



EFEKTIVITAS MERKURI KLORIDA (HgCl₂) PADA STERILISASI TUNAS SAMPING JATI (*Tectona grandis*) *IN VITRO*

Effectiveness of Mercury Chloride (HgCl₂) in Sterilization of Teak (*Tectona grandis* L.f.) *In Vitro*

Yusuf Sigit Ahmad Fauzan^{1,3*}, Supriyanto², Teuku Tajuddin³

¹Program Studi Silvikultur Tropika, Sekolah Pascasarjana, IPB, Jl. Raya Dramaga, Bogor, Jawa Barat, 16680

²Departemen Silvikultur, Fakultas Kehutanan, IPB, Jl. Lingkar Kampus Dramaga, Bogor, Jawa Barat, 16680

³Balai Bioteknologi, BPPT, Gedung 630 Kawasan PUSPIITEK, Tangerang Selatan, Banten 15314

*E-mail: yusuf.sigit@bppt.go.id

ABSTRACT

The main obstacle in obtaining sterile materials in *in vitro* cultures derived from meristems is high level of surface contamination caused by fungi and bacteria, which often results in explant death. The objective of this study was to obtain an appropriate mercury chloride (HgCl₂) concentration for the sterilization of *Tectona grandis* nodes in *in vitro* culture. One cm long-sized nodes with 0.2 mm diameter were immersed in HgCl₂ at concentrations of 0, 100, 200 and 300 mg/L for 3 minutes. The results showed that the higher concentration of HgCl₂ was able to suppress the growth of fungi and bacteria and increased the percentage of aseptic explants. The best HgCl₂ concentration was 300 mg/L since it suppressed the growth of fungi and bacteria up to 100% and 75%, respectively, and produced the highest aseptic explants of 85% at 9 days after treatment. The small sized explants supported the sterilization process and reduced browning levels.

Keywords: *Browning, HgCl₂, in vitro, sterilization, T. grandis*

ABSTRAK

Kendala utama dalam mendapatkan material steril pada kultur *in vitro* yang berasal dari meristem adalah tingginya tingkat kontaminasi permukaan yang disebabkan oleh jamur dan bakteri, dan sering menyebabkan kematian eksplan. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh konsentrasi merkuri klorida (HgCl₂) yang tepat untuk sterilisasi eksplan tunas samping tanaman jati (*Tectona grandis*) pada kultur *in vitro*. Tunas samping berukuran 1 cm dan diameter 0,2 mm direndam dalam HgCl₂ pada konsentrasi 0, 100, 200 dan 300 mg/L selama 3 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi HgCl₂ yang semakin tinggi mampu menekan pertumbuhan jamur dan bakteri pada eksplan serta meningkatkan persentase eksplan aseptik. HgCl₂ dengan konsentrasi 300 mg/L merupakan konsentrasi terbaik karena dapat menekan pertumbuhan jamur hingga 100% dan bakteri mencapai 75%, serta menghasilkan tingkat eksplan aseptik dan hidup tertinggi yaitu sebesar 85% pada 9 hari setelah perlakuan. Ukuran eksplan yang kecil mendukung proses sterilisasi dan mengurangi tingkat *browning*.

Kata kunci: HgCl₂, *in vitro*, pencoklatan jaringan, sterilisasi, *T. grandis*,

PENDAHULUAN

Jati (*Tectona grandis* L.f.) merupakan tanaman berkayu dari famili *Verbenaceae* yang sangat populer di bidang kehutanan khususnya di Indonesia. Masyarakat pulau Jawa diperkirakan telah mengenal jati sejak zaman Hindu pada abad ke-500 Masehi, kemudian mulai ditanam oleh masyarakat Indonesia secara luas pada tahun 1800-an.

Jati secara umum banyak dibudidayakan di Pulau Jawa, Muna, Kangean, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, Sumatera Selatan, Kalimantan Selatan, Bali dan Nusa Tenggara (Martawijaya et al. 2005). Kayu jati memiliki nilai ekonomi tinggi dan termasuk dalam kelas mutu kuat 1-2 dan kelas awet 1, sehingga sangat cocok digunakan sebagai bahan baku industri (Perhutani 2011). Sebagai bahan baku industri, kayu jati memiliki pangsa pasar yang luas, baik dalam maupun luar negeri (Adinugraha dan Mahfudz 2014). Novianti (2013) menyatakan bahwa pada tahun 2014 pemakaian jati masih mendominasi masyarakat industri dalam negeri sebesar 51.89% atau setara dengan 497.845 m³. Disamping itu kebutuhan industri luar negeri (ekspor) mencapai 123.440 m³. Sementara pada tahun 2014, produksi kayu jati Perhutani hanya mencapai 455.995 m³ (Perhutani 2015). Dengan kata lain, kebutuhan dalam negeri masih terjadi kekurangan suplai kayu jati sebesar 165.290 m³ dan kebutuhan dunia sebesar 95.000 m³. Kekurangan tersebut diduga disebabkan oleh rendahnya mutu genetik bibit jati yang digunakan serta penurunan kualitas tapak dari waktu ke waktu sehingga mengakibatkan rendahnya kualitas, kuantitas serta kontinuitas hasil kayu jati yang dihasilkan.

Salah satu metode perbaikan mutu genetik dan perbanyak tanaman jati dapat dilakukan melalui pendekatan kultur *in vitro*. Pada perbanyakan *in vitro*, kultur tanaman jati harus dilakukan secara aseptis menggunakan eksplan yang ditumbuhkan pada media dan lingkungan terkendali. Bahan kultur *in vitro* harus menggunakan eksplan aseptik terutama eksplan yang diperoleh dari lapang. Tunas samping merupakan eksplan terbaik sebagai bahan perbanyakan vegetatif *in vitro* karena

jaringan tersebut lebih mudah diinisiasi dan beregenerasi membentuk tanaman utuh dibandingkan dengan organ lain (Gunawan 1992).

Kendala utama penggunaan material aseptik yang berasal dari tunas samping adalah tingginya tingkat kontaminasi permukaan berupa debu, kotoran, spora jamur, bakteri, serangga dan telurnya. Menurut Gunawan (1992) salah satu cara untuk menghilangkan kontaminasi permukaan dapat dilakukan dengan penggunaan kombinasi bahan-bahan sterilan, diantaranya fungisida ditambahkan merkuri klorida (HgCl₂) 0,1 – 0,2% dengan lama perendaman 10 – 20 menit dan dibilas dengan aquades steril. Merkuri klorida merupakan disinfektan yang sangat efektif untuk membunuh jamur dan bakteri pada sterilisasi permukaan.

Kontaminan pada kultur *in vitro* umumnya disebabkan oleh mikroba. Kontaminan ini jika tidak dihilangkan maka akan hidup dan berkembang di dalam kultur sehingga dapat menghambat, bahkan menyebabkan kematian eksplan (Tajuddin et al. 2014). Mikroba penyebab kematian kultur *in vitro* adalah sebagian besar berupa jamur dan bakteri. Mikroba dapat hadir di dalam eksplan (endofitik) atau dapat muncul kembali dari penanganan proses sterilisasi yang buruk, yang disebabkan kondisi tidak higienis di dalam laboratorium atau dari peralatan laboratorium yang digunakan, termasuk laboran (Daud et al. 2012). Mikroba bersaing dengan kultur atau tanaman untuk mendapatkan nutrisi. Kehadiran mikroba pada kultur *in vitro* mengakibatkan meningkatnya angka kematian, penurunan pertumbuhan, nekrosis jaringan dan berkurangnya proliferasi tunas (Oyebanji et al. 2009).

Kunci utama sterilisasi adalah membunuh atau menghilangkan penyebab kontaminasi tetapi tidak merusak atau mematikan jaringan tanaman yang diinisiasi. Kunci tersebut seringkali menjadi kendala tersendiri untuk mendapatkan bahan kultur yang benar-benar aseptik, terutama untuk jenis-jenis tanaman berkayu dan tahunan. Sterilisasi tanaman berkayu umumnya memiliki kendala yang lebih besar atau lebih sulit daripada tanaman semusim (Antony et al. 2015). Tanaman jati memiliki karakter morfologi permukaan berbulu dan senyawa

fenol yang sangat banyak. Sehingga perlu digunakan agen sterilan kuat sebagai bahan sterilisasi yang mampu membunuh mikroba tapi tidak mematikan eksplan, salah satunya adalah merkuri klorida (HgCl₂).

Pada bidang pertanian khususnya kultur jaringan, merkuri klorida sering dijadikan sebagai agen sterilan (Gunawan 1992). Beberapa penelitian yang menggunakan merkuri klorida pada proses sterilisasi eksplan tunas samping antara lain adalah penelitian yang dilakukan Anthony et al. (2015). Mereka menggunakan HgCl₂ pada konsentrasi 0,15% selama 15 menit pada eksplan jati, tetapi menunjukkan tingkat keberhasilan kultur yang rendah (41,68%). Penggunaan HgCl₂ pada konsentrasi tinggi (0,15%) tidak saja berpengaruh terhadap kontaminasi dan *browning* (pencoklatan jaringan) tetapi juga dapat menyebabkan penurunan pertumbuhan dan perkembangan kultur. Sebaliknya penggunaan pada konsentrasi dan waktu yang lebih rendah, yaitu 0,10% dalam waktu 5 menit dapat menurunkan rata-rata kontaminasi, tingkat *browning* dan kematian eksplan. Zamir et al. (2004) melakukan sterilisasi tunas samping tanaman jambu (*Psidium guajava* L.) menggunakan HgCl₂ pada konsentrasi 0,05% selama 10 menit dan menghasilkan penurunan persentase hidup eksplan lebih tinggi dibanding dengan penggunaan waktu yang lebih singkat (5 menit). Begitu pula dengan penelitian yang dilakukan oleh Hidayat (2008) pada eksplan biji tanaman surian (*Toona sinensis* Roem) dengan konsentrasi 0,05% selama 10 menit menghasilkan tingkat kontaminasi yang rendah, yaitu sebesar 6,7%. Penelitian pada tunas samping jati ini bertujuan untuk melakukan optimasi dan mendapatkan konsentrasi HgCl₂ yang tepat guna meningkatkan keberhasilan sterilisasi eksplan.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Mikropropagasi Tanaman, Balai Bioteknologi-BPPT Gedung 630 Kawasan Puspiptek, Kota Tangerang Selatan, Provinsi Banten dari bulan Juli sampai dengan Agustus 2016.

Sumber eksplan

Sumber eksplan berasal dari klon induk tanaman jati aksesori Muna yang berumur 2 tahun yang berasal dari kebun koleksi Balai Bioteknologi-BPPT. Eksplan yang diambil berupa tunas samping jati yang kemudian dilakukan sterilisasi dan penanaman ke dalam tabung kultur yang telah berisi media inisiasi. Tunas samping yang digunakan terdiri atas 1 buku dengan ukuran panjang 1 cm.

Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan pada percobaan ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor (Mattjik dan Sumertajaya 2013), yaitu konsentrasi HgCl₂. Beberapa konsentrasi HgCl₂ yang diaplikasikan adalah: 0; 100; 200 dan 300 mg/L. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali, satu ulangan terdiri dari 20 eksplan. Sterilisasi dilakukan dengan merendam seluruh tunas samping di dalam larutan HgCl₂ selama 3 menit.

Pengamatan dan analisis data

Pengambilan data dilakukan setiap 3 hari sekali selama 9 hari. Data yang diamati adalah jumlah eksplan yang terkontaminasi jamur, bakteri dan yang steril. Data hasil pengamatan pada setiap peubah diuji statistik menggunakan analisis keragaman (ANOVA). Perbedaan antar perlakuan ditentukan dengan uji jarak berganda Duncan (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf uji $\alpha = 0,05$. Analisis statistik untuk data pengamatan dilakukan menggunakan program SAS versi 9.3.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sterilisasi merupakan langkah awal dalam melakukan perbanyakan tanaman secara *in vitro*. Salah satu tahapan penting dalam proses sterilisasi adalah melakukan optimasi metode sterilisasi dengan cara menggunakan bahan sterilan yang mampu menghilangkan sumber kontaminasi permukaan berupa jamur dan bakteri, tetapi tidak merusak atau membunuh sel dan jaringan tanaman yang akan dikulturkan.

Analisis ragam terhadap parameter persentase eksplan yang terkontaminasi oleh jamur, bakteri, dan yang steril pada percobaan ini 9 HST (hari setelah tanam)

dapat dilihat pada Tabel 1. Uji Duncan terhadap pengaruh beberapa konsentrasi $HgCl_2$ pada jumlah eksplan yang terkontaminasi oleh jamur dan bakteri, maupun eksplan aseptik pada sterilisasi jati dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari Tabel 2 tampak bahwa seluruh perlakuan $HgCl_2$ memberikan pengaruh yang berbeda-beda terhadap persentase kontaminasi oleh jamur dan bakteri, serta kultur aseptik pada 9 HST. Persentase kontaminasi oleh jamur (Gambar 1A) dan bakteri (Gambar 1B) tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol dengan nilai rerata masing-masing sebesar 18,33% dan 75%. Sedangkan persentase terendah diperoleh pada perlakuan $HgCl_2$ 300 mg/L dengan nilai rerata masing-masing adalah 0% dan 15%. Persentase kultur aseptik (Gambar 1C) yang tertinggi terdapat pada perlakuan $HgCl_2$ 300 mg/L dengan nilai rata-rata sebesar 85%, sedangkan persentase kultur aseptik terendah terdapat pada kontrol (0 mg/L) yaitu 6,67%.

Dari hasil pengujian bahan sterilan diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi $HgCl_2$ yang ditambahkan pada media, maka tingkat kultur aseptik yang diperoleh semakin

Tabel 1. Rekapitulasi analisis ragam pengaruh $HgCl_2$ terhadap sterilisasi eksplan *T. grandis*

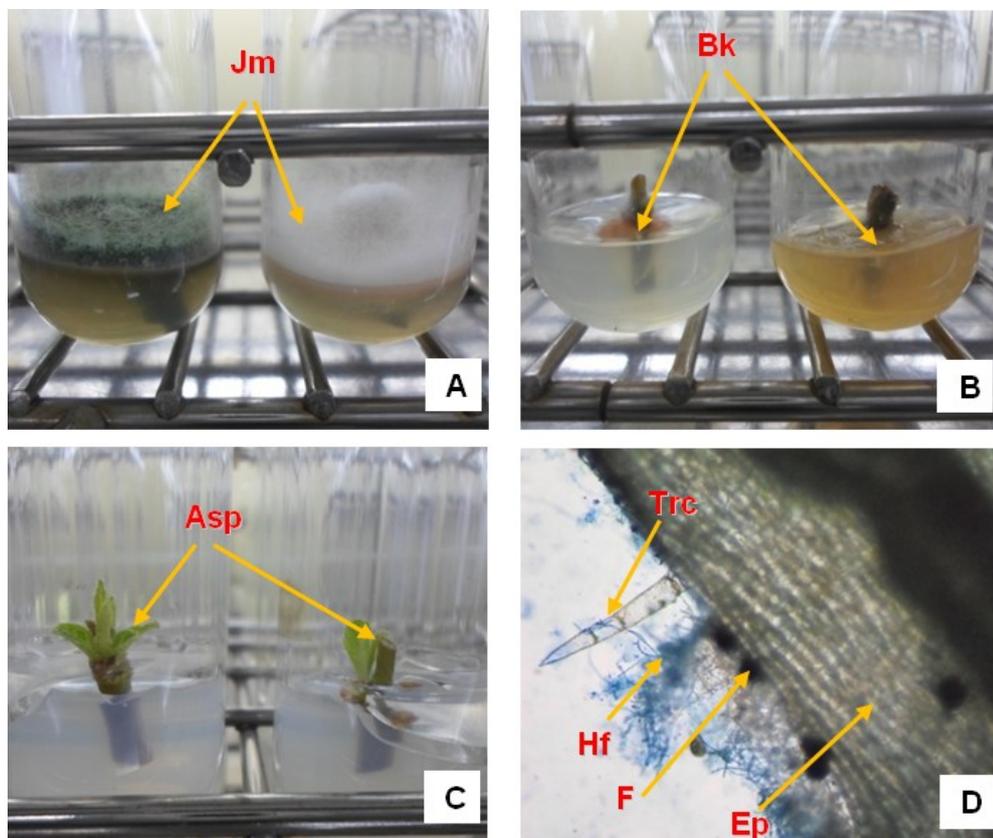
No	Parameter	$HgCl_2$
1	Jamur	**
2	Bakteri	**
3	Steril	**

Keterangan: tn = tidak nyata; * = nyata; ** = sangat nyata

Tabel 2. Hasil uji Duncan respon kultur berjamur, berbakteri dan kultur steril *T. grandis* pada penggunaan berbagai konsentrasi $HgCl_2$

No	Perlakuan $HgCl_2$ (mg/L)	% Eksplan berjamur	% Eksplan berbakteri	% Kultur aseptik
1	0	18,33 ^a	75,00 ^a	6,67 ^c
2	100	13,33 ^a	30,00 ^b	53,33 ^b
3	200	1,67 ^b	26,67 ^{bc}	71,67 ^a
4	300	0,00 ^b	15,00 ^c	85,00 ^a

Keterangan: Angka pada kolom yang sama diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji-F pada selang kepercayaan 95%.



Gambar 1. Kontaminasi jamur (A); bakteri (B); eksplan aseptik (C); dan anatomi jaringan yang terkontaminasi jamur (D). Jm: jamur, Bk: bakteri, Asp: Aseptik, Trc: Trichoma, Hf: Hifa cendawan, F: Fenol, Ep: Epidermis

meningkat, serta penurunan persentase kontaminasi oleh jamur dan bakteri. Pada perlakuan HgCl₂ konsentrasi 200 dan 300 mg/L, hasil yang diperoleh tidak berbeda nyata untuk setiap parameter yang diujikan, namun hasil rata-rata menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi 300 mg/L menghasilkan pertumbuhan jamur dan bakteri terendah dan tingkat aseptik tertinggi dibanding perlakuan lainnya. Penggunaan konsentrasi HgCl₂ 300 mg/L mampu menghambat atau membunuh pertumbuhan jamur dan bakteri pada 9 HST dan menghasilkan kultur hidup dan tumbuh terbaik dibanding dengan konsentrasi 200, 100 dan 0 mg/L.

Penggunaan sterilan dengan konsentrasi yang berbeda menghasilkan respon yang berbeda terhadap setiap jenis tanaman dan eksplan. Penelitian yang dilakukan Antony et al. (2015) mengkombinasikan perlakuan merkuri klorida 0,1% selama 5 menit dengan media yang mengandung arang aktif 0,5 g/L pada penanaman tunas jati dan menghasilkan tingkat kontaminasi dan *browning* terendah, yaitu sebesar 5,5%. Pemberian arang aktif pada penelitian tersebut diduga mampu menyerap senyawa fenol sehingga eksplan mampu tumbuh dengan baik. Antony et al. (2015) menggunakan eksplan tunas samping berukuran besar (diameter > 0,7 cm), yang menghasilkan senyawa fenol yang tinggi sehingga perlu ditambah arang aktif dalam media inisiasi untuk mengurangi tingkat *browning*. Lebih lanjut Antony et al. (2015) menyatakan bahwa penggunaan arang aktif memberikan dampak positif karena berkaitan dengan kapasitasnya untuk menyerap zat racun seperti fenolik dan senyawa perusak lain yang terbebaskan selama kultur (Gambar 1D).

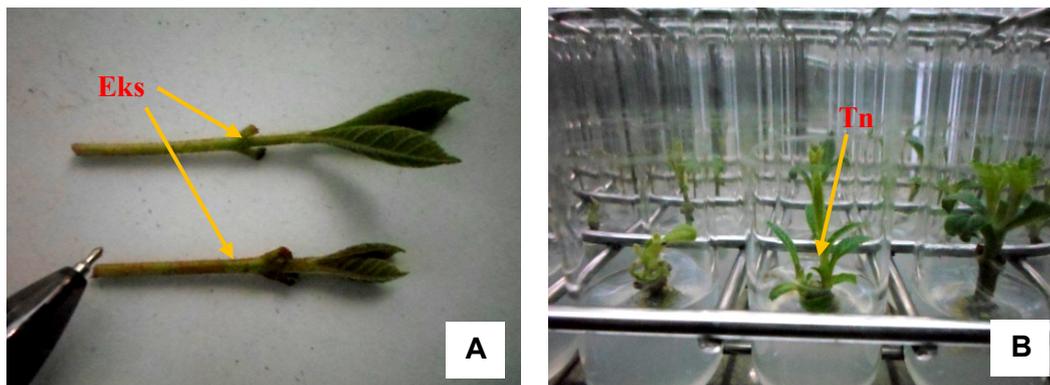
Sterilisasi dengan HgCl₂ digunakan pada konsentrasi dan lama penggunaan yang berbeda-beda, tergantung dari jenis eksplan dan tanaman yang akan disterilisasi. Pada penelitian yang dilakukan oleh Baghel et al. (2008), eksplan kotiledon disterilisasi menggunakan HgCl₂ dengan konsentrasi 0,1% selama 3 menit. Phulwaria et al. (2011) melakukan sterilisasi pada tanaman *Salvadora persica* dengan HgCl₂ pada konsentrasi 0,1% selama 5 – 7 menit. Daud et al. (2012) menggunakan waktu yang lebih singkat, yaitu 15 – 30 detik dengan

konsentrasi HgCl₂ 0,1%, dan menghasilkan tingkat eksplan daun dan ruas batang *Aquilaria malaccensis* aseptik sebesar 83 – 90%. Sedangkan Mekonnen et al. (2013) menggunakan konsentrasi 0,1% dengan waktu 10 menit pada tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) dan menghasilkan tingkat hidup sebesar 73,33%. Dalam penelitiannya, Garg et al. (2014) melakukan kombinasi HgCl₂ 0,1% selama 10 menit dengan carbendazin 0,2% selama 1 jam untuk sterilisasi eksplan tunas jarak pagar (*Jatropha curcas*) pada musim penghujan.

Penggunaan HgCl₂ 300 mg/L dalam waktu 3 menit pada sterilisasi eksplan *T. grandis* mampu menghasilkan tingkat aseptik yang terbaik. Hal ini diduga berhubungan erat dengan sifat dan jenis eksplan yang digunakan serta kondisi cuaca. Permukaan eksplan *T. grandis* memiliki bulu-bulu halus (*trichoma*) yang banyak dan memiliki senyawa fenol yang tinggi (Gambar 1D) sehingga penggunaan konsentrasi HgCl₂ yang tinggi lebih optimal dibandingkan dengan konsentrasi yang rendah. Selain itu, penelitian ini menggunakan eksplan berukuran kecil, yaitu panjang 1 cm dan diameter 0,2 mm (Gambar 2) dan dilakukan pada musim kemarau sehingga memudahkan dalam proses sterilisasi dan dapat mengurangi tingkat *browning*. Hasil ini diperkuat oleh hasil penelitian Singh dan Patel (2016) pada tanaman delima (*Punica granatum* L.) dimana umur tunas dan ukuran eksplan juga berpengaruh terhadap tingkat *browning*. Hasil penelitian tersebut diperoleh bahwa semakin tua dan panjang ukuran eksplan (> 1,5 cm) yang digunakan maka peningkatan kasus *browning* akan semakin tinggi, sehingga terdapat hubungan intensitas *browning* yang dihasilkan terhadap umur dan ukuran tunas yang ditanam. Hal tersebut juga didukung oleh pernyataan Ozyigit (2008) bahwa terdapat hubungan yang positif antara umur eksplan dan eksudasi senyawa fenol yang dihasilkan pada kultur jaringan.

HgCl₂ merupakan bahan sterilan yang memiliki sifat sangat kuat untuk membunuh jamur dan bakteri pada konsentrasi rendah. Menurut Gunawan (1992) konsentrasi HgCl₂ optimum yang biasa digunakan untuk sterilisasi permukaan adalah 0,1 – 0,2% selama 10 – 20 menit.

Pada sterilisasi eksplan tersebut diduga Hg merupakan unsur utama yang



Gambar 2. Eksplan berukuran panjang 1 cm dan diameter 3 mm sebagai material sterilisasi (A), Kultur aseptik bebas *browning* yang tumbuh baik pada > 12 HST (B). Eks: eksplan, Tn: tunas.

berpengaruh pada toksisitas atau kematian jamur dan bakteri (Alfian 2006). HgCl_2 merupakan garam merkuri yang berasal dari reaksi $\text{Hg}^{2+} + 2\text{Cl}^-$ berupa padatan atau kristal yang bereaksi secara ionik (H^+ dihidrasi dalam air) menghasilkan HgCl_2 . Menurut Alfian (2006) garam merkuri atau HgCl_2 bersifat sangat larut dalam air sehingga sangat cepat dan mudah diabsorpsi serta memiliki daya toksisitas yang sangat tinggi. Fokus aktivitas ion Hg^{2+} adalah pada membran sel yang biasanya melibatkan ion Na^+ dan K^+ ATP-ase sehingga menyebabkan terjadinya gangguan pertukaran ion intraseluler dan ekstraseluler pada sel, dalam hal ini intraseluler pada jamur dan bakteri. Lebih lanjut Alfian (2006) menjelaskan bahwa ion merkuri (Hg^{2+}) menyebabkan pengaruh toksik karena terjadinya proses presipitasi protein yang dapat menghambat aktivitas enzim dan bertindak sebagai bahan yang bersifat sangat korosif. Penggunaan HgCl_2 dalam konsentrasi tinggi juga berpengaruh terhadap kerusakan jaringan tanaman. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Tiwari et al. (2012) untuk sterilisasi eksplan tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) pada konsentrasi HgCl_2 0,2% selama 12 menit menyebabkan eksplan mengalami *browning* dan mati pada hari ke 4 sampai 7 setelah tanam.

KESIMPULAN

Sterilisasi yang dilakukan dengan merkuri klorida telah menghasilkan kultur aseptik yang tumbuh baik hingga 9 HST. Perlakuan HgCl_2 300 mg/L merupakan konsentrasi terbaik untuk sterilisasi kultur tunas samping jati yang dapat menghasilkan kultur dengan tingkat aseptik tertinggi yaitu

sebanyak 85%. Ukuran eksplan yang kecil, yaitu panjang 1 cm dan diameter 0,2 mm, mendukung proses sterilisasi dan mengurangi tingkat *browning* pada kultur *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinugraha HA, Mahfudz (2014) Pengembangan teknik perbanyakan vegetatif tanaman jati pada hutan rakyat. J Wasian 1:39-44
- Alfian Z (2006) Merkuri: Antara manfaat dan efek penggunaannya bagi kesehatan manusia dan lingkungan. Pidato pengukuhan jabatan guru besar tetap dalam bidang ilmu kimia analitik. USU e-Repository@2008. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara, Medan
- Antony T, Anees PVM, Kumar V, Sangamithra D, Philip T, Santhoshkumar AV (2015) Application of mercuric chloride and charcoal in micro-propagation of teak (*Tectona grandis*). Indian J Trop Biodiv 23:157-166
- Baghel RS, Tiwari S, Tripathi MK (2008) Comparison of morphogenic and plant regeneration ability of some explants of teak (*Tectona grandis* Linn. F). J Agric Technol V.4:125-136
- Daud NH, Jayaraman S dan 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 20:55-58
- Garg RK, Srivastava V, Kaur K, Gosal SS (2014) Effect of sterilization treatments on culture establishment in *Jatropha*

- curcas L. Karnataka J Agric Sci 27:190-192
- Gunawan LW (1992) Teknik Kultur Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Hidayat Y (2008) Keefektifan bahan sterilisasi dalam pengendalian kontaminasi pada pertumbuhan kultur zygotik surian (*Toona sinensis* Roem). Wana Mukti Forest Res J 6:35-44
- Martawijaya A, Kartasujana I, Kadir K, Prawira SA (2005) Atlas Kayu Indonesia. Jilid I. Puslitbang Hasil Hutan. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Bogor
- Mattjik AA, Sumertajaya IM (2013) Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab. ISBN: 9789794933992. IPB Press, Bogor
- Mekonnen T, Diro M, Sharma M (2013) An alternative safer and cost effective surface sterilization method for sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) explants. Afr J Biol 1:28-32
- Novianti R (2013) Kayu Jati: Perhutani targetkan produksi 454.778 m³. <http://industri.bisnis.com/read/20130312/99/3136/kayu-jati-perhutani-targetkan-produksi-454778-m3>. [diunduh 2016 Mei 2016]
- Oyebanji OB, Nweke O, Odebunmi O, Galadima NB, Idris MS, Nnodi UN, Afolabi AS, Ogbadu GH (2009) Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. Afr J Biotechnol 8:5395-5399
- Ozyigit II (2008). Phenolic changes during *in vitro* organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. Afr J Biotechnol. 7:1145-1150. doi: 10.5897/AJB07.396
- Perhutani (2011) Harga Jual Dasar (HJD) Tahun 2012. Keputusan Direksi Perum Perhutani Nomor: 1148/Kpts/Dir/2011, tanggal 30 Desember 2011. Perum Perhutani Unit II Jawa Timur
- Perhutani (2015) Statistik Perum Perhutani Tahun 2010-2014. Perum Perhutani Kantor Pusat, Jakarta
- Phulwaria M, Ram K, Gahlot P, Shekhawat NS (2011) Micropropagation of *Salvadora persica* - A tree of arid horticulture and forestry. New Forests 42:317-327. doi: 10.1007/s11056-011-9254-z
- Singh P, Patel RM (2016) Factors affecting *in vitro* degree of browning and culture establishment of pomegranate. Afr J Plant Sci 10:43-49. doi: 10.5897/AJPS2013.1119
- Tajuddin T, Karyanti, Sukarnih T, Haska N (2014) A revised method for sucker sterilization to support the *in vitro* propagation of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.). J Bioteknologi Biosains Indones 1:21-26. doi: 10.29122/jbbi.v1i1.548
- Tiwari AK, Tripathi S, Lal M, Mishra S (2012) Screening of some chemical disinfectants for media sterilization during *in vitro* micropropagation of sugarcane. Sugar Tech 14:364-369. doi: 10.1007/s12355-012-0178-5.
- Zamir R, Shah ST, Ali N, Khattak GSS, Muhammad T (2004) Studies on *in vitro* surface sterilization and antioxidants on guava shoot tips and nodal explants. Pak J Biotechnol 1:12-16