

OPTIMASI METODE STERILISASI EKSPLAN DAUN GAMBIR (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) ASAL PAKPAK BHARAT SECARA *IN VITRO****Optimization of Sterilization Methods for In Vitro Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) Leaf Explants from Pakpak Bharat*****Nida Wafiqah Nabila M. Solin^{1*}, Luthfi Aziz Mahmud Siregar¹**¹Program Studi Ilmu Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara
JL. Dr. A. Sofian No. 3 Medan 20155, Sumatera Utara, Indonesia*Email korespondensi: nida.wafiqah@uin-suska.ac.id**ABSTRACT**

Gambir, a prominent commodity of Pakpak Bharat from the Rubiaceae family, can be propagated through in vitro techniques. However, in vitro culture of gambir faces challenges such as high contamination and browning rates, which can lead to explant mortality. This study aimed to identify the optimal sterilization method to reduce contamination and browning levels in gambir leaves propagated in vitro. The research was conducted at the Tissue Culture Laboratory, Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau from February to April 2024. A completely randomized design (CRD) with a single factor was applied, consisting of four treatments and five replications. The collected data were statistically analyzed, and significant differences were assessed using the LSD test. The results revealed that Method 4, which involved washing the explants with Sunlight detergent followed by rinsing under running water for 60 minutes, soaking in Tween 80 (3 drops/liter) for 20 minutes, rinsing with distilled water three times, soaking in a solution of fungicide, bactericide, erythromycin, and zoralin for 30 minutes, rinsing three times, soaking in alcohol for 1 minute, rinsing three times, soaking in 20% and 10% Bayclin solutions for 10 minutes each, and rinsing three times, was the most effective. This method successfully reduced contamination and browning in gambir leaf explants, achieving up to 80% sterile explants with no browning observed.

Keywords: erythromycin, explants, sterilization, Tween 80, zoralin

PENDAHULUAN

Tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) merupakan tanaman perdu, termasuk salah satu famili Rubiaceae (kopi-kopian) (Dhalimi, 2006). Gambir adalah salah satu hasil hutan bukan kayu berdasarkan Peraturan Menteri Kehutanan Nomor P.35/Menhut-II/2007 tentang Hasil Hutan Bukan Kayu. Gambir merupakan komoditas spesifik lokasi dan unggulan Kabupaten Pakpak Bharat, dan salah satu komoditas perkebunan rakyat yang memiliki nilai ekonomi tinggi, dan prospektif untuk diusahakan secara komersial mengingat kegunaannya yang beragam (Nainggolan dan Parhusip, 2012).

Gambir dapat diperbanyak secara generatif maupun vegetatif. Perbanyakan secara generatif memiliki kendala karena tanaman gambir lokal tidak menghasilkan bunga dan buah apabila tanaman diberi pemangkasan atau pemanenan, sehingga untuk tanaman memperoleh biji atau benih para petani harus mencari di hutan atau gambir liar (Sebayang, 2014). Sementara perbanyakan vegetative melalui stek tingkat keberhasilannya hanya 20-45% (Fauza et al., 2006). Untuk mengatasi permasalahan tersebut, maka dilakukan perbanyakan vegetatif menggunakan teknik kultur jaringan.

Perbanyak tanaman melalui kultur jaringan menawarkan alternatif untuk mengatasi masalah perbanyak konvensional, karena sistem ini memiliki keunggulan untuk memperoleh tanaman baru dengan sifat serupa dengan induknya, serta varietas tanaman yang homogen untuk klon atau bibit unggul (Xu et al., 2022). Zaman et al. (2021) menambahkan bahwa kultur jaringan mampu memproduksi tanaman bebas penyakit, bibit massa dalam kurun waktu yang lebih singkat, serta dapat meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder tanaman. Namun, dalam pelaksanaan kultur *in vitro* sendiri terdapat kendala yang sangat umum terjadi dan harus ditemukan solusinya dengan baik dan tepat. Adapun permasalahan tersebut adalah kontaminasi dan pencokelatan.

