

PERBANDINGAN METODE STERILISASI PADA PERBANYAKAN IN VITRO SAURAUIA BRACTEOSA DC.

Comparison of Sterilization Methods in In Vitro Propagation of Saurauia bracteosa DC.

**Naomi Bastanta Putri Octaviana Ginting¹⁾, Rafaela Marlisa. G.M.¹⁾, Tamariska Blessy¹⁾, Ryutaro Onuki²⁾,
Cokorda Istri Meyga Semarayani³⁾**

¹⁾Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta

²⁾Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Ganesha, Bali

³⁾Pusat Riset Konservasi Tumbuhan, Kebun Raya dan Kehutanan, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jawa Barat

*Korespondensi: HP. 082115308989, Email: naomiginting09@gmail.com

ABSTRACT

Lotrok leaves (*Saurauia bracteosa* D.C.) is a native plant of Indonesia that is included in the IUCN list with a vulnerable status. This plant contains a variety of biological compounds with their activities as antidiabetic, antioxidant, antimicrobial, anticholesterol, antitumor, anticancer, and wound healing. Information regarding the propagation of this species is still limited, so this study aims to obtain the optimal sterilization method for in vitro propagation. The explants used were leaves of *S. bracteosa* from the collection of the Eka Karya Bali Botanic Gardens. In this study, the types of sterilants used were 50% and 70% alcohol, ascorbic acid, bactericide, detergent, fungicide, sodium hypochlorite (NaClO), and tween 20. The experiment was carried out with four sterilization methods. The culture was placed in two different environmental conditions, namely in light and dark. The experimental results showed that the four sterilization methods were able to produce sterile explants. The best sterilization method is method II which includes immersion in detergent+tween 20, bactericide+fungicide+tween 20, ascorbic acid 200 mg L⁻¹, 70% alcohol, 20% NaClO, and stored in dark conditions. This method was able to restore the color of leaves that have experienced browning to greens.

Keywords : Ascorbic Acid, *Saurauia Bracteosa* Leaves, Explants, NaClO, Sterilization.

ABSTRAK

Daun Lotrok (*Saurauia bracteosa* DC.) merupakan tanaman asli Indonesia yang termasuk dalam daftar IUCN dengan status *vulnerable*. Tanaman ini mengandung berbagai senyawa biologis dengan aktivitasnya sebagai antidiabetes, antioksidan, antimikroba, antikolesterol, antitumor, antikanker, dan penyembuhan luka. Informasi mengenai perbanyakan jenis ini masih terbatas, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode sterilisasi yang optimal dalam upaya perbanyakan secara *in vitro*. Eksplan yang digunakan berasal dari koleksi Kebun Raya Eka Karya Bali, berupa daun *S. bracteosa*. Pada penelitian ini, sterilan yang digunakan yaitu alkohol 50%, alkohol 70%, asam askorbat, bakterisida, detergen, fungisida, sodium hipoklorit (NaClO), dan tween 20. Percobaan dilakukan dengan empat metode sterilisasi dengan peletakan hasil kultur di dua kondisi lingkungan yang berbeda, yaitu terang dan gelap. Hasil percobaan menunjukkan bahwa keempat metode sterilisasi mampu menghasilkan eksplan yang steril. Metode sterilisasi terbaik adalah metode II yang meliputi perendaman dalam detergen+tween 20, bakterisida+fungisida+tween 20, asam askorbat 200 mg L⁻¹, alkohol 70%, NaClO 20%, dan disimpan dalam kondisi gelap. Metode ini mampu mengembalikan warna daun yang telah mengalami pencoklatan menjadi hijau.

Kata Kunci : Asam Askorbat, daun *Saurauia bracteosa*, Eksplan, NaClO, Sterilisasi.

PENDAHULUAN

Saurauia bracteosa DC. merupakan salah satu tanaman asli Indonesia. Di pulau Jawa, tanaman berkayu ini dikenal dengan nama lotrok. Tanaman lotrok umumnya ditemukan di hutan atau pada daerah yang lembab dengan tinggi sekitar 3–15 m. Lotrok memiliki buah kecil berbentuk bulat dengan biji yang banyak. Daunnya panjang, lebar, ujungnya lancip dan bagian bawahnya memiliki trikoma. Daun lotrok memiliki berbagai kandungan senyawa biologis berupa alkaloid, flavonoid, saponin, senyawa fenolik, steroid, dan tanin yang berpotensi sebagai antidiabetes, antioksidan, antimikroba, antikolesterol, dan penyembuhan luka (Pasaribu *et al.* 2020; Silalahi *et al.* 2021).

