

**PENGEMBANGAN METODE STERILISASI PADA BERBAGAI  
EKSPLAN GUNA MENINGKATKAN KEBERHASILAN  
KULTUR KALUS KENCUR (*Kaemferia galanga* L)**

**Anis Shofiyani<sup>1)</sup> dan Neni Damajanti<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup>Program Studi Agroteknologi Universitas Muhammadiyah Purwokerto

<sup>2)</sup>Program Studi Teknik Kimia Universitas Muhammadiyah Purwokerto

e-mail: anisshof@yahoo.co.id

Masuk: 2 Maret 2015; Diterima: 4 Mei 2015

**ABSTRAK**

*Dewasa ini penggunaan obat tradisional yang bersumber dari tumbuh-tumbuhan dimasyarakat semakin meningkat sebagai dampak dari konsep hidup kembali ke alam (back to nature). Salah satu tumbuhan yang dikembangkan sebagai tanaman obat di Indonesia adalah kencur (*Kaemferia galanga*). Kencur banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional (jamu), fitofarmaka, industri kosmetika, penyedap makanan dan minuman, rempah, serta bahan campuran saus rokok pada industri rokok kretek. Secara empirik kencur digunakan sebagai penambah nafsu makan, infeksi bakteri, obat batuk, disentri, tonikum, ekspektoran, masuk angin, sakit perut karena rimpangnya mengandung senyawa metabolit sekunder antara lain saponin, flavonoid, fenol serta minyak atsiri (Syamsuhidayat dan Johnny, 1991).*

*Tahap awal keberhasilan kultur kalus yang dilakukan tidak lepas dari ketepatan pemilihan bahan dasar eksplan yang akan digunakan dan juga teknik sterilisasi yang dilakukan selama kultur kalus. Ketepatan pemilihan sterilan dan lamanya waktu pemberian sterilan pada berbagai macam eksplan ternyata memberikan respon yang berbeda. Penelitian ini merupakan upaya dalam perolehan metode sterilisasi yang tepat pada berbagai macam sumber eksplan berupa daun, akar dan irisan rhizome dalam media MS yang digunakan dalam kultur in vitro khususnya kultur kalus tanaman kencur (*Kaemferia galanga*), sehingga akan diperoleh metode sterilisasi yang sesuai untuk memperbanyak kalus kencur.*

*Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan yang efektif untuk menekan pertumbuhan dan perkembangan sumber kontaminasi adalah Natrium hipoklorit (NaOCl 10 %), 5 menit + Alkohol 70 % ,1 menit pada eksplan daun, kombinasi perlakuan Natrium hipoklorit (NaOCl 5 %), 5 menit + Alkohol 70 % ,1 menit untuk eksplan akar dan kombinasi perlakuan Alkohol 70 % ,1 menit + Kaporit ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) 6%, 20 menit untuk eksplan rimpang kencur. Sumber kontaminan yang dominan tumbuh adalah bakteri dan jamur dari jenis *Mucor* dan *Rhizopus* dengan ciri morfologi hifa berwarna putih hingga kelabu hitam.*

Keywords: sterilisasi, eksplan, kultur kalus, kencur

**PENDAHULUAN**

Konsep hidup kembali ke alam (*back to nature*) berdampak pada berkembang pesatnya industri obat tradisional beberapa tahun terakhir ini,

dimana pemanfaatan tanaman obat sebagai bahan baku obat alami semakin meningkat. Namun demikian permasalahan yang sering muncul berkaitan dengan hal tersebut adalah masalah bahan baku

tanamannya, baik dalam hal pembudidayaannya maupun dari faktor biosintesis senyawa metabolit sekunder dalam tanaman sebagai konstituen aktif yang berkhasiat obat secara kualitas maupun kuantitas (Sumaryono, 1996).

Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai obat yaitu kencur (*Kaemferia galangal* L). Kencur banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional (jamu), fitofarmaka, industri kosmetika, penyedap makanan dan minuman, rempah, serta bahan campuran saus rokok pada industri rokok kretek. Secara empirik kencur digunakan sebagai penambah nafsu makan, infeksi bakteri, obat batuk, disentri, tonikum, ekspektoran, masuk angin, sakit perut karena rimpangnya mengandung antara lain saponin, flavonoid, fenol serta minyak atsiri (Syamsuhidayat dan Johnny, 1991).

Perolehan metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* merupakan alternatif yang memiliki harapan dibanding melalui produksi tanaman utuh/konvensional (Kurz dan Constabel, 1991. cit. Ariningsih, *et.al.* 2003). Hal ini disebabkan karena teknik kultur *in vitro* memiliki banyak keuntungan diantaranya tidak tergantung pada faktor lingkungan, sistem produksinya dapat diatur sehingga kualitas dan produksinya lebih konsisten untuk memenuhi kebutuhan pasar serta dapat mengurangi penggunaan lahan

(Sitinjak, 2000. cit. Ariningsih, *et al.* 2003).

Ditilik dari keunggulan penggunaan teknik *in vitro* untuk pengadan bahan baku obat berkualitas, pengembangan teknik ini khususnya kultur kalus mempunyai prospek yang baik mengingat keuntungan-keuntungan dari segi fisik-material yang dihasilkan. Namun demikian teknik ini akan menjadi layak apabila tahapan awal kegiatan kultur kalus berupa penyediaan eksplan yang bersih, sehat dan tidak terkontaminasi dapat terpenuhi. Kegiatan sterilisasi merupakan upaya yang dilakukan dalam rangka mencegah dan menghindari kontaminasi, dan kegiatan ini hal mutlak yang harus dilakukan dalam berbagai rangkaian kegiatan kultur *in vitro*. Sterilisasi sangat menentukan keberhasilan dalam perbanyakan tanaman melalui teknik ini. Kegiatan sterilisasi eksplan yang dilakukan bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme yang kemungkinan terbawa saat pengambilan eksplan dan ini berpotensi untuk terjadinya kontaminasi pada tahapan selanjutnya dan berdampak pada penghambatan pertumbuhan eksplan menjadi kalus ataupun tanaman utuh didalam media *in vitro*. Dengan dilaksanakannya penelitian ini diharapkan dapat memperoleh metode sterilisasi eksplan yang sesuai untuk berbagai macam eksplan tanaman kencur (*Kaemferia*

*galanga* L) yang mampu mengeliminir perkembangan mikroorganisme penyebab kontaminasi yang terbawa eksplan sehingga akan diperoleh sumber bahan tanam yang bersih, sehat dan terbebas dari mikroorganisme penyebab kontaminan serta mampu berkembang menjadi kalus melalui kultur *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Purwokerto, waktu penelitian berlangsung selama 8 (delapan) bulan.

### Rancangan Percobaan

Perlakuan sterilisasi terdiri atas dua faktor yaitu faktor pertama asal eksplan dengan tiga aras ( akar, daun dan rhizome) dan faktor kedua kombinasi jenis, konsentrasi dan waktu aplikasi sterilant. Kombinasi perlakuan untuk jenis, konsentrasi dan lamanya aplikasi sterilant pada berbagai eksplan dapat dilihat pada Tabel 1. Semuanya disusun acak dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga ulangan, dan setiap unit perlakuan menggunakan 10 botol kultur.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Senyawa Kimia Sterilant Dan Lamanya Aplikasi Sterilant Pada Berbagai Eksplant Kencur (*Kaemferia galanga* L)

Eksplant	Sterilan	Kombinasi Perlakuan
<b>Daun (D)</b>		
D	A1N1	D. A1N1
D	A1N2	D. A1N2
D	A2N1	D. A2N1
D	A2N2	D. A2N2
D	A1K1	D. A1K1
D	A1K2	D. A1K2
D	A2K1	D. A2K1
D	A2K2	D. A2K2
<b>Akar (A)</b>		
A	A1N1	A. A1N1
A	A1N2	A. A1N2
A	A2N1	A. A2N1
A	A2N2	A. A2N2
A	A1K1	A. A1K1
A	A1K2	A. A1K2
A	A2K1	A. A2K1
A	A2K2	A. A2K2
<b>Rimpang</b>		
R	A1N1	R. A1N1
R	A1N2	R. A1N2
R	A2N1	R. A2N1
R	A2N2	R. A2N2
R	A1K1	R. A1K1
R	A1K2	R. A1K2
R	A2K1	R. A2K1
R	A2K2	R. A2K2

