

Pengaruh Teknik Sterilisasi dan Komposisi Medium terhadap Pertumbuhan Tunas Eksplan Sirsak Ratu

The Influence of Sterilization Technique and Medium Composition on the Shoots Growth of The Soursop Explants Ratu Variety

Rico Hutama Sulistiyo^{1*}, Zayyan Luthfiyyah¹, Buana Susilo¹, Lengga Nurullah Dalimartha¹, Eko Chandra Wiguna¹, Nunie Yuliana², Endry Nugroho Prasetyo²

¹ PT. Gudang Garam, Tbk. Direktorat Produksi Gempol, Desa Sumbersuko, Kecamatan Gempol, Kabupaten Pasuruan, Indonesia

² Departemen Biologi FMIPA Insititut Teknologi Sepuluh Nopember, Jalan Gedung H, Kampus ITS Keputih Sukolilo, Surabaya, 60111, Indonesia

*Corresponding author: rico.sulistiyo@gudanggaramtbk.com

Manuscript received: 20 Juni 2017 Revision accepted: 5 Agustus 2017

ABSTRACT

Successful tissue culture of soursop plants requires proper sterilization techniques and hormone levels to produce good shoot growth. This study aims to determine the effect of sterilization techniques and medium composition of soursop explants, using factorial completely randomized design with 2 factors: sterilizing agents and medium composition, repeated 3 times. Hydrogen Peroxide, Mercury and Sodium Hypoclorite used as sterilizing agents. The medium composition used in this study consisted of 3 levels: MS 0, MS 0.5 ppm BAP + 0.05 ppm NAA and MS 1 ppm BAP + 0.1 ppm NAA. The best treatment is MS medium 0.5 ppm BAP + 0.05 ppm NAA with hydrogen peroxide sterilizing agent which produces the highest propagation level and lowest contamination level.

Keywords: Ratu soursop, sterilization, BAP, NAA

PENDAHULUAN

Di Indonesia terdapat 2 buah jenis sirsak yang telah tercatat oleh Kementerian Pertanian yaitu sirsak lokal dan sirsak ratu, perbedaan hanya dapat diketahui dengan merasakan daging buahnya yang tidak mengandung banyak air dan memiliki biji dengan jumlah yang sedikit serta berukuran kecil pipih, rasa manis akan ditunjukkan oleh varietas ratu dan rasa asam sedikit manis segar pada sirsak lokal (Sudjijo, 2007). Kedua varietas tersebut memiliki kemiripan karakter semisal warna kulit batang coklat, permukaan daun halus, bentuk percabangan jorong ke atas, lebar daun $\pm$ 4,8-5,5 cm, panjang daun 10-20 cm, warna daun bagian atas hijau tua, warna daun bagian bawah hijau, tepi daun rata, bentuk daun lonjong ujung runcing, warna bunga hijau kekuningan, dan bentuk buahnya bulat lonjong (Sudjijo, 2007; Solahuddin, 1998).

Perbanyakan bibit sirsak ratu dapat dilakukan dengan metode vegetatif dan generatif (Pinto *et al*, 2005; Costa *et al*, 2005). Pemilihan metode tentunya dengan mempertimbangkan kuantitas dan kualitas dari bibit. Metode Generatif memiliki banyak kelemahan, semisal menggunakan biji maka wajib memiliki karakteristik yang menghasilkan banyak buah, berkualitas dan resisten terhadap pestisida dan penyakit (Torres and Sanchéz, 1992; Coronel, 1994; Agustín and Alviter, 1996). Penggunaan biji sangat tidak disarankan karena biji *Annona* umumnya menunjukkan germinasi yang tidak merata dan acak, yang terjadi selama selang waktu lama dan membuat metode generatif sangat sulit (Coronel, 1994; Nakasone and Paull, 1998).