Kontaminasi dapat berasal dari beberapa faktor, seperti faktor internal dan faktor eksternal. Pancaningtyas (2020) mengatakan bahwa sumber kontaminasi yang paling sulit diatasi adalah sumber kontaminan dari faktor internal, yang biasanya ditemukan dari eksplan itu sendiri. Adanya kontaminasi ini menyebabkan pertumbuhan eksplan menjadi terhambat bahkan mati karena nutrisi yang dibutuhkan berkurang karena persaingan nutrisi antara kontaminan dan eksplan. Selain itu, gambir mengandung senyawa fenolik berkadar tinggi yang dapat menyebabkan terjadinya pencoklatan jaringan (*browning*). Pencoklatan ini disebabkan oleh oksidasi polyphenol, katekin dan tanin yang dirangsang oleh pelukaan jaringan tanaman. Pencoklatan ini akan menghambat pertumbuhan bahkan menyebabkan kematian dari eksplan (Hutami, 2008). Keadaan tersebut menyukarkan penentuan suatu prosedur sterilisasi standar yang berlaku untuk semua tanaman ataupun bagian tanaman itu sendiri. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi metode sterilisasi yang tepat untuk mendapatkan eksplan gambir yang sehat, bebas dari kontaminan dan terhindar dari pencokelatan.

Sterilisasi pada eksplan bertujuan untuk mencegah atau membunuh mikroorganisme yang kemungkinan terbawa atau menempel di daun pada saat pengambilan eksplan. Ada beberapa metode sterilisasi yang pernah diaplikasikan pada tanaman gambir asal Sumatera Barat, diantaranya Resigia dan Herman (2017) yang menemukan bahwa penyemprotan fungisida dan bakterisida kemudian direndam bayclin 10 % dan dilanjutkan dengan perendaman dalam asam askorbat 0,02 % selama 5 menit, merupakan metode sterilisasi terbaik untuk anter gambir. Zainal (2023) mensterilisasi biji gambir sejak masih di dalam buah, dengan mencucinya di air mengalir, kemudian direndam di dalam larutan fungisida dan bakterisida, asam askorbat, dilanjutkan dengan mencelupkannya di dalam alkohol 70% dan melewatkannya di atas api Bunsen, sebelum biji dikeluarkan dari buahnya. Penelitian sterilisasi pada daun muda gambir telah dilakukan Rahmadhani (2023) menggunakan bahan sterilan NaOCl dengan konsentrasi 0,525% dan 0,7578% yang efektif dalam menghasilkan eksplan hidup sebanyak 73,33% dan 86,66%.

Metode sterilisasi dari penelitian yang dilakukan sebelumnya, belum secara optimal mendapatkan eksplan steril apalagi jika terdapat perbedaan jenis dan asal eksplan. Terbukti dengan masih tingginya tingkat kontaminasi yang ditemukan pada eksplan daun gambir asal Pakpak Bharat, sehingga sterilisasi eksplan daun muda ini masih memiliki ruang untuk peningkatan kualitasnya. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah eksperimen dengan bahan sterilan yang berbeda untuk meningkatkan hasil sterilisasi tersebut. Sehingga penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan teknik sterilisasi yang efektif untuk menghasilkan eksplan steril daun gambir, khususnya asal eksplan Pakpak Bharat.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Februari sampai Maret 2024 di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Pertanian dan Peternakan, Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau.

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini yaitu eksplan daun gambir yang berumur 6 bulan, media dasar MS, sukrosa, aquades, alkohol 70%, kertas steril, karet, spirtus, fungisida Dithane M-45, bakterisida Agrept 20 wp, bayclin, erythromycine, zoralin, sunlight, plastik dan kertas label.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang bertujuan untuk mendapatkan metode sterilisasi terbaik untuk eksplan daun tanaman gambir. Perlakuan waktu dan bahan yang berbeda digunakan untuk sterilisasi eksplan. Viabilitas eksplan diamati menggunakan rancangan acak lengkap dengan lima ulangan. Adapun faktor yang diuji adalah 4 metode sterilisasi yang terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Metode sterilisasi daun gambir