Tanaman lotrok masuk dalam daftar IUCN dengan status *vulnerable* (IUCN 1998). Oleh karena itu, diperlukan metode yang tepat sebagai solusi untuk mengatasi rendahnya populasi dan meningkatkan strategi konservasi tanaman lotrok, yaitu menggunakan teknik kultur jaringan. Kultur jaringan merupakan metode perbanyakan tanaman dalam kondisi aseptis pada media agar yang mengandung nutrisi dan zat pengatur tumbuh (ZPT) untuk menunjang pertumbuhan eksplan (Ikenganyia *et al.* 2017). Teknik kultur jaringan membutuhkan waktu yang singkat, lahan yang sedikit, lingkungan terkontrol, tanaman induk dibutuhkan dalam jumlah sedikit, dapat memproduksi dalam jumlah banyak, dan identik dengan induknya (Surya & Ismaini 2021).

Dalam pelaksanaannya, sterilisasi merupakan tahapan penting dalam kultur jaringan. Eksplan yang berasal dari lingkungan terbuka mengandung kotoran dan mikroorganisme yang menempel di permukaannya (Neliyati *et al.* 2019). Jika sterilisasi eksplan tidak maksimal, mikroorganisme yang menempel akan berkembang dan menyebabkan kontaminasi yang berujung pada kematian eksplan. Keberhasilan dalam memperoleh eksplan yang steril dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi bahan sterilan yang digunakan. Oleh karena itu, pemilihan metode sterilisasi yang tepat sangat penting dilakukan (Natasha & Restiani 2019). Metode sterilisasi memiliki pengaruh yang berbeda-beda tergantung pada jenis tanaman, bagian tanaman yang digunakan, umur tanaman, dan musim pengambilan eksplan (Martini *et al.* 2013). Jenis disinfektan yang umum digunakan dalam proses sterilisasi antara lain, alkohol, bakterisida, fungisida, dan sodium hipoklorit. Disinfektan digunakan untuk mengeliminasi virus, jamur, bakteri, dan arthropoda yang ada di permukaan eksplan.

Selain kontaminasi, salah satu tantangan yang dihadapi adalah reaksi *browning* yang dipicu oleh kehadiran senyawa fenolik (Liang *et al.* 2019). Pada umumnya reaksi *browning* pada eksplan terjadi akibat luka irisan yang dihasilkan saat memotong eksplan sehingga terjadi eksudasi senyawa fenol. Oleh karena itu, eksplan dan media berubah warna menjadi cokelat yang menyebabkan pertumbuhannya terhambat (Chai *et al.* 2018). Langkah yang dapat dilakukan untuk mencegah reaksi *browning* pada eksplan adalah dengan menambahkan agen penghambat seperti asam askorbat, asam sitrat, dan *polyvinyl pyrrolidone* (PVP), dan arang aktif (Taghizadeh & Dastjerdi 2021). Perendaman dengan asam askorbat mampu menghambat reaksi *browning* sebesar 64,3% pada eksplan *Musa* spp. (Munguatosha *et al.* 2014) dan menurunkan reaksi *browning* sebesar 30% pada eksplan *Hevea brasiliensis* dalam kondisi gelap (Admojo & Indriato 2016). Berbagai penelitian telah dilakukan untuk menguji aktivitas ekstrak daun lotrok, namun informasi mengenai perbanyakan daun lotrok masih terbatas, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode sterilisasi yang optimal dalam upaya perbanyakan secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Kebun Raya Eka Karya Bali pada bulan Agustus 2022. Bahan yang digunakan antara lain alkohol 50%, alkohol 70%, detergen, tween 20, fungisida, bakterisida, media *Murashige & Skoog* (MS), media *Wood Plant Medium* (WPM), asam askorbat, dan natrium hipoklorit. Alat yang digunakan yaitu autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), timbangan analitik, dan *magnetic stirrer*.

Bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan tanam atau eksplan adalah daun tanaman *Saurauia bracteosa* (Gambar 1) yang merupakan koleksi Kebun Raya Eka Karya Bali. Daun disterilisasi dengan empat metode berbeda (Tabel 1). Setelah proses sterilisasi, eksplan ditanam ke dalam botol kultur yang berisi 2 jenis media, yaitu media MS dan WPM. Pada Metode II, III, dan IV botol kultur tersebut ditempatkan pada dua kondisi yang berbeda, yaitu ruang gelap dan terang dengan suhu ± 20 °C dan lama penyinaran 12 jam pada kondisi terang. Sedangkan pada Metode I semua kultur ditempatkan pada kondisi terang.



Gambar 1. Daun *Saurauia bracteosa* yang digunakan sebagai bahan tanam.