Konservasi alami melalui biji dari genotip terpilih menggunakan metode propagasi konvensional masih sangat tidak mungkin sampai sekarang sehingga mikropropagasi *Annona muricata* dengan kultur jaringan adalah alternatif terbaik untuk multiplikasi klonal (Bridg, 2000). Metode vegetatif memiliki kelebihan dibanding metode generatif diantaranya ialah dapat mempropagasi genotip yang unggul langsung dari induk (Crocomo and Gallo, 1995; Caldas *et al*, 1990; Torres *et al*, 2000) mempertahankan kualitas seperti nilai keindahan, kualitas ukuran buah, ketahanan terhadap pestisida, dan berkemampuan rendah untuk menjadi tanaman kerdil (Hartmann *et al*, 1997). Teknik kultur jaringan ini mengacu pada konsep sel tanaman yang bersifat totipotensi (Haberlandt, 1902) yang mengarah kepada kemampuan dari sel tunggal untuk mengekspresikan keseluruhan *genome*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui teknik sterilisasi serta komposisi media yang tepat dan mampu menghasilkan pertumbuhan eksplan yang optimal melalui teknik kultur jaringan.

BAHAN DAN METODE

Media yang digunakan adalah media Murashige Skoog (MS) yang terdiri dari 3 jenis: MS 0, MS 0,5 ppm BAP+0,05 ppm NAA, MS 0,1 ppm BAP+0,01 ppm NAA, komposisi sukrosa yang digunakan 30g/l, phytagel 6g/l dan pH 5,7. Media disterilisasi dengan autoclave manual pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Eksplan yang digunakan berupa ruas cabang tanaman (nodus) sirsak pada urutan ruas 3-6 dari pucuk/meristem apikal, eksplan disterilisasi dengan 2 tahap yaitu dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) dan di luar LAF. Bahan pensteril yang digunakan berupa: hidrogen peroksida (H_2O_2) 35%: 17,6% (v/v), raksa ($HgCl_2$): 0,1%, *clorox* ($NaClO$): 3%. Tahap pertama, eksplan disterilisasi diluar LAF dengan cara memotong eksplan per ruas menggunakan pisau/cutter steril, kemudian eksplan disterilisasi dengan larutan Tween 20 selama 15 menit, dilanjutkan etanol 70% selama 1 menit dan terakhir dengan agen pensteril yang sudah disebutkan sebelumnya, masing-masing selama 10 menit. Setelah eksplan disterilisasi diluar

LAF selanjutnya masuk dalam sterilisasi yang dilakukan didalam LAF dengan cara memotong dan membuang bagian ujung-ujung eksplan, kemudian disterilisasi dengan aquades steril selama kurang lebih 3 menit sebanyak 3 kali. Eksplan yang sudah steril diinokulasi pada media perlakuan dengan cara menanam bagian bawah nodal pada media.

Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor dan 3 ulangan. Parameter pengamatan: waktu pertama kali muncul kontaminasi, jumlah eksplan terkontaminasi, *browning*, jumlah tunas, jumlah daun, jumlah eksplan hidup.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Hasil Analisis Sidik Ragam pada Perlakuan Bahan Pensteril (A), Komposisi Media (B), dan Interaksi Keduanya (AxB) terhadap Seluruh Parameter Pengamatan.

Perlakuan	Waktu pertama kali muncul kontaminasi	Jumlah eksplan terkontaminasi	<i>Browning</i>	Jumlah tunas	Jumlah daun
Bahan Pensteril (A)					
Sidik ragam	**	**	**	*	**
Hidrogen peroksida (H_2O_2) 35%: 17,6% (v/v) (A1)	4,56 ^b	5,22 ^b	1,78 ^b	1,98 ^b	5,95 ^b
Raksa ($HgCl_2$): 0,1% (A2)	7,11 ^c	2,56 ^a	15,78 ^c	1,67 ^b	3,33 ^a
<i>Clorox</i> ($NaClO$): 3% (A3)	1,44 ^a	19,22 ^c	0,44 ^a	0,94 ^a	2,83 ^a
BNT 5%	0,71	0,74	0,81	0,67	1,90
Komposisi Media (B)					
Sidik Ragam	tn	tn	tn	*	*
MS 0 (B1)	4,33	26,00	18,33	0,97 ^a	2,64 ^a
MS 0,5 ppm BAP + 0,05 ppm NAA (B2)	4,56	27,33	18,33	2,05 ^b	5,44 ^c
MS 1 ppm BAP + 0,1 ppm NAA (B3)	4,22	27,67	17,33	1,58 ^b	4,04 ^b
BNT 5%	0,71	0,74			
Interaksi (AxB)					
Sidik ragam	tn	tn	tn	tn	tn
A1B1	4,33	4,67	1,67	1,25	3,74
A1B2	5,00	5,33	2,33	2,70	8,10
A1B3	4,33	5,67	1,33	2,00	6,01
A2B1	7,33	2,67	16,33	0,83	1,67
A2B2	7,33	2,67	15,33	2,11	4,22
A2B3	6,67	2,33	15,67	2,06	4,11
A3B1	1,33	18,67	0,33	0,83	2,50
A3B2	1,33	19,33	0,67	1,33	4,00
A3B3	1,67	19,67	0,33	0,67	2,00
BNT 5%	1,24	1,28	1,40	1,16	3,29

Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa perlakuan teknik sterilisasi berpengaruh nyata terhadap parameter waktu pertama kali muncul kontaminasi, tetapi perlakuan komposisi media dan interaksi kedua faktor tersebut tidak berpengaruh nyata terhadap parameter tersebut. Hasil uji BNT $\alpha = 0,05$ pada table 1 di atas menunjukkan bahwa

perlakuan teknik sterilisasi dengan bahan pensteril raksa (A2) menghasilkan rerata waktu pertama kali muncul kontaminasi yang paling lambat yaitu 7,11 hari dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya.

Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa perlakuan teknik sterilisasi berpengaruh nyata terhadap

parameter jumlah eksplan terkontaminasi, tetapi perlakuan komposisi media dan interaksi kedua faktor tersebut tidak berpengaruh nyata terhadap parameter tersebut. Hasil uji BNT α = 0,05 pada tabel 1 di atas menunjukkan bahwa perlakuan teknik sterilisasi dengan bahan pensteril raksa (A2) menghasilkan rerata jumlah eksplan terkontaminasi terendah yaitu 2,56. Perlakuan A2 berbeda nyata dengan perlakuan bahan pensteril hidrogen peroksida (A1) dan bahan pensteril *clorox* (A3) dengan rerata jumlah eksplan terkontaminasi yaitu 5,22 dan 19,22.

Kontaminasi merupakan gangguan yang sering terjadi pada kultur jaringan, yang dapat terdiri dari bakteri, jamur, atau virus (Mariska dan Sukmadjaja, 2003). Untuk mencegah kontaminasi, dapat dilakukan teknik sterilisasi yang tepat baik terhadap alat maupun bahan serta lingkungan kerja. Kegiatan sterilisasi bertujuan untuk mengeliminasi patogen atau cendawan yang mungkin terbawa saat pengambilan eksplan, yang dapat menimbulkan kontaminasi sehingga menghambat pertumbuhan eksplan menjadi tanaman utuh, bahan desinfektan yang dapat digunakan menjadi tanaman untuk sterilisasi media dalam kultur jaringan, diantaranya yang umum dikenal adalah HgCl₂ dan NaClO (Gunawan, 1992; Sugiyama, 1999).

Penggunaan HgCl₂ sebagai bahan sterilan dalam kultur jaringan sebenarnya telah banyak dilaporkan (Naika dan Krishna, 2008; Preethi *et al*, 2011; Anburaj *et al*, 2011; Sen *et al*, 2013). Pada Penelitian ini, penggunaan bahan pensteril raksa memang lebih efektif akan tetapi berbahaya terhadap lingkungan karena sulit untuk diurai serta bersifat toksik, selain itu raksa berpengaruh terhadap kematian sel tanaman/eksplan.