*Keterangan :*

A1N1 :Alkohol 70% ,1 menit + (NaOCl 5 %),5 menit

A1N2 : Alkohol 70%, 1 menit + (NaOCl 5%),10 menit

A2N1 :Alkohol 70% ,2 menit + (NaOCl 10 %),5 menit

A2N2 :Alkohol 70%, 2 menit + (NaOCl 10%),10 menit

A1K1 :Alkohol 70% ,1 menit + (Ca(ClO)<sub>2</sub>)6%,20 menit

A1K2 :Alkohol 70%, 1 menit + (Ca(ClO)<sub>2</sub>)6%,30 menit

A2K1 :Alkohol 70%,2 menit + (Ca(ClO)<sub>2</sub>)6%,20 menit

A2K2 :Alkohol 7 %,2 menit + (Ca(ClO)<sub>2</sub>)6%,30 menit

## **Pelaksanaan Penelitian**

### **1. Pembuatan Medium MS**

Prosedur pembuatan medium MS yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Semua bahan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer, meliputi:

- a. Aquades sebanyak 500 ml terlebih dahulu dimasukkan ke gelas piala 1000 ml.
- b. Menambahkan larutan stok A 100 ml; stok B 0,5 ml; stok C 0,5 ml; stok D 0,5 ml; stok E 1 ml; stok F 0,5 ml, vitamin, zat pengatur tumbuh,mio-inositol, sukrosa dan agar.
- c. Menambahkan air sampai volume 1000 ml.
- d. Mengukur pH larutan dengan pH meter, dengan kebutuhan pH sekitar 5,7 – 5,8, jika pH tinggi diturunkan dengan HCl 1N dan jika pH rendah di naikan dengan KOH 1N dengan cara ditetesi sampai mencapai pH yang diinginkan.
- e. Memasukkan *magnetic stirrer* ke dalam gelas beker, kemudian

hotplate dinyalakan, dan ditunggu hingga larutan yang dibuat menjadi homogen.

- f. Menuang larutan medium ke botol kultur sebanyak 15 ml/ botol.
- g. Menutup botol kultur yang telah diisi medium dasar MS dengan alumunium foil dan memberikan label sesuai perlakuan.
- h. Melakukan sterilisasi basah menggunakan autoklaf dengan memasukkan botol-botol tersebut ke dalam autoklaf dan disterilisasi dengan suhu 121°C dengan tekanan 1,5 psi selama 20-30 menit.
- i. Menyimpan media yang sudah disterilisasi di dalam ruang penyimpanan media yang steril ber-AC (suhu 24 - 26°C) selama 3 hari sebelum digunakan untuk memastikan bahwa media yang telah dibuat tersebut tidak terkontaminasi dan dapat digunakan dalam penelitian.

### **2. Sumber dan Steriliasi Eksplan**

Bahan yang akan digunakan sebagai eksplan adalah daun, akar dan irisan

rhizome (daun dan akar berasal dari rimpang yang ditumbuhkan dalam media steril). Penyediaan eksplan dilakukan dengan cara mengambil potongan akar dari rimpang yang tumbuh, irisan melintang rhizome dan irisan daun dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm dari daun yang sudah terpilih dan disterilisasi. Sterilisasi akan dilakukan sesuai perlakuan.

Sterilisasi bahan tanaman dimulai dengan pencucian dan pembuangan bagian-bagian yang kotor dan mati di bawah air bersih yang mengalir. Pencucian dapat dilakukan dengan penyikatan menggunakan detergent halus. Terkadang bahan yang sudah bersih dibiarkan dibawah air mengalir selama 30 menit. Hal ini dilakukan untuk memecah koloni kontaminan yang masih menempel dipermukaan agar koloni tersebut lebih peka terhadap bahan-bahan sterilisasi. Juga untuk mengurangi dan menghilangkan senyawa fenol, terutama pada tanaman yang kandungan fenoliknya tinggi.

Bahan yang sudah bersih dkecilkan sampai ukuran tertentu. Ukuran ini harus lebih besar dari ukuran eksplan yang direncanakan. Bahan kemudian direndam dalam larutan sterilant sesuai perlakuan yang dirancang. Setelah waktu perendaman tercapai, bahan dicuci bersih dan ditiriskan, kemudian bawa masuk ke dalam laminar dan siap di tanam pada media kultur.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Waktu Pertama Kontaminasi Tumbuh**

Hasil pengamatan waktu pertama kontaminasi muncul menunjukkan bahwa rerata variasi waktu yang beragam. Dalam pengamatan ini asal kontaminasi berpengaruh terhadap waktu yang dibutuhkan sampai sumber kontaminasi muncul dalam media. Waktu yang dibutuhkan bervariasi dengan waktu yang singkat (kurang dari 7 hari) hingga membutuhkan waktu cukup lama (lebih dari 10 hari) hingga kontaminasi muncul.