Tabel 1. Metode sterilisasi daun *Saurauia bracteosa*

| Tahapan | Metode I | Metode II | Metode III | Metode IV |
|---------|---|--|--|--|
| 1 | Perendaman dengan detergen □ 60 menit | Perendaman dengan detergen + tween 20 □ 60 menit | Perendaman dengan detergen + tween 20 □ 60 menit | Perendaman dengan detergen + tween 20 □ 60 menit |
| 2 | Bersihkan daun dan bilas dengan air mengalir | Bersihkan daun dan bilas dengan air mengalir | Bersihkan daun dan bilas dengan air mengalir | Bersihkan daun dan bilas dengan air mengalir |
| 3 | Bakterisida + fungisida + tween 20 □ 30 menit | Bakterisida + fungisida + tween 20 □ 30 menit | Alkohol 70% □ 3 menit | Alkohol 50% □ 5 menit |
| 4 | Alkohol 70% □ 25 menit | Asam askorbat 200 mg L ⁻¹ □ 30 menit | Asam askorbat 200 mg L ⁻¹ □ 60 menit | Tanam |
| 5 | NaClO 30% □ 30 menit | Alkohol 70% □ 1 menit | Tanam | |
| 6 | NaClO 10% ± 15 menit | NaClO 20% ± 10 menit | | |
| 7 | Tanam | Tanam | | |

HASIL DAN PEMBAHASAN

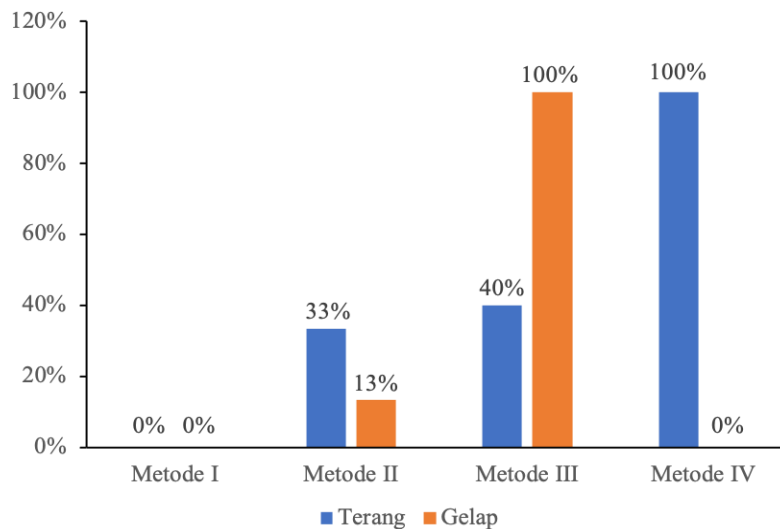
Hasil penelitian menunjukkan bahwa empat metode sterilisasi memberikan hasil yang berbeda dalam menghasilkan eksplan steril. Tabel 2. menunjukkan waktu pertama munculnya kontaminasi dan warna eksplan setelah dilakukan sterilisasi. Waktu tercepat munculnya kontaminasi adalah 3 hari setelah tanam (HST) yang terjadi pada Metode III dan IV. Hingga akhir pengamatan, Metode I menghasilkan eksplan tanpa kontaminasi. Kontaminasi yang terjadi disebabkan adanya jamur dan bakteri. Jenis kontaminasi yang disebabkan oleh jamur ditandai dengan kemunculan sejumlah hifa berwarna putih di sekitar eksplan. Sedangkan kontaminasi oleh bakteri biasanya menyerang langsung ke jaringan tumbuhan dan ditandai dengan adanya lendir, Wati *et al.* (2020) menyatakan bahwa penggunaan eksplan berupa daun lebih rentan terkena kontaminasi dibandingkan dengan organ tumbuhan yang lain.

Keempat metode sterilisasi mampu menghasilkan eksplan steril (Gambar 2). Proses sterilisasi dengan menggunakan Metode I eksplan tidak mengalami kontaminasi kemungkinan disebabkan dengan konsentrasi NaClO yang lebih tinggi dan waktu perendaman yang lebih lama dibandingkan dengan metode lainnya (Tabel 2; Gambar 2). Hasil tersebut sejalan dengan (Setiani *et al.* 2018), kombinasi NaClO dengan alkohol 70% mampu menghasilkan eksplan yang steril hingga 40 HST pada daun sukun. Dibandingkan Metode III dan IV, Metode II memiliki waktu munculnya kontaminasi yang lebih lama. Hal ini disebabkan adanya kombinasi antara NaClO dengan alkohol 70%. Berdasarkan pengamatan persentase kontaminasi Metode II yang ditempatkan pada kondisi gelap lebih rendah dibandingkan dengan kondisi terang (Gambar 2). Pada Metode III, eksplan steril diperoleh pada kultur yang ditempatkan di kondisi terang. Hal sebaliknya terjadi pada Metode IV, eksplan steril diperoleh pada kondisi gelap.

