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 oC selama 15 menit. Media diinkubasi selama 2-3 minggu sebelum digunakan.

Persiapan Eksplan

Bibit karet dalam penelitian ini berumur 3 bulan yang diambil dari pembibitan karet di Desa Tungkaran Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan. Bibit karet dirawat dalam rumah kaca Fakultas Pertanian ULM dengan penyemprotan fungisida setiap 2 hari pada daun muda karet.

Perlakuan Sterilisasi Eksplan

Pada penelitian ini dilakukan 5 variasi perlakuan dengan jumlah eksplan tiap perlakuan sebanyak 40 eksplan, sehingga diperoleh 200 satuan percobaan. Daun karet terlebih dahulu dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air mengalir. Selanjutnya daun karet direndam dalam larutan asam sitrat 50 mg L⁻¹ selama 30 menit untuk meminimalisasi terjadinya *browning*. Perlakuan yang diujikan kepada eksplan daun karet adalah P1= daun karet dicuci dengan detergen langsung diinokulasi dalam media WPM., P2 = alkohol 70% selama 15 menit, P3, = NaOCl 20% (v/v) selama 10 menit, alkohol 70% selama 10 menit, P4 = HgCl₂ 0.01% selama 1 menit, NaOCl 10% (v/v) selama 7 menit, NaOCl 10% (v/v) selama 2 menit dan P5= alkohol 70% selama 1 menit, H₂O₂ 17.6% (v/v) selama 20 menit.

Pengujian Kultur In-Vitro Daun Karet

Eksplan diinokulasikan secara aseptik ke dalam media WPM steril di LAFC. Kultur ditempatkan di dalam ruang pertumbuhan pada suhu 25 ± 1 oC serta pengamatan dilakukan selama 30 HST (hari setelah tanam). Satu minggu pertama kultur ditutup kain hitam untuk meminimalisasi *browning*. Kultur dipelihara dengan cara menyemprotkan alkohol 70% pada botol kultur. Analisis Data Analisa data dilakukan dalam dua cara yaitu secara kualitatif dan secara kuantitatif.

Analisa data

secara kualitatif dengan cara deskriptif. Sedangkan secara kuantitatif, data dianalisa dengan tabel dan rumus untuk perhitungan persentase kontaminasi bakteri, kontaminasi

jamur, sumber kontaminasi (eksplan/media), eksplan yang hidup, eksplan yang mengalami pencoklatan (*browning*).

3. Hasil dan Pembahasan

Tabel 1. Eksplan tanpa perlakuan terilisasi di LAFC

HST	Jenis Kontaminan (%)		Sumber Kontaminan (%)		Browning (%)	Kondisi Eksplan (%)	
	Jamur	Bakteri	Eksplan	Media		Hidup	Mati
2 ⁽¹⁾	25	35	60	-	-	100	0
6 ⁽³⁾	75	50	100	10	7.5	40	60
15 ⁽²⁾	85	55	100	10	12.5	30	70
30	85	60	100	10	32.5	20	80

Keterangan: ⁽¹⁾=waktu awal terjadinya kontaminasi, ⁽²⁾=waktu puncak terjadinya kontaminasi, ⁽³⁾ = waktu puncak terjadinya *browning*.

Tabel 2. Kontaminasi pada sterilisasi eksplan daun karet perlakuan P2 menggunakan Alkohol 70% selama 15 menit.

HST	Jenis Kontaminan (%)		Sumber Kontaminan (%)		Browning (%)	Kondisi Eksplan (%)	
	Jamur	Bakteri	Eksplan	Media		Hidup	Mati
2 ⁽¹⁾	-	45.0	45.0	-	-	100	-
6 ⁽²⁾	5	82.5	82.5	5	-	100	-
7 ⁽³⁾	5	82.5	82.5	5	5	100	-
30	10	90.0	95.0	5	5	90	10

Keterangan: ⁽¹⁾=waktu awal terjadinya kontaminasi, ⁽²⁾=waktu puncak terjadinya kontaminasi, ⁽³⁾ = waktu puncak terjadinya *browning*.

Tabel 3. Perlakuan sterilisasi dengan Bayclin[®] 20% selama 10 menit, Alkohol 70% selama 10 menit.

HST	Jenis Kontaminan (%)		Sumber Kontaminan (%)		Browning (%)	Kondisi Eksplan (%)	
	Jamur	Bakteri	Eksplan	Media		Hidup	Mati
2 ⁽¹⁾	-	10.0	10	-	-	100.0	0
6 ⁽³⁾	10.0	90.0	90	-	10	97.5	2.5
15 ⁽²⁾	17.5	92.5	90	10	10	97.5	2.5
30	17.5	92.5	90	10	25	80.0	20.0

Keterangan: HST= hari setelah tanam, ⁽¹⁾=waktu awal terjadinya kontaminasi, ⁽²⁾=waktu puncak terjadinya kontaminasi, ⁽³⁾ = waktu puncak terjadinya *browning*.

Tabel 4. Perlakuan sterilisasi dengan HgCl₂ 0,01% selama 1 menit, Bayclin[®] 10% selama 7 menit dan larutan NaOCl 10% selama 2 menit.

HST	Jenis Kontaminan (%)		Sumber Kontaminan (%)		Browning (%)	Kondisi Eksplan (%)	
	Jamur	Bakteri	Eksplan	Media		Hidup	Mati
6 ⁽¹⁾	2.5	45.0	45.0	-	-	100.0	0
15 ⁽³⁾	2.5	52.5	52.5	-	25	95.0	5.0
17 ⁽²⁾	2.5	72.5	72.5	-	25	75.0	25.0
30	10.0	72.5	72.5	-	35	42.5	57.5

Keterangan: ⁽¹⁾=waktu awal terjadinya kontaminasi, ⁽²⁾=waktu puncak terjadinya kontaminasi, ⁽³⁾= waktu puncak terjadinya *browning*.

Tabel 5. Perlakuan sterilisasi dengan alkohol 70% selama 1 menit dan H₂O₂ 17,6% (v/v) selama 20 menit.

HST	Jenis Kontaminan (%)		Sumber Kontaminan (%)		Browning (%)	Kondisi Eksplan (%)	
	Jamur	Bakteri	Eksplan	Media		Hidup	Mati
2 ⁽¹⁾	-	5.0	5.0	-	-	100.0	0
15 ⁽³⁾	-	27.5	27.5	-	10.0	90.0	10.0
17 ⁽²⁾	-	52.5	52.5	-	2.5	97.5	2.5
30	-	65.0	65.0	-	7.5	92.5	7.5

Keterangan: ⁽¹⁾=waktu awal terjadinya kontaminasi, ⁽²⁾=waktu puncak terjadinya kontaminasi, ⁽³⁾= waktu puncak terjadinya *browning*.

Efektivitas bahan sterilan terhadap kontaminasi eksplan daun karet pada penelitian ini memberikan hasil yang bervariasi. Perlakuan P1 daun karet hanya dilakukan pencucian dengan detergen saja. Detergen diketahui dapat menghilangkan lapisan lilin dan kontaminan di permukaan tanaman. Hasil perlakuan P1 menunjukkan bahwa persentase kontaminasi pada kultur sangat tinggi jika eksplan hanya dicuci dengan detergen saja (Tabel 1). Jenis kontaminan yang ditemukan pada kultur P1, yaitu jamur putih, jamur coklat, jamur hitam, jamur hijau tua, jamur kuning dan jamur putih keabuan. Sedangkan bakteri yang mengkontaminasi adalah koloni bakteri putih bening dan putih susu.

Hasil perlakuan P2 menunjukkan bahwa penggunaan alkohol 70% selama 15 menit belum efektif menghilangkan dan menekan kontaminasi (Tabel 2) serta menyebabkan eksplan mengalami bleaching. Jenis kontaminan pada perlakuan P2, yaitu jamur putih, jamur coklat, bakteri koloni putih bening, putih susu, krem dan pink. Hasil tersebut sesuai dengan Martiansyah et al. (2013) bahwa perlakuan sterilisasi dengan satu bahan sterilan saja tidak dapat menghilangkan mikroorganisme sumber kontaminan yang ada pada permukaan eksplan. Menurut Mahmoud dan Nabeel., (2016), etanol 70% merupakan agen sterilisasi namun bersifat phyto-toxic.

Perlakuan P3 menggunakan kombinasi NaOCl 20% (v/v) dan alkohol 70%. Kombinasi NaOCl dan alkohol umum digunakan dalam sterilisasi eksplan. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Lizawati et al., (2009) dengan menggunakan alkohol 70% dan NaClO 5.25% untuk eksplan biji dan mata tunas jarak pagar. NaClO banyak digunakan sebagai agen mensterilkan permukaan, dimana jika dilarutkan di dalam air akan membentuk 2 zat asam hipoklorit (HOCl) dan ion hipoklorit (OCl⁻). Kedua zat ini berperan penting dalam oksidasi dan desinfeksi serta kinerja NaOCl akan optimal jika dibarengi dengan penggunaan etanol. Hasil yang baik dilaporkan Ndakinemi et al., (2013), dalam penggunaan kombinasi 1.5 % NaOCL (v/v) dan etanol pada eksplan *Brachylaena huillensis* (Silver Oak) serta oleh Lestari et al., (2013) pada eksplan biji manggis dengan alkohol 70% dan NaOCL 1.05% (v/v) dan NaOCL 0.525% (v/v).

Hasil penelitian terhadap eksplan daun karet menunjukkan bahwa perlakuan P3 belum efektif menekan kontaminasi (Tabel 3). Tingkat kontaminasi eksplan yang diberi perlakuan P3 masih sangat tinggi, yaitu bakteri 92.5% dan jamur 17.5% pada pengamatan 30 HST. Kontaminan yang ditemukan pada P3, yaitu jamur putih, jamur coklat dan koloni bakteri putih bening. Penelitian Dickson et al. (2011) dengan eksplan embrio karet diberi perlakuan

perendaman dalam Tween 20 sebelum disterilisasi dengan natrium hipoklorit dan etanol 70%. Menurut Martiansyah et al., (2013) Tween 20 biasanya digunakan dalam kultur jaringan berfungsi sebagai surfaktan yang menyebabkan terjadinya penurunan tegangan permukaan sel sehingga bahan-bahan steril menjadi aktif mematikan penyebab kontaminasi.

Perlakuan sterilisasi P4 merupakan kombinasi NaOCl 10% (v/v) dan HgCl₂ 0.01%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa masih terdapat kontaminasi pada eksplan daun karet dengan perlakuan P4 sebesar 72.5% bakteri dan 10% jamur pada 30 HST (Tabel 4). Kontaminan pada kultur dengan perlakuan P4, yaitu jamur putih, jamur hitam serta koloni bakteri putih susu, putih bening dan pink. Myrna (2012) melaporkan hasil yang serupa terjadi pada eksplan nodus tunggal dan pucuk muda jeruk nipis yang masih mengalami kontaminasi dengan menggunakan HgCl₂.

Bahan kimia NaOCl dan HgCl₂ diketahui memiliki kemampuan antimikrobia sehingga seringkali digunakan dalam metode sterilisasi eksplan. HgCl₂ sangat berbahaya bagi mikroorganisme karena volatilitasnya dan mampu membentuk berbagai senyawa yang mudah menguap yang beracun (Das et al., 2012). Penelitian Pratiwi (2014) menunjukkan bahwa daya antibakteri NaOCl 2.5% efektif pada bakteri *Enterococcus faecalis* dalam biofilm. Mekanisme kerja NaOCl dengan menetralkan asam amino membentuk garam dan air. Dengan keluarnya ion hidroksil maka akan terjadi penurunan pH. Asam hipoklorus (HClO), ketika kontak dengan jaringan organik akan bertindak sebagai pelarut dan memasakan klorin, yang akan berikatan dengan protein grup amino membentuk kloramin. Reaksi kloraminasi antara klorin dan grup amino (NH) akan membentuk kloramin yang menghambat metabolisme sel.

Hasil penelitian pada perlakuan P5 dengan alkohol 70% selama 1 menit dan H₂O₂ 17.6% (v/v) selama 20 menit memberikan hasil terbaik. Menurut Benazir

et al (2013), kontaminasi pada eksplan daun tanaman geranium dapat diminimalkan dengan melakukan dua tahap sterilisasi atau digunakan dua jenis bahan sterilan. Hal tersebut sejalan dengan penelitian ini yaitu sterilisasi eksplan daun karet dengan perlakuan P5 cukup efektif sehingga dapat menghilangkan kontaminasi jamur dan menekan kontaminasi bakteri (Tabel 5). Bakteri yang mengkontaminasi kultur pada perlakuan P5 yaitu koloni bakteri putih bening, putih susu dan pink. Menurut Srivastava et al. (2010) H₂O₂ dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan cendawan dengan cara menghidrolisis sel atau menggumpalkan protein yang terdapat pada protoplasma. Konsentrasi H₂O₂ yang digunakan untuk sterilisasi permukaan eksplan berkisar 3-20 % bergantung pada jenis eksplan yang digunakan. Keefektifan penggunaan kombinasi alkohol 70% dan H₂O₂ 17.6% (v/v) pada eksplan biji karet, seperti yang dilaporkan Haris et al. (2009), Bakhsh et al. (2016) bahwa kombinasi 5% n-heksan dengan 2% dari H₂O₂ memberikan hasil terbaik bagi eksplan benih kapas. Namun pada eksplan mentimun, penggunaan H₂O₂, sodium hipoklorit dan Bavistin tidak menunjukkan hasil yang memuaskan (Alam, et al., 2016). Laporan mengenai hasil sterilisasi yang beragam pada eksplan yang berbeda menunjukkan bahwa setiap bagian dan spesies tanaman yang dijadikan eksplan memiliki metode sterilisasi yang berbeda. Berdasarkan pengamatan, koloni bakteri yang mengkontaminasi eksplan daun karet pada perlakuan P5 membentuk koloni tipis di sekeliling eksplan dan muncul dalam waktu yang relatif lama. Hal ini kemungkinan disebabkan bakteri hidup di dalam jaringan tanaman. Menurut Martiansyah et al. (2013) kontaminasi bakteri seringkali sulit terdeteksi pada awal kultur stek mikro karet karena berada dalam jaringan tanaman.

Waktu pertama kemunculan kontaminan dalam kultur eksplan daun karet bervariasi. Asal kontaminasi juga bervariasi seperti dari kontaminasi eksternal yang disebabkan oleh jamur dan bakteri maupun kontaminasi

internal yang umumnya berasal dari bakteri yang tumbuh di dalam jaringan sel tanaman. Dalam kultur *in vitro* kontaminasi eksternal ini dapat dikontrol sampai batas tertentu dengan cara sering ditransfer ke media baru atau dengan penggunaan konsentrasi rendah antibiotik dalam medium (Qin et al., 2012 ; Olowe et al., 2014; Guma et al., 2015). Selain itu, kondisi eksplan saat 30 HST juga bervariasi, dimana eksplan hidup tertinggi hingga terendah berturut-turut diperoleh perlakuan P5,P2,P3,P4 dan P1. Pada penelitian ini eksplan diasumsikan hidup jika tidak gosong akibat sterilan dan tidak tertutupi oleh kontaminan.

4. Kesimpulan

Perlakuan P1 (inokulasi langsung ke media WPM), P2 (alkohol 70%, 15 menit), P3 (NaOCl 20% (v/v), 10 menit, alkohol 70%, 10 menit), P4 (HgCl₂ 0.01%, 1 menit, NaOCl 10% (v/v), 7 menit, NaOCl 10% (v/v), 2 menit) belum dapat menekan serta menghilangkan kontaminasi jamur dan bakteri. Hasil terbaik diperoleh dari perlakuan P5 menggunakan alkohol 70% dan H₂O₂ 17.6% (v/v) dengan kontaminasi bakteri hingga 30 HST sebesar 65% dan menghilangkan kontaminasi jamur. dikatakan memiliki keanekaragaman spesies rendah jika komunitas tersebut hanya disusun oleh sedikit spesies atau hanya ada sedikit spesies yang dominan.

Daftar Pustaka

- Abbas B.S., S. Ginting. 1981. Influence of Rootstock and Scion on Girth Increment in Rubber Trees. Buletin Balai Penelitian Perkebunan Medan. 2: 145-152.
- Alam, M.F., M.E. Uddin., R. Amin.,M.A.Razak., M.A. Manik., M.M., Khatun. 2016. Studies on the effect of various sterilization procedure for *in vitro* seed germination and successful micropropagation of *Cucumis sativus*. Int. J. Pure App. Biosci. 4:75-81.
- Bakhsh, A., E. Anayol, C. Sancak, S. Ozcan. 2016. An efficient and cost effective sterilizing method with least microbial contamination and maximum germination ratio for *in vitro* cotton (*Gossypium hirsutum* L.) culture. J.Anim.Plant Sci. 26: 868-873.
- Balai Penelitian Sembawa. 2010. Klon Karet Anjuran Tahun 2010-2014. Balai Penelitian Karet Sembawa.Sumatera Selatan.
- Benazir J.F, R. Suganthi, P. Chandrika, B. Mathithumila 2013. *In vitro* regeneration and transformation studies on *Pelargonium grave-olens* (geranium) - an important medicinal and aromatic plant. J. Medicine Plant Res. 7: 2815-2822.
- Colgecen, H., U. Koca, G. Toker. 2011. Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. Turk J. Biol. 35: 513-520.
- Das, M.P., L.J. Rebecca, S. Sharmila, S. Chatterjee. 2012. Study on the effect of mercury (II) chloride as disinfectant on mixed culture. J. Chem. Pharm. Res. 4:4975-4978.
- Dickson I., A. Okere, J. Elizabeth, O. Mary, F. Olatunde, S. Abiodun .2011. *In-vitro* culture of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) embryo. J Plant Breed Crop Sci. 3: 185-189.
- Guma T.B., K. Jane, O. Justus, P.N. Kariyuki. (2015). Standardization of *in vitro* sterilization and callus induction protocol for leaf explants of anchote: *Cocconia Abyssinica*. Int. J. Res. Dev. Pharm. L. Sci. 4: 1427-1433.
- Habibah, N.A., Sumadi, S. Ambar. 2013. Optimasi Sterilisasi Permukaan Daun dan Eliminasi Endofit pada Burahol. Biosaintifika. 5: 94-99.
- Haris, N., Sumaryono, Carron. 2009. Pengaruh bahan sterilan, tutup tabung kultur dan musim terhadap tingkat kontaminasi eksplan pada kultur *microcutting* karet. Menara Perkebunan. 77: 89-99.
- Hartawan, R. 2012. Kompatibilitas batang bawah karet klon GT 1 dengan mata entres beberapa karet klon generasi V. Agrosientia. 19:137-142.
- Lestari, E.G., M.R. Suhartono, A. Kurniawati, S. Rahayu. 2013. Inisiasi tunas ganda tanaman manggis malinau melalui kultur *in vitro* untuk perbanyakan klonal. J. Agron. Indonesia. 41: 40 – 46.
- Lizawati, T. Novita, R. Purmaningsih. 2009. Induksi dan multiplikasi tunas jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) secara *in vitro*. J. Agron. Indonesia. 37: 78-85.
- Mahmoud, S.N., K.A. Nabeel. 2016. Effect of different sterilization methods on

- contamination and viability of nodal segments of *Cestrum nocturnum* L. International J. Res. Stud. Biosc. 4:4-9.
- Martiansyah, I., D.D. Eris, N. Haris, D. Taniwiryono. 2013. Optimasi prosedur sterilisasi permukaan eksplan stek mikro karet (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg). Menara Perkebunan. 81:9-14.
- Myrna, N. 2005. Kultur jaringan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) : Pengaruh metoda sterilisasi dan komposisi media. Agronomi. 9: 99-102.
- Ndakidemi, C.F., E. Mneney, P.A. Ndakidemi. 2013. Development of sanitation protocol for leaf explants of *B. huillensis* for in vitro culture. AJPS. 4: 2425-2430.
- Olowe, O, A. Adesoye., O. Ojobo, O. Amusa, S. Liamngee. 2014. Effects of Sterilization and *Phytohormones* onshoot Tip Culture of *Telfairia occidentalis*. Journal of Natural Science Research. 4:53-58.
- Pratiwi, V.H. 2014. Daya antibakteri fotodinamik dengan biru toluidin terhadap *Enterococcus faecalis* dalam biofilm. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Srivastava, N., B. Kamal, V.Sharma and Y.K. Negi, A.K. Dobriyal, S. Gupta and V.S. Jadon 2010. Standarization of Sterilization Protocol for Micropropogation of *Aconitum heterophyllum*- An Endangered Medicinal Herb. Academ. Arena. 2: 37-42.
- Sundari, L.,L.A.M. Siregar, D.S. Hanafiah. 2015. Kajian Awal : Respon eksplan nodus dalam inisiasi tunas mikro tanaman karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) dalam medium WPM. Agroekoteknologi. 3: 179-187.
- QinYaoguo., Zeng Fuchun., Sun Xin., Feng Yingli., Yang Cuiqin .2012. Propagation of *Cleome spenos*. J. Microb. Biotech. Food Sci: a Jack through tissue culture. 1:1319-1327.