Dari variasi waktu tersebut, dalam pengamatan waktu pertama kontaminasi muncul dibagi menjadi 2 (dua) kelompok sumber kontaminasi yaitu kontaminasi eksternal (waktu pertama kontaminasi muncul kurang dari 10 hari) dan kontaminasi internal (waktu pertama kontaminasi muncul lebih dari 10 hari). Data hasil pengamatan waktu pertama kontaminasi muncul dapat dilihat pada Tabel 2 dibawah ini.

Dari data tersebut terlihat bahwa kombinasi perlakuan sterilisasi yang diberikan pada masing-masing sumber eksplan memberikan pengaruh yang bervariasi terhadap waktu pertama kali kontaminasi muncul. Masing-masing sumber eksplan memberikan respon yang berbeda terhadap kombinasi sterilisasi yang diberikan.

Tabel 2. Rerata Waktu Pertama Kontaminasi Muncul (hari setelah inokulasi)

Perlakuan Sterilisasi	Eksternal		Internal	
	Jamur	Bakteri	Jamur	Bakteri
D. A1N1	5			
D. A1N2	5	5		18
D. A2N1				
D. A2N2	10	4		22
D. A1K1	5			
D. A1K2	5,67			
D. A2K1	5			
D. A2K2	5			
<b>Rerata Daun</b>	<b>5,67</b>	<b>4,5</b>	<b>0</b>	<b>20</b>
A. A1N1				
A. A1N2	7	6		27
A. A2N1				18
A. A2N2		7		25
A. A1K1	9,5			
A. A1K2	6,3			
A. A2K1	5	8	18	
A. A2K2	10	8	18	
<b>Rerata Akar</b>	<b>7,56</b>	<b>7,25</b>	<b>18</b>	<b>22,5</b>
R. A1N1	4,5	4,5		
R. A1N2	5	6	13	
R. A2N1	8		13	
R. A2N2			11	
R. A1K1				
R. A1K2	8			
R. A2K1			18	
R. A2K2				
<b>Rerata Rimpang</b>	<b>6,38</b>	<b>5,25</b>	<b>13,75</b>	<b>0</b>

Parameter waktu pertama kontaminasi muncul dari masing-masing eksplan dengan perlakuan sterilisasi yang diberikan menunjukkan bahwa rerata waktu yang diperlukan untuk terjadinya kontaminasi eksternal yang disebabkan oleh jamur untuk sumber eksplan daun adalah 5,67 hari sedangkan yang disebabkan oleh bakteri adalah 4,5 hari. Kontaminasi internal pada sumber eksplan daun yang disebabkan oleh bakteri adalah selama 20 hari. Untuk sumber eksplan akar rerata waktu yang diperlukan untuk terjadinya kontaminasi eksternal yang

disebabkan oleh jamur adalah 18 hari sedangkan yang disebabkan oleh bakteri adalah 22,5 hari. Untuk sumber eksplan rimpang rerata waktu yang diperlukan untuk terjadinya kontaminasi eksternal yang disebabkan oleh jamur adalah 6,38 hari sedangkan yang disebabkan oleh bakteri adalah 5,25 hari. Kontaminasi internal pada sumber eksplan rimpang yang disebabkan oleh jamur

disebabkan oleh jamur adalah 18 hari sedangkan yang disebabkan oleh bakteri adalah 22,5 hari. Untuk sumber eksplan rimpang rerata waktu yang diperlukan untuk terjadinya kontaminasi eksternal yang disebabkan oleh jamur adalah 6,38 hari sedangkan yang disebabkan oleh bakteri adalah 5,25 hari. Kontaminasi internal pada sumber eksplan rimpang yang disebabkan oleh jamur

rerata waktu yang diperlukan untuk munculnya kontaminasi adalah 13,75 hari.

Sedangkan kombinasi perlakuan sterilisasi yang memberikan pengaruh terbaik terhadap waktu pertama kali kontaminasi muncul pada sumber eksplan daun adalah perlakuan Natrium hipoklorit (NaOCl 10%), 5 menit + Alkohol 70%, 1 menit dimana hasilnya menunjukkan tidak terjadi kontaminasi eksternal dan internal yang disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Pada sumber eksplan akar perlakuan Natrium hipoklorit (NaOCl 5%), 5 menit + Alkohol 70%, 1 menit juga menunjukkan tidak terjadinya kontaminasi eksternal dan internal baik yang disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Sedangkan pada sumber eksplan rimpang perlakuan Natrium hipoklorit (NaOCl 5%), 5 menit + Alkohol 70%, 1 menit; dan

perlakuan Natrium hipoklorit (NaOCl 5%), 5 menit + Alkohol 70%, 1 menit keduanya menunjukkan pengaruh baik berupa tidak terjadinya kontaminasi pada eksplan yang berasal dari jamur maupun bakteri.

### **Sumber Kontaminasi**

Pengamatan terhadap sumber kontaminasi pada penelitian ini menunjukkan bahwa sumber kontaminan pada media disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Kontaminasi berasal dari kontaminan eksternal baik berupa jamur maupun bakteri, begitu pula kontaminan internal yang pada umumnya berasal dari bakteri dan jamur yang tumbuh di dalam jaringan tanaman. Sumber kontaminan yang menyerang dapat dilihat pada Tabel 3.



a. Kontaminasi jamur



b. Kontaminasi bakteri

Gambar 1. Kontaminasi yang Berasal dari Sumber Kontaminan Jamur dan Bakteri (Gambar a dan b)

Tabel 3. Identifikasi Sumber Kontaminasi dari Warna Koloni yang Terbentuk (jamur dan bakteri)

Perlakuan Sterilisasi	Eksternal		Internal	
	Jamur	Bakteri	Jamur	Bakteri
D. A1N1	Kelabu hitam			
D. A1N2	Putih	Lendir kecoklatan		
D. A2N1				
D. A2N2	putih	Lendir kecoklatan		Lendir kecoklatan
D. A1K1	Putih dan kelabu hitam	Lendir kecoklatan		
D. A1K2	Putih dan kelabu hitam			
D. A2K1	Putih dan kelabu hitam			
D. A2K2	Putih dan kelabu hitam			
A. A1N1				
A. A1N2	Kelabu hitam	Lendir kecoklatan		Lendir kecoklatan
A. A2N1				Lendir putih
A. A2N2		Lendir putih, kecoklatan dan kuning		Lendir putih
A. A1K1	Hijau, Putih dan kelabu hitam			
A. A1K2	Putih dan kelabu hitam			
A. A2K1	Putih dan kelabu hitam	Lendir putih	Kelabu hitam	
A. A2K2	Putih dan kelabu hitam		Kelabu hitam	
R. A1N1	Putih	Kuning		
R. A1N2	Putih	Lendir putih	Kelabu hitam	
R. A2N1	Kelabu hitam		Kuning kehijauan Kelabu hitam	
R. A2N2				
R. A1K1				
R. A1K2	Kelabu hitam			
R. A2K1			Kelabu hitam	
R. A2K2				

Hasil pengamatan terlihat bahwa sumber kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri menunjukkan ciri-ciri terbentuknya lapisan lendir berwarna putih dan lendir berwarna putih kecoklatan di bagian permukaan media yang terkontaminasi. Sedangkan kontaminasi yang disebabkan oleh jamur menunjukkan ciri-ciri terbentuknya lapisan hifa berwarna putih dan putih kelabu hitam di permukaan media yang terkontaminasi.

Berdasarkan ciri-ciri yang ditunjukkan sumber kontaminasi berupa jamur dengan terbentuknya warna hifa putih sampai hitam kelabu maka jenis jamur yang menyerang adalah jenis *Mucor*

dan *Rhizopus*. Sejalan dengan hasil penelitian Susilowati, *et.al.*, (2001), hampir 80 % dari kultur in vitro yang diamati terserang kedua cendawan ini. Ciri morfologi yang ditunjukkan adalah hifa seperti benang berwarna putih hingga kelabu hitam, bagian tertentu tampak sporangium dan sporangiospora berupa titik-titik hitam seperti jarum pentul.

#### Persentase Kontaminasi

Pengamatan terhadap persentase eksplan yang terkontaminasi dalam penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum persentase kontaminasi masih diatas 50%, untuk lebih jelasnya dapat dilihat dalam Tabel 4.

Tabel 4. Persentase Eksplan yang Terkontaminasi (%)

Perlakuan Sterilisasi	Eksternal		Internal		Total
	Jamur	Bakteri	Jamur	Bakteri	
D. A1N1	100				100
D. A1N2	20	20			40
D. A2N1					0
D. A2N2	20	20		20	60
D. A1K1	90	10			100
D. A1K2	80				80
D. A2K1	100				100
D. A2K2	100				100
A. A1N1					0
A. A1N2	20	20		20	60
A. A2N1				20	20
A. A2N2		60		20	80
A. A1K1	60			20	80
A. A1K2	60	20			80
A. A2K1	60	20	20		100
A. A2K2	40		40		80
R. A1N1	20	40			60
R. A1N2	20	20	20		60
R. A2N1	20		20		40
R. A2N2			20		20
R. A1K1					0
R. A1K2	20				20
R. A2K1			20		20
R. A2K2					0
<b>Rerata</b>	<b>51,88</b>	<b>25,56</b>	<b>23,33</b>	<b>20</b>	<b>54,167</b>

Dari tabel 4 terlihat bahwa perlakuan (Alkohol 70% selama 15') menunjukkan persentase kontaminasi terendah yaitu hanya 50%, perlakuan (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 10') sebanyak 60%, perlakuan (Bayclin 20% selama 5' + alkohol 70% selama 5') dan (Bayclin 20% selama 10' + Alkohol 70% selama 5') sebanyak 70%, sedangkan perlakuan (Bayclin 20% selama 5' + Alkohol 70% selama 10') dan (Bayclin 20% selama 15') menunjukkan persentase kontaminasi tertinggi yaitu sebanyak 80%.

#### KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan yang efektif untuk menekan pertumbuhan dan perkembangan sumber kontaminasi adalah Natrium hipoklorit (NaOCl 10%), 5 menit + Alkohol 70% ,1 menit pada eksplan daun, kombinasi perlakuan Natrium hipoklorit (NaOCl 5%), 5 menit + Alkohol 70%, 1 menit untuk eksplan akar dan kombinasi perlakuan Alkohol 70%, 1 menit + Kaporit (Ca(ClO)<sub>2</sub>) 6%, 20 menit untuk eksplan rimpang kencur. Sumber kontaminan yang dominan tumbuh adalah bakteri dan jamur dari jenis *Mucor* dan

*Rhizopus* dengan cirri morfologi hifa berwarna putih hingga kelabu hitam.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ariningsih, I. Solihatun, Endang A. 2003. *Pertumbuhan Kalus dan Produksi Antrakuinon Mengkudu (Morinda citrifolia, L.) pada Media Murashige-Skoog (MS) dengan Penambahan Ion Ca<sup>2+</sup> dan Cu<sup>2+</sup>*. Biofarmasi 1 (2): 39-43, Agustus 2003, ISSN: 1693-2242.
- Bohm, B.A. 1998. *Introduction to Flavonoids*. Canada: Harwood Academic Publishers. Page 13.
- Dodds, J.H. dan L.W. Roberts, 1985. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Second Edition. Cambridge: Cambridge University.
- George, E.F. dan Sherrington, P.D. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exergetic Limited. England. p. 39-71; 331-382.
- Gunawan, L.W., 1988. *Teknik Kultur Jaringan*. Lab. Kultur Jaringan Tanaman Depdikbud Dirjen Dikti, PAU Bioteknologi, IPB Bogor.
- Mulyaningsih T dan A. Nikmatullah, 2008. *Kultur Jaringan Tanaman*. Fakultas Pertanian UNRAM.
- Murashige, T. 1974. *Plant Propagation through Tissue Culture*. Annual Review. Plant Physiology 25 : 135-166.
- Pancaningtyas, S. dan C. Ismayadi, 2011. *Sterilisasi Ulang Pada Perbanyakan Somatic Embryogenesis Propagation To Save Contaminated Embryos*. Pelita Perkebunan 27(1) 2011, 1-10.
- Sumaryono, W. 1996. *Pengkajian Metabolit Sekunder dan Prospeknya dalam Perkembangan Industri Nasional*. Kuliah Tamu pada Forum Himpunan Mahasiswa Kimia FMIPA-ITS-Surabaya, Sub Direktorat Medika-Direktorat Pengkajian Ilmu Dasar dan Terapan BPPT, Jakarta.
- Suratman, A. Pitoyo dan S. Mulyani, 2013. *Keefektifan Penggunaan Vahan Sterilisasi Dalam Pengendalian Kontaminasi Eksplan Pada Perbanyakan Tanaman Sirsak (Annona muricata L) Secara In Vitro*. Publikasi Hasil Penelitian Hibah Bersaing Dikti 2013.
- Susilowati, A. dan S. Listyawati, 2001. *Keanekaragaman jenis Mikroorganisme sumber kontaminasi kultur In Vitro di Sub Lab Biologi laboratorium MIPA Pusat UNS*. Biodiversitas. Vol. 2, nomor 1. Hal 110-114.
- Syamsuhidayat, SS dan Johny, R.H. 1991. *Inventaris Tanaman Obat*. Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 616 p.