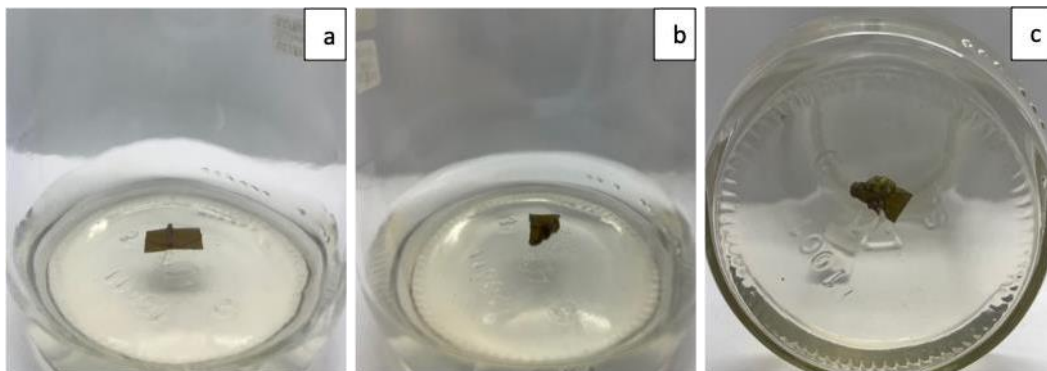
Pada semua metode sterilisasi warna eksplan daun berubah menjadi cokelat (Gambar 3a). Afridi *et al.* (2015) menyatakan bahwa konsentrasi NaClO yang tinggi dapat menyebabkan permukaan eksplan terbakar dan mengalami *browning* saat ditanam. Reaksi *browning* dapat juga terjadi akibat dari proses pemotongan eksplan. Saat pemotongan terjadi reaksi enzimatis polifenol oksidase (PPO) sehingga menyebabkan senyawa fenolik teroksidasi membentuk kuinon yang reaktif dan mampu menghambat pertumbuhan eksplan, bahkan menyebabkan kematian pada jaringan (Moon *et al.* 2020). Daun lotrok mengandung senyawa fenolik yang berfungsi sebagai respon pertahanan di kondisi lingkungan yang tidak menentu (Pasaribu *et al.* 2020).

Tabel 2. Perbandingan empat metode sterilisasi terhadap kontaminasi dan warna eksplan *Saurauia bracteosa*

| Metode Sterilisasi | Waktu Kontaminasi Pertama | Warna Eksplan |
|--------------------|---------------------------|---------------|
| Metode I | Tidak ada kontaminasi | Cokelat |
| Metode II | 4 hari setelah tanam | Cokelat |
| Metode III | 3 hari setelah tanam | Cokelat |
| Metode IV | 3 hari setelah tanam | Cokelat |



Gambar 2. Persentase kontaminasi daun *Saurauia bracteosa* pada empat metode yang berbeda.



Gambar 3. Eksplan daun *Saurauia bracteosa* yang telah disterilisasi, a. daun saat ditanam pertama kali; b. daun yang menggulung; c. daun dengan bulatan kecil berwarna hijau.

Perendaman dengan asam askorbat dilakukan sebagai pencegahan *browning*. Asam askorbat merupakan vitamin C yang berperan sebagai antioksidan kuat. Antioksidan kuat mampu menangkal radikal bebas saat proses pemotongan eksplan, sehingga dapat menghambat dan meminimalisir kerusakan oksidatif (Poniewozik *et al.* 2022). Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa terjadi perubahan warna eksplan yang disterilisasi dengan Metode II dan ditempatkan pada kondisi gelap. Terlihat dari eksplan daun menggulung (Gambar 3b) dan muncul bulatan-bulatan kecil berwarna hijau (Gambar 3c). Diduga bulatan yang muncul tersebut adalah kalus. Berdasarkan penelitian sebelumnya, perendaman dengan asam askorbat mampu memicu pertumbuhan dan perkembangan eksplan, elongasi sel, dan mampu meningkatkan kualitas hidup eksplan (Ndakidemi *et al.* 2014; Irshad *et al.* 2018). Selain itu, kondisi gelap cenderung membuat pertumbuhan kalus yang lebih optimal. Hal ini diduga pertumbuhan kalus dapat terhambat karena adanya cahaya. Syabana *et al.* (2017),