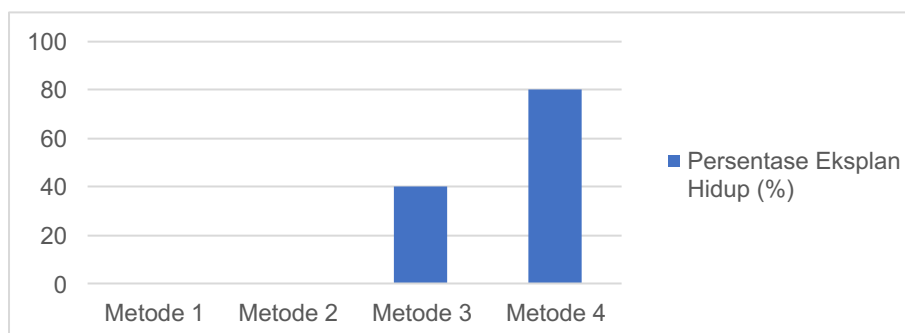
Metode	Langkah	Waktu Perlakuan	Tempat Perlakuan
Metode 1	Fungisida (2gr/l)	15 menit	Wastafel
	Aquades 3 X	1 menit	
	Alcohol	1 menit	
	Aquades 3X	1 menit	
	Bayclin 10 %	10 menit	
	Aquades 3X	1 menit	
Metode 2	Pencucian dengan air mengalir	10 menit	Wastafel
	Sunlight 10ml/l	10 menit	
	Aquades 3 X	3 menit	
	Fungisida 2 gr/l	20 menit	LAFC
	Bakterisida 2 gr/l		
	Erythromycin 4 gr/l		
Aquades 3X			
Alcohol 70 %			
Aquades 3X			
Bayclin 10%	10 menit		
Bayclin 20 %	10 menit		
Aquades 3X	3 menit		
Metode 3	Pencucian dengan air mengalir	60 menit	Wastafel
	Tween 80 3 tetes/l	20 menit	
	Aquades 3 X	12 menit	
	Fungisida 2 gr/l	30 menit	LAFC
	Bakterisida 2 gr/l		
	Erythromycin 4 gr/l		
Aquades 3X			
Alcohol 70 %			
Aquades 3X			
Bayclin 10%	10 menit		
Bayclin 20 %	10 menit		
Aquades 3X	1 menit		
Metode 4	Pencucian dengan sungliht lalu air mengalir	60 menit	Wastafel

Metode	Langkah	Waktu Perlakuan	Tempat Perlakuan
	Tween 80 3 tetes/l	20 menit	
	Aquades 3 X	4 menit	
	Fungisida 2 gr/l		
	Bakterisida 2 gr/l		
	Erythromycin 4 gr/l	30 menit	
	Zoralin 1 gr/l		
	Aquades 3X	2 menit	
	Alcohol 70 %	1 menit	L AFC
	Aquades 3X	3 menit	
	Bayclin 20%	10 menit	
	Bayclin 10 %	10 menit	
	Aquades 3X	3 menit	

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Eksplan Hidup

Pengamatan persentase eksplan hidup dengan metode sterilisasi yang berbeda dilakukan pada 15 HST. Eksplan yang hidup ditandai dengan eksplan yang berwarna hijau, dan tidak adanya kontaminasi, baik jamur maupun bakteri. Persentase eksplan hidup dapat dilihat pada Gambar 1.

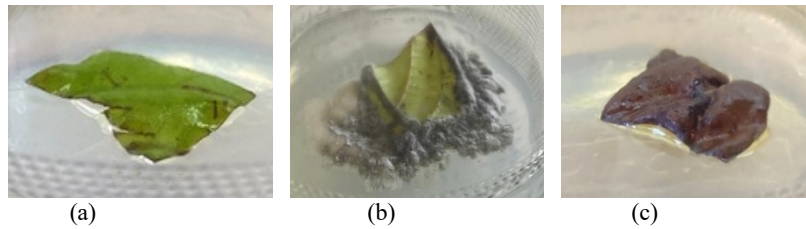


Gambar 1. Persentase Eksplan Hidup pada 15 HST

Gambar 1 menunjukkan bahwa persentase eksplan hidup tertinggi terdapat pada metode ke-4 (80%), yang diikuti dengan metode ke-3 (40%), sementara tidak ada eksplan yang berhasil tumbuh pada metode-1 dan metode-2. Hal ini membuktikan bahwa bahan sterilan yang digunakan sangat berpengaruh terhadap keberhasilan sterilisasi eksplan. Rananda and Khozin (2023) mengatakan bahwa perlakuan metode sterilisasi yang berbeda bertujuan untuk mengetahui pengaruh dan tingkat efektivitas metode dan bahan sterilisasi dalam membersihkan eksplan dari kontaminasi dan mencegah terjadinya pencoklatan eksplan, sehingga memberikan hasil dan kecenderungan yang berbeda terhadap angka kematian eksplan dan tingkat kelangsungan hidup eksplan pada setiap perlakuan sterilisasi.

Persentase eksplan hidup sampai 15 HST yang tinggi pada metode ke-4 menunjukkan bahwa konsentrasi dan waktu perendaman pada metode tersebut cukup efisien digunakan untuk menekan kontaminasi tanpa merusak jaringan eksplan daun gambir sehingga memperbesar persentase hidup eksplan. Sesuai dengan pernyataan Hesami et al. (2018) bahwa keberhasilan dalam kultur jaringan tanaman dan penerapan protokol regenerasi tanaman sangat bergantung pada efisiensi tahap sterilisasi. Sterilisasi eksplan yang digunakan pada metode ke-4 menggunakan kombinasi dari beberapa bahan sterilan. Sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya (Habibah et al., 2013; Hutabarat dkk, 2022; Anggoro et al., 2022), penggunaan sterilisasi kombinasi lebih

efektif dibandingkan sterilisasi tunggal dalam menekan persentase kontaminasi. Didukung oleh Bhadane and Patil (2016) yang menyatakan bahwa konsentrasi, kombinasi dan durasi paparan bahan steril yang sesuai sangat penting untuk keberhasilan kultur in vitro.



Gambar 2.(a) Eksplan yang Hidup; (b) Eksplan yang terkontaminasi; (c) Eksplan yang Browning

Eksplan hidup dapat dilihat dari morfologi yang berwarna hijau dan tidak terkontaminasi (Gambar 2.a.). Tetapi, eksplan steril, belum menunjukkan tanda-tanda kemunculan kalus hingga 15 HST. Hal ini diduga karena media yang digunakan merupakan media dasar yang tidak mengandung ZPT. Khoiriyah et al., (2023) menyatakan bahwa munculnya kalus merupakan reaksi penutupan jaringan akibat adanya luka pada jaringan, yang mana pembentukan kalus pada jaringan luka dipicu oleh adanya zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin endogen. Tetapi ZPT endogen yang ada di dalam eksplan daun diduga masih rendah, sehingga dibutuhkan penambahan ZPT eksogen agar kalus dapat tumbuh. Indah (2013) menyatakan bahwa eksplan yang tidak berkalus dikarenakan kandungan sitokinin dan auksin endogen pada eksplan rendah sehingga masih membutuhkan tambahan auksin dan sitokinin eksogen yang lebih banyak pada media kultur. Didukung oleh Lestari (2021), bahwa penambahan auksin dan sitokinin ke dalam media kultur jaringan dapat meningkatkan konsentrasi ZPT endogen di dalam sel sebagai pemicu pertumbuhan dan perkembangan pada jaringan.

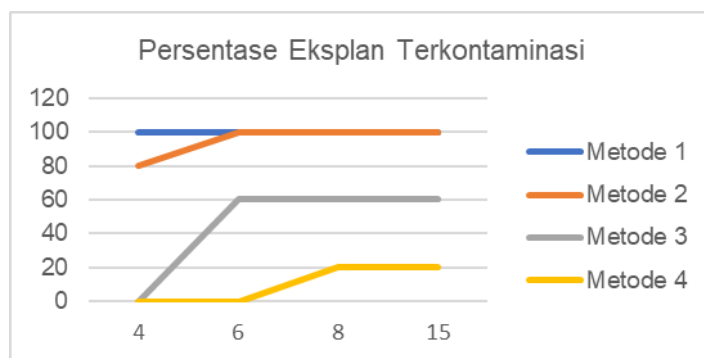
Dari semua unit percobaan, terdapat 1 eksplan yang mengalami browning, yaitu pada metode ke-3, di hari ke-8. Browning ditunjukkan dengan perubahan warna eksplan, dari kehijauan menjadi kecoklatan (Gambar 2.c). Hanya 1 eksplan yang mengalami browning ini berarti bahwa sterilisasi yang dilakukan tidak berpengaruh nyata terhadap terjadinya browning. Meskipun begitu, Wulandari (2014) menyatakan bahwa metode sterilisasi dapat meningkatkan terjadinya browning karena tingginya konsentrasi bahan steril dan lamanya waktu perendaman eksplan, sehingga dapat merusak permukaan eksplan terutama eksplan daun. Selain itu, Lestari (2018) menyatakan bahwa luka sayatan pada pemotongan eksplan, menjadi salah satu penyebab utama terjadinya pencoklatan, karena dapat merangsang stres dan menyebabkan peningkatan aktivitas PAL (phenylalanine amonialyase), yaitu enzim dalam fenilpropanoid yang menyebabkan pencoklatan yang diikuti produksi diikuti metabolisme fenol. Sadat et al., (2017) menambahkan bahwa sintesis senyawa fenolik yang menutupi permukaan eksplan berasal dari bagian tanaman yang mengalami luka yang apabila keadaan ini terus berlangsung maka senyawa yang terakumulasi pada media dapat menyebabkan penyerapan unsur-unsur hara oleh eksplan terganggu sehingga menghambat pertumbuhan eksplan.

Persentase Eksplan Terkontaminasi

Hasil pengamatan persentase eksplan terkontaminasi menunjukkan rerata waktu munculnya kontaminasi yang beragam. Kontaminasi mulai terjadi sejak 4 HST sampai dengan 8 HST. Pada

hari ke-9 sampai 15 hari pengamatan, tingkat kontaminasi mulai stabil, yang dibuktikan dengan tidak adanya penambahan jumlah eksplan yang terkontaminasi (Gambar 3).

Kontaminasi paling cepat terjadi pada metode ke-1, dengan tingkat kontaminasi 100%. Diketahui bahwa metode-1 merupakan metode yang paling sederhana dibanding metode lainnya. Penambahan Bayclin pada metode ini tidak dapat menghilangkan kontaminasi seluruhnya. Hal ini sesuai dengan penelitian Ardiansyah (2014) yang menemukan bahwa perendaman dengan NaOCl 10% selama 10 menit belum dapat menghilangkan agen kontaminan yang terdapat pada permukaan eksplan. Pada metode 1 dan 2 juga ditemukan bahwa kontaminasi mulai terjadi pada 4 hst, yang berarti bahwa pemberian Bayclin dapat memperlambat kontaminasi hingga hari ke-3. Sesuai dengan penelitian Widyastuti et al. (2021) bahwa paparan Bayclin dapat mengurangi kontaminasi hingga hari ke-3 setelah tanam.



Gambar 3. Persentase Eksplan Terkontaminasi (%)

Pengamatan makroskopis menunjukkan bahwa kontaminan tumbuh pada permukaan eksplan. Kontaminasi yang terdapat pada internal eksplan diduga terbawa dari lokasi tumbuh di lapangan. Resigia dan Herman (2017) menyatakan bahwa eksplan yang diambil dari lapangan biasanya lebih banyak mengandung mikroorganisme pengkontaminan. Pada penelitian ini, kontaminan didominasi oleh jamur (Gambar 2.b.), dimana jamur merupakan mikroorganisme yang sangat cepat pertumbuhannya dengan menggunakan spora. Spora juga dapat berkembang dengan cepat pada media kultur yang mengandung nutrisi yang cukup. Hal tersebut juga menjelaskan mengapa kontaminasi baru muncul selang beberapa hari setelah ditanam. Konsentrasi NaOCl pada Bayclin 10% yang diberikan kemungkinan tidak cukup kuat untuk membunuh spora yang tersembunyi. Penelitian yang dilakukan oleh Farooq et al., (2002) menjelaskan bahwa jika NaOCl diberikan pada konsentrasi dan lama waktu perendaman yang rendah maka tidak terlalu efektif untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada eksplan.

Uji Lanjut Persentase Kontaminasi

Persentase kontaminasi pada eksplan daun gambir dengan beberapa bahan sterilant masih cukup tinggi (Tabel 2). Persentase kontaminasi tertinggi terdapat pada metode 1. Penggunaan fungisida Dithane, alcohol dan Bayclin pada eksplan daun gambir, ternyata belum cukup kuat untuk mematikan sumber kontaminan. Hal ini bertolak belakang dengan penelitian Shofiyani et al., (2020) menggunakan larutan Dithane dengan konsentrasi 2 g/l dengan lama perendaman 12 jam dan 24 jam serta dikombinasikan dengan alcohol 70% selama 2 menit mampu menghilangkan kontaminan hingga tidak ada kontaminasi baik itu jamur maupun bakteri pada daun kencur. Perbedaan ini mungkin karena gambir merupakan tanaman tahunan yang lebih sulit untuk disterilisasi. Fauzan et

al., (2017) menyatakan bahwa sulit untuk mendapatkan bahan kultur yang benar-benar aseptik, terutama untuk jenis-jenis tanaman berkayu dan tahunan.

Tabel 2. Uji Lanjut Persentase Kontaminasi

Perlakuan	Waktu Pengamatan (hari)		
	4	6	8
 Persentase Kontaminasi (%)		
Metode 1	77,11 ^b	77,11 ^c	77,11 ^b
Metode 2	64,28 ^b	77,11 ^c	77,11 ^b
Metode 3	12,92 ^a	51,44 ^b	64,28 ^b
Metode 4	12,92 ^a	12,92 ^a	25,76 ^a

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$).

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara metode 1 dan 2 dengan metode 3 dan 4 pada hari ke-4. Penelitian sebelumnya yang dilakukan Asmono et al. (2021), kombinasi sterilan Dithane, Agrept, Erythromycin, Alkohol 70% serta NaOCl 10% dan 20% merupakan metode yang paling optimal untuk menekan kontaminasi dan browning pada eksplan daun kopi. Hasil tersebut berbeda dengan penelitian ini yang membutuhkan penambahan Tween 80 untuk menekan tingkat kontaminasi. Hal ini disebabkan penambahan Tween 80 pada metode 3 dan 4, mampu membuat perlakuan sterilisasi menjadi lebih efektif. Sesuai pernyataan Martiansyah et al., (2013), bahwa Tween berfungsi sebagai surfaktan yang menyebabkan terjadinya penurunan tegangan permukaan sel sehingga bahan-bahan steril menjadi aktif mematikan penyebab kontaminasi. Minipara et al., (2019) menambahkan bahwa perlakuan awal eksplan menggunakan tween menghasilkan kelangsungan hidup eksplan yang lebih tinggi karena tween merupakan rangkaian surfaktan non-ionik dan tween juga dapat membuat permukaan tanaman basah serta menolak udara sehingga membuat perlakuan menjadi efektif. Tween juga tidak beracun dan lembam karena merupakan ester.

Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara metode 3 dan 4 pada hari ke-4. Perbedaan yang signifikan mulai terjadi pada hari ke-6 dst. Diketahui bahwa perbedaan antara metode 3 dan 4 terdapat pada penambahan antijamur Zoralin, yang berbahan aktif Ketoconazole. Ketoconazole adalah agen antijamur sistemik yang mengganggu sintesis membran sel jamur serta aktivitas enzim tertentu (Shepp et al., 1985). Msogoya et al. (2012) menguji tiga agen antijamur, yaitu ketoconazole, fluconazole dan nistatin pada kultur jamur *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.* dan *Candida spp.* pada pisang, dan menemukan bahwa hanya ketokonazole yang dapat menghambat pertumbuhan semua kontaminan jamur yang teridentifikasi. Agen antijamur ini juga telah dilaporkan menekan perkembangan larva pada kultur kerang secara *in vitro* (Owen dkk., 2010). Selain itu, ketoconazole juga sering digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian antijamur (Oniha et al., 2021; Taufik & Darah, 2018; Methieu et al., 2014).

Dalam penelitian ini tidak ditemukan adanya kontaminasi oleh bakteri. Kemungkinan ini karena kombinasi sterilant yang diberikan mampu menghambat pertumbuhan bakteri seluruhnya. Kombinasi beberapa fungisida dan bakterisida yang berbeda dapat menghambat pertumbuhan jamur dan bakteri. Hal ini sesuai dengan penelitian Asmono (2022), bahwa penggunaan kombinasi dari detergen, fungisida Dithane, bakterisida Agrimycine, bakterisida Erythromycin, alkohol 70% serta NaOCl 10% dan 20% mampu menghilangkan bakteri pada permukaan eksplan. Hal ini terlihat dari ketidakhadirannya kontaminasi bakteri yang terjadi pada eksplan daun kopi.

KESIMPULAN

Metode 4, yaitu kombinasi sterilan Sunlight, Tween 80, Dithane, Agrept, Erythromycin, Zoralin, Alkohol 70% serta Bayclin 20% dan 10% merupakan metode yang terbaik untuk menurunkan tingkat kontaminasi pada eksplan daun tanaman gambir. Tidak ada pengaruh bahan sterilisasi yang berbeda terhadap tingkat pencokelatan eksplan daun tanaman gambir.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggoro, H. D., Restiani, R., & Aditiyarini, D. (2022). Optimasi Sterilisasi Eksplan Pada Kultur In Vitro Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*). *Biotika*, 19(2): 49–60. <https://doi.org/10.24198/biotika.v19i2.35596>
- Ardiansyah, R., Supriyanto, A.S. Wulandari, B. Subandy, Y. Fitriani. (2014). Teknik Sterilisasi Eksplan dan Induksi Tunas dalam Mikropropagasi Tembesu (*Fagraea fragrans* Roxb). *Jurnal Silvikultur Tropika*, 5(3) : 167-173. DOI <https://doi.org/10.29244/j-siltrop.5.3.%25p>
- Asmono, S.L., R. Wardana dan Rahmawati. (2021). Optimasi Metode Sterilisasi Eksplan Daun Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) dan Robusta (*Coffea canephora* var. Robusta chev.) secara In Vitro. *Jurnal Ilmiah Inovasi*, 21(3) : 140-145.
- Asmono, S.L., R. Wardana dan Rahmawati. (2022). Optimization of the sterilization method for leaf explant Robusta BP 308 coffee in vitro. 980:1-8. doi 10.1088/1755-1315/980/1/012001
- Bhadane, B.S. and R.H. Patil. (2016). Data on the cost effective surface sterilization method for *C. Carandas* (L.) seeds and callus induction from aseptic seedling. *Data Brief*, 7: 1551-1555. doi: 10.1016/j.dib.2016.04.047
- Dhalimi, A. (2016). Permasalahan Gambir (*Uncaria gambir* L.) di Sumatera Barat dan alternatif pemecahannya. *Perspektif*, 1:46-59.
- Farooq, S., T.T. Farooq and T.V. Rao. (2002). Micropropagation of *Annona squamosa* L. using Nodal Explants. *Pakistan Journal of Biological Science*, 5(1) : 43-46. DOI: 10.3923/pjbs.2002.43.46
- Fauza H. (2009). Identifikasi Karakteristik Gambir (*Uncaria* spp.) di Sumatera Barat dan Analisis RAPD. *Disertasi*. Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Fauza H, Syofyanti E, Ferita I. (2006). Pengaruh Jaringan yang Digunakan sebagai Bahan Setek terhadap Pertumbuhan Beberapa Tipe Tanaman Gambir. Fakultas Pertanian, Universitas Andalas Padang.
- Fauzan, Y.S.A., Supriyanto dan T. Tajuddin. (2017). Efektivitas Merkuri Klorida (HgCl₂) pada Sterilisasi Samping Jati (*Tectona grandis*) in Vitro. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 4(2) : 78-84. <https://ejournal.brin.go.id/JBBI/article/view/1889>
- Habibah, N.A., Sumadi & S. Ambar (2013). Optimasi Sterilisasi Permukaan Daun dan Eliminasi Endofit pada Burahol. *Biosaintifika*, 5(2): 94-99. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v5i2.2748>
- Hasan, Z. (2000). Pemupukan Tanaman Gambir. Prosiding Teknologi Pengolahan Gambir dan Nilam. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Bogor, Padang 24 – 25 Januari 2000.

- Hesami, M., R. Naderi, M. Yoosefzadeh-Najafabadi. (2018). Optimizing Sterilization Conditions and Growth Regulator Effects on In Vitro Shoot Regeneration Through Direct Organogenesis in *Chenopodium quinoa*. *Biotechnologia*, 99(1) : 49-57. Doi : 10.5114/bta.2018.73561
- Hutabarat, C.T., R. Restiani dan A. Prasetyaningsih. 2022. Pengaruh Sterilisasi Tunggal dan Kombinasi pada Kultur In Vitro Nodus Kepel (*Stelechorcrpus burahol Hook F. & Thomson*). *Metamorfosa*, 9(2) : 235-246. Doi : <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2022.v09.i02.p02>
- Hutami, S. 2008. Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 4(2) : 83-88
- Khoiriyah, S., D. Santosa & I. Purwantini. (2023). Efek Kombinasi 2,4D dan Kinetin pada Pembentukan Kalus Daun *Catharanthus roseus* (L.) G. Don serta Deteksi Alkaloidnya. *Majalah Farmaseutik*, 19(3): 2023 | DOI : 10.22146/farmaseutik.v19i3.8259
- 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.
- Mathieu, K.A., A.G. Marcel, D., Dje, O. Sitapha, C. Adama, D.A. Joseph. (2014). Anti-fungal Activities of Medicinal Plants Extract of *Ivorian pharmacopoeia*. *J. intercultr Ethnopharmacol* 3(4) : 159-166. doi: 10.5455/jice.20140627125512
- Minipara, D., H. Dhaduk, G. Patil, S. Narayanan, S. Kkumar. (2019). Identification of Best Surface Sterilization Treatment and Control of Endophytic Bacterial Contamination in *Annona squamosa* L. *International Journal of Plant & Soil Science*, 29(6) : 1-10. 10.9734/ijpss/2019/v29i630157
- Msogoya, T., H. Kanyagha, J. Mutigitu, M. Kulebelwa and D. Mamiro. (2012). Identification and management of microbial contaminants of banana in vitro cultures. *Journal of Applied Bioscience*, 55 : 3987-3994. <https://www.m.elewa.org/JABS/2012/55/5.pdf>
- Nainggolan, P. & D. Parhusip (2012). Tanaman Gambir Komoditas Spesifik Lokasi di Kabupaten Pakpak Bharat Sumatera Utara. Prosiding Seminar dan Kongres Nasional Sumber Daya Genetik. Medan, 12-14 Desember 2012
- Oniha, M., A. Ani, O. Akinnola, E.A. Omongigbehin, E. Frank, J.F. Olorunshola. (2021). In Vitro Antifungal Activity of Extract of *Moringa oleifera* on Phytopathogenic Fungi Affecting *Carica papaya*. *Journal of Medical Sciences*, 9(A):1081-1085. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.6794>
- Owen, C.T., J.E. Alexander & M. McGregor (2010). Control of microbial contamination during in vitro culture of larval unionid mussels. *Invertebrate Reproduction & Development*, 54(4), 187–193. <https://doi.org/10.1080/07924259.2010.9652332>
- Pancaningtyas, S. & R. Nafi'ah (2020). Identifikasi Jamur Kontaminan pada Tahap Inisiasi Eksplan Kultur In Vitro Kakao (*Theobroma cacao* L.) *Warta, Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*, 32(2):6-13
- Rahmadhani, A. (2023). Optimalisasi Konsentrasi NaOCl pada Metode Sterilisasi Eksplan Daun Tanaman Gambir (*Uncaria gambir* Roxb.) Secara In Vitro. *Skripsi*. Padang. Fakultas Pertanian. Universitas Andalas. 49

- Rananda, A.I., & Khozin, M.N. (2023). The Effect of Different Sterilization Methods on Obtaining Sterile Leaf Explants of Porang (*Amorphophallus muelleri* B.). *Journal of Soilscape and Agriculture*, 2 (1): 1-11.
- Resigia, E. & W. Herman. (2017). Pengaruh Jenis dan Lama Perendaman Bahan Sterilan terhadap Eksplan Anter Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) *Jurnal Bibiet*, 2(2) : 44-48
- Sadat, M.S., L.A.M. Siregar & H. Setiado (2018). Pengaruh IAA dan BAP terhadap Induksi Tunas Mikro dari Eksplan Bonggol Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L.). *Jurnal Agroteknologi FP USU*, 6(1) : 107-112
- Sebayang, L. (2013). *Budidaya dan Pengelolaan Gambir*. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sumatera Utara. Medan.
- Shofiyani, A., A.M. Purnawanto, R. Zahara & A. Aziz. (2019). Pengaruh Berbagai Sterilan dan Waktu Perendaman Terhadap Keberhasilan Sterilisasi Eksplan Daun Kencur (*Kaempferia galanga* L.) Pada Teknik Kultur In Vitro. Seminar Nasional ‘Pengembangan Sumberdaya menuju Masyarakat Madani Berkearifan Lokal’, Universitas Mmuhammadiyah Ppurwokerto.
- Shepp, D. H., Klosterman, A., Siegel, M., & Meyers, J. D. (1985). Comparative Trial of Ketoconazole and Nystatin for Prevention of Fungal Infection in Neutropenic Patients Treated in a Protective Environment. *Journal of Infectious Diseases*, 152(6): 1257-1263.
- Taufik M.M.J and I. Darah. (2018). Fungal Endophytes Isolated from the Leaves of a Medicinal Plant, *Ocimum sanctum* Linn and Evaluation of Their Antimicrobial Activities. *African Journal of Microbiology Research*, 12(26) : 612-622. DOI: 10.5897/AJMR2018.8812
- Widyastuti, N. dan J., Deviyanti. (2018). *Kultur Jaringan Teori dan Praktik Perbanyak Tanaman Secara In-Vitro*. Yogyakarta: ANDI Yogyakarta. 328 halaman.
- Widyastuti A., Putrika A., Dwiranti A., Salamah A., Hemelda N. M., & Handayani W. (2021). The Development of In Vitro Culture Sterilization Method of Gametophyte Explant *Lopholejeunea* sp. *HAYATI Journal of Biosciences*, 28(2): 110. <https://doi.org/10.4308/hjb.28.2.110>
- Wulandari, A. S., dan Sabar, S. N. (2014). Pengaruh Bahan Sterilan terhadap Keberhasilan Inisiasi Eksplan *Paulownia* (*Paulownia elongate* SY Hu) secara in vitro. *Jurnal Silvikultur Tropika*, 5(1): 1 – 6
- Xu, J. J., Beleski, D. G., & Vendrame, W. A. (2022). Effects of culture methods and plant growth regulators on in vitro propagation of *Brassavola nodosa* (L.) Lindl. hybrid. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 58(6): 931–941. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10276-7>
- Zainal, A., Anwar, A., Gustian, Fitriawati, & Yunita, R. (2023). The Effects of Several Concentrations of BAP and Source of Explants to Gambier Shoot Induction (*Uncaria gambier* (Hunter) Roxb). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1160. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1160/1/012021>
- Zaman, M. A. K., Azzeme, A. M., Ramle, I. K., Normanshah, N., Shaharuddin, N. A., Ahmad, S., & Abdullah, S. N. A. (2021). Prolonged Incubation of Callus on Auxin Herbicide 2,4-D Displayed Significant Effect on Alkaloid Production in Callus of The Woody

Medicinal Plant *Polyalthia bullata*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology -Plant*,
57(5): 749–759. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10194-0>