Pada kultur *Salacia chinensis*, sterilisasi permukaan dengan 70% etanol selama 1 menit dilanjutkan dengan 1% NaClO (dengan ditambahkan 2-3 tetes Tween 20) selama 15 menit terbukti lebih efektif untuk eksplan daun yang mencapai 99%, sedangkan direndam dalam 70% etanol selama 2 menit, diikuti dengan 0,1% merkuri klorida (HgCl₂) selama 5 menit terbukti lebih efektif untuk eksplan nodal (96%) (Majid *et al.*, 2014).

Penggunaan NaClO sebagai bahan sterilisasi permukaan dari berbagai sumber eksplan tanaman telah banyak dilaporkan (Miche dan Balandreau, 2001; Vejsadova, 2006; Badoni dan Chauhan, 2010; Maina *et al*, 2010; Colgecen *et al*, 2011; Morla *et al*, 011), karena hanya berperan sebagai sebagai bahan sterilisasi permukaan jaringan tanaman maka efektifitas NaClO dalam mengendalikan kontaminasi pada eksplan juga tidak tinggi. Jika senyawa ini diberikan dalam konsentrasi dan waktu pemaparan yang rendah juga tidak terlalu efektif dalam mengendalikan kontaminasi pada eksplan (Farooq *et al*, 2002). Semakin sedikit konsentrasi NaClO maka eksplan semakin rentan terhadap patogen, namun apabila semakin tinggi konsentrasi NaClO maka perkembangan jaringan eksplan menjadi terhambat (Rismayani dan Hamzah, 2010).

Hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa perlakuan teknik sterilisasi berpengaruh nyata terhadap parameter jumlah eksplan *browning*, tetapi perlakuan

komposisi media dan interaksi keduanya tidak berpengaruh nyata terhadap parameter tersebut. Hasil uji BNT α = 0,05 pada tabel 1 di atas menunjukkan bahwa perlakuan teknik sterilisasi dengan bahan pensteril *clorox* (A3) menghasilkan rerata jumlah eksplan *browning* yaitu 0,44. Perlakuan bahan pensteril *clorox* (A3) berbeda nyata dengan perlakuan bahan pensteril hidrogen peroksida (A1) dan bahan pensteril raksa (A2) dengan rerata jumlah eksplan *browning* yaitu 1,78 dan 15,78.

Perlakuan merkuri memberikan rerata *browning* yang tertinggi, sterilisasi dengan menggunakan HgCl₂ dalam waktu cukup lama akan berpengaruh terhadap eksplan karena dapat menyebabkan kerusakan sel pada eksplan, hal ini disebabkan HgCl₂ lebih bersifat toksik jika diberikan dalam konsentrasi yang lebih besar dan waktu pemaparan yang lebih lama, sehingga menyebabkan terjadinya *browning* hingga kematian pada eksplan (Farooq *et al*, 2002).

Perlakuan bahan pensteril hidrogen peroksida (H₂O₂) memiliki persentase kecil dalam parameter *browning* sehingga sel-sel eksplan masih hidup dan ada kemungkinan untuk tumbuh, selain itu bahan pensteril ini juga mampu menekan kontaminan dengan optimal sehingga jumlah eksplan steril dan tidak mengalami *browning* yang akhirnya mampu menginduksi tunas ada dalam jumlah lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa bahan pensteril *clorox* (A3) menghasilkan tingkat kontaminasi yang tinggi dengan tingkat *browning* yang rendah sedangkan bahan pensteril raksa menghasilkan tingkat kontaminasi yang rendah dengan tingkat *browning* tinggi. Sehingga kedua bahan pensteril tersebut dapat dikatakan kurang efektif untuk kultur jaringan sirsak dikarenakan kedua bahan tersebut menghasilkan jumlah eksplan hidup yang tergolong rendah akibat tingginya kontaminasi atau *browning*. Bahan pensteril hidrogen peroksida (A1) menghasilkan tingkat kontaminasi yang tergolong rendah dengan tingkat *browning* yang rendah juga sehingga diperoleh jumlah eksplan hidup yang tinggi. Hidrogen peroksida (A1) mampu menekan kontaminan dengan optimal namun tidak menyebabkan eksplan menjadi *browning*, sedangkan pada perlakuan *clorox* (A3) menghasilkan eksplan yang terkontaminasi dalam jumlah lebih banyak sehingga eksplan tidak dapat menyerap hara dengan optimal akibat adanya persaingan penyerapan hara dengan kontaminan dan menyebabkan eksplan mengalami kematian akibat terkontaminasi.

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan teknik sterilisasi dan komposisi media berpengaruh nyata terhadap parameter jumlah tunas, tetapi interaksi keduanya tidak berpengaruh nyata terhadap parameter tersebut. Hasil uji BNT α = 0,05 pada tabel 1 di atas menunjukkan bahwa perlakuan teknik sterilisasi dengan bahan pensteril hidrogen peroksida (A1) menghasilkan rerata jumlah tunas tertinggi yaitu 1,98 dan berbeda nyata dengan perlakuan bahan pensteril *clorox* (A3). Perlakuan komposisi media MS 0,5 ppm BAP + 0,05 ppm NAA (B2) memberikan rerata jumlah tunas dengan

nilai 2,05 yang lebih tinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan MS0 (B1).

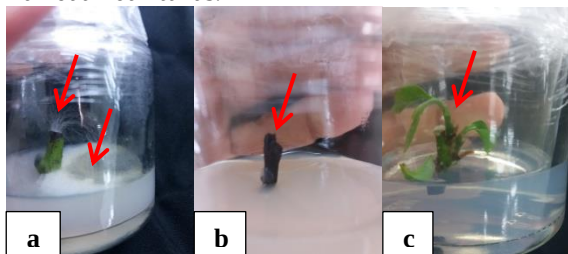
Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan teknik sterilisasi dan komposisi media berpengaruh nyata terhadap parameter jumlah daun, tetapi interaksi keduanya tidak berpengaruh nyata terhadap parameter tersebut. Hasil uji BNT α = 0,05 pada tabel 1 di atas menunjukkan bahwa perlakuan teknik sterilisasi dengan bahan pensteril hidrogen peroksida (A1) menghasilkan rerata jumlah daun tertinggi yaitu 5,95 dan berbeda nyata dengan perlakuan bahan pensteril raksa (A2) dan *clorox* (A3). Perlakuan komposisi media MS 0,5 ppm BAP + 0,05 ppm NAA (B2) memberikan rerata jumlah daun (5,44) yang lebih tinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan MS0 (B1) dan MS 1 ppm BAP + 0,1 ppm NAA (B3).

Jumlah daun dan jumlah tunas tertinggi dihasilkan oleh perlakuan bahan pensteril hidrogen peroksida (A1). Hal ini terkait dengan tingkat *browning* yang terjadi akibat perlakuan sterilisasi. Tingkat kerusakan eksplan akibat *browning* tentunya dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan untuk menghasilkan daun dan tunas. Kerusakan yang tinggi akibat *browning* akan menghambat pertumbuhan eksplan dan sebaliknya.

Perlakuan media MS 0,5 ppm BAP + 0,05 ppm NAA (B2) menghasilkan jumlah tunas tertinggi. Sejalan dengan parameter jumlah tunas, parameter jumlah daun pun diperoleh perlakuan terbaik pada perlakuan media MS 0,5 ppm BAP + 0,05 ppm NAA (B2), hal ini disebabkan semakin banyak jumlah tunas maka akan semakin banyak pula jumlah daun yang terinduksi.

Pertumbuhan tunas dan daun dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh NAA dan BAP yang diberikan. Interaksi antara NAA dan BAP memberikan peranan dalam pembelahan sel dan pembesaran sel, apabila kombinasi NAA dan BAP yang diberikan tidak sesuai maka akan menghambat pertumbuhan dari eksplan tersebut.

Jumlah tunas dan daun yang terbentuk pada tiap perlakuan dipengaruhi oleh kombinasi NAA dan BAP pada konsentrasi yang berbeda. Hal ini sesuai dengan pendapat Wattimena (1992) bahwa kecepatan sel membelah diri dapat dipengaruhi oleh adanya kombinasi zat pengatur tumbuh tertentu. Winarsih dan Priyono (2000) menyatakan bahwa kombinasi perlakuan sitokinin dan auksin pada konsentrasi yang tepat dapat meningkatkan jumlah daun dan tunas.



Gambar 1. Eksplan yang Mengalami Kontaminasi pada Hari ke-1 setelah Inokulasi (a), Eksplan yang Mengalami *Browning* pada Perlakuan Sterilisasi dengan HgCl_2 (b), Eksplan yang Mengalami Induksi Daun pada Media MS 0.5 ppm BAP dan 0.05 ppm NAA.

SIMPULAN

Propagasi optimal pada eksplan sirsak Ratu menggunakan teknik sterilisasi dengan sterilan Hydrogen Peroksida (H_2O_2) (A1) dan media MS 0.5 ppm BAP dan 0.05 ppm NAA (B2). Metode tersebut mampu menghasilkan eksplan dengan tingkat kontaminan dan *browning* terendah serta mampu menginduksi tunas paling baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada PT. Gudang Garam, Tbk. yang telah memberikan fasilitas serta Prof. Sobir yang telah membimbing dan berperan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, J. A. & Alviter, A. R. (1996). *El Cultivo de la Chirimoya (Annona Cherimola Mill.) en el estado de michoacan*. Spanish, mexico: Universidad Autonoma Chapingo (UAC).
- Anburaj et al., (2011). Effects of Plant Growth Regulators on Callus Induction from Leaf Explants of *Cleome viscosa*. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*, 2, 576.
- Badoni, A. & J. S. Chauhan. 2010. In Vitro Sterilization Protocol for Micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. 'Kufri Himalini'. *Academia Arena*, 2, 24–27.
- Bridg, H. (2000). *Micropropagation and Determination of The In Vitro Stability of Annona cherimola Mill. and Annona muricata L.* Unpublished PhD thesis, Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin.
- Caldas, L.S., Haridasan, P., & Ferreira, M. E. (1990). *Meios nutritivos. In: Técnicas e aplicacoes da cultura de tecidos de plantas*. Brasilia, Brasil: ABCTP, EMBRAPA.
- Colgecen, H., U. Koca., & G. Toker. (2011). Influence of Different Sterilization Methods on Callus Initiation and Production of Pigmented Callus in *Arnebia densiflora* Ledeb. *Turkish J. Biol*, 35, 513–520.
- Coronel, R. E. (1994). "Atis" In: *Promising Fruits of the Philippines. College of Agriculture*. Laguna, Philippines: University of the Philippines at Los Banos.
- Costa et al., (2005). Influencia de Diferentes Combinacoes de Substratos na Formacao de Porta-enxertos de Graviroleira (*Annona muricata* L.). *Revista Ciencia Agronomica*, 36(3), 299-305.
- Crocomo, O. J. & Gallo, L. A. (1995). A cultura de tecidos em fitopatologia. In: Bergamim Filho, A., Kimati, H., & Amorim, L. (Ed.). *Manual de Fitopatologia: Principios e Conceitos*. Sao Paulo: Agronomica Ceres.
- Farooq, S. A., T. T. Farooq & T. V. Rao. (2002) Micropropagation of *Annona squamosa* L. Using Nodal Explants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5 (1), 43-46.
- Gunawan, L. W. (1992). *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Bogor: Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi IPB.

- Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen". *Kl. Abt. J*, 111, 69-92.
- Hartmann et al., (1997). *Plant propagation: principles and practices* (6th ed). New Jersey: Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Maina et al., (2010). Surface Sterilant Effect on The Regeneration Efficiency from Cotyledon Explants of Groundnut (*Arachis hypogea* L.) Varieties Adapted to Eastern and Southern Africa. *African Journal of Biotechnology*, 9(20), 2866-2871.
- Majid et al., (2014). Establishment of an Efficient Explant Surface Sterilization Protocol for In Vitro Micropropagation of *Salacia chinensis* L. an Endangered Antidiabetic Medicinal Plant. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 3(12), 1266-1274.
- Mariska & Sukmadjaja. (2003). *Kultur Jaringan Abaka Melalui Kultur Jaringan*. Bogor: Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.
- Miche, L. & J. Balandreau. (2001). Effects of Rice Seed Surface Sterilization with Hypochlorite on Inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Appl. Environ. Microbiol*, 67: 3046–3052.
- Morla, S., C. S. V. R. Rao., & R. Chakrapani. (2010). Factors Affecting Seed Germination and Seedling Growth of Tomato Plants Cultured In Vitro Conditions. *J. Chem. Biol. Phys. Sci*, 1: 328–334.
- Naika, H. R. & Venkatarangaiah, K. (2008). Plant Regeneration from Callus Culture of *Clematis Gouriana roxb.* – a Rare Medicinal Plant. *Turkish J. Biol*, 32: 99-103.
- Nakasone, H. Y. & Paull, R.E. (1998). "*Annonas*" In: *Tropical fruits*. London, UK: AB international.
- Pinto et al., (2005). *Annona species*. UK: International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton.
- Preethi, D., T. M. Sridhar., & C. V. Naidu. (2011). Efficient Protocol For Indirect Shoot Regeneration from Leaf Explants of *Stevia rebaudiana* (Bert.) – an Important Calorie Free Biosweetener. *J. Phytol*, 3, 56–60.
- Rismayani & F. Hamzah. (2010, Mei). Pengaruh Pemberian Chlorox (NaOCl) pada Sterilisasi Permukaan untuk Perkembangan Bibit Aglaonema (Donna Carmen) secara *In Vitro*. Prosiding Seminar Ilmiah dan Pertemuan Tahunan PEI dan PFI XX Komisariat Daerah Sulawesi Selatan.
- Sen et al., (2013). In Vitro Sterilization Protocol for Micropropagation of *Achyranthes aspera* L. Node. *Int. Res. J. Biotechnol*, 4, 89–93.
- Solahuddin, S. (1998). *Lampiran Keputusan Menteri Pertanian-Deskripsi Sirsak Varietas Ratu-1*. Nomor: 866/Kpts/TP.240/11/98.
- Sudjijo. (2007). *Mengenal Sirsak Varietas Ratu dan Lokal*. Sumatera Barat: Badan Penelitian Tanaman Buah Tropika, Badan Penelitian dan Lembaga Pengembangan Pertanian, Kementrian Pertanian Solok.
- Sugiyama, M. (1999). Organogenesis In Vitro. *Opinion on Plant Biology*, 2, 61-64.
- Torres, W. E. & Sancez, L. A. (1992). *Fruticultura Colombiana Guanabano*. Spanish: Instituto Colombiano Agropecuario.
- Vejsadova, H. (2006). Factors Affecting Seed Germination and Seedling Growth of Terrestrial Orchids Cultured In Vitro. *Acta Biol. Cracoviensia Ser. Bot*, 48, 109–113.
- Wattimena. (1992). *Bioteknologi Tanaman*. Bogor: DEPDIBUD, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi, IPB.
- Winarsih, S. & Priyono. (2000). Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh terhadap Pembentukan dan Pengakaran Tunas Mikro pada Asparagus secara *In Vitro*. *J. Hort*, 10(1), 11-17.