cahaya dapat merusak auksin, sebaliknya eksplan yang ditanam dalam kondisi gelap mampu mempercepat pembentukan kalus karena adanya kinerja auksin yang lebih distimulasi pada kondisi ini. Kemunculan kalus ditandai adanya penebalan pada permukaan daun dan kemudian bertransformasi menjadi bulatan kecil yang lebih jelas (Nada *et al.* 2011; Wijawati *et al.* 2019). Penelitian mengenai perbanyakan *in vitro* *S. bracteosa* masih jarang dilakukan. Oleh karena itu, penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui proses pembentukan kalus serta regenerasinya dari daun *S. bracteosa* melalui kultur *in vitro*.

KESIMPULAN

Bahan dan tahapan sterilisasi berpengaruh terhadap keberhasilan sterilisasi daun *Saurauia bracteosa*. Metode sterilisasi II yang meliputi perendaman dalam detergen+tween 20, bakterisida+fungisida+tween 20, asam askorbat 200 mg L⁻¹, alkohol 70%, NaClO 20%, dan kultur disimpan dalam kondisi gelap memberikan respon pertumbuhan yang terbaik dibandingkan dengan metode lainnya. Terlihat dengan munculnya bulatan-bulatan hijau pada daun yang diduga sebagai kalus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pengelolaan Koleksi Ilmiah, Badan Riset dan Inovasi Nasional atas bahan tanam yang digunakan pada kegiatan ini. Selain itu, kepada Luh Aryani, selaku teknisi yang telah membantu pelaksanaan kegiatan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Kebun Raya Eka Karya Bali.

DAFTAR PUSTAKA

- Admojo, L., dan Indriato, A. (2016). *Pencegahan Browning Fase Inisiasi Kalus pada Kultur Midrib Daun Klon Karet (Hevea brasiliensis Muell Arg) PB 330. Jurnal Penelitian Karet.* 34(1): 25– 34.
- Afridi, M.I., Ali, N.m Shinwari K.I., Hassan M.A. (2015). *Optimization of Aseptic Conditions for Micropropagation of Olive (Olea europaea L.) Cultivar Uslu. Journal of Bio-Molecular Sciences.* 3(1): 35-43.
- Chai, J., Gao, Y., Dong, Y., Kong, L., dan Zhang, Y. (2018). *Browning Treatment in Tissue Culture of “Hongyang” Kiwifruit.* IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 452(2). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/452/2/022075>.
- Ikenganyia, E., Anikwe, M., Omeje, T., dan Adinde, J. (2017). *Plant Tissue Culture Regeneration and Aseptic Techniques.* Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology. 1(3): 1–6. <https://doi.org/10.9734/ajb2t/2017/31724>.
- Irshad, M., Rizwan, H. M., Debnath, B., Anwar, M., Li, M., Liu, S., He, B., dan Qiu, D. (2018). *Ascorbic Acid Controls Lethal Browning and Pluronic F-68 Promotes High-Frequency Multiple Shoot Regeneration From Cotyledonary Node Explant of Okra*

- (*Abelmoschus Esculentus L.*). *HortScience*. 53(2): 183–190.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI12315-17>.
- IUCN. (1998, January 1). *Saurauia bracteosa*.
<https://www.iucnredlist.org/species/37401/10049827>.
- Liang, S., He, Y., Zheng, H., Yuan, Q., Zhang, F., dan Sun, B. (2019). *Effects of Sucrose and Browning Inhibitors on Callus Proliferation and Anti-Browning of Chinese Kale*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 252(2).
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/252/2/022018>.
- Martini, A. N., Papafotiou, M., dan Vemmos, S. N. (2013). *Season And Explant Origin Affect Phenolic Content, Browning of Explants, and Micropropagation of Malosorbus Florentina (Zucc.) Browicz*. *Hortscience: A Publication of the American Society for Horticultural Science*. 48(1): 102–107.
- Moon, K. M., Kwon, E. bin, Lee, B., dan Kim, C. Y. (2020). *Recent Trends in Controlling the Enzymatic Browning of Fruit and Vegetable Products*. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25122754>.
- Munguatosha, N., Emerald, M., dan Patric, N. (2014). *Control of Lethal Browning by Using Ascorbic Acid on Shoot Tip Cultures of a Local Musa Spp. (Banana) Cv. Mzuzu in Tanzania*. *African Journal of Biotechnology*. 13(16): 1721–1725.
<https://doi.org/10.5897/ajb2013.13251>
- Nada, S, Chennareddy, S., Goldman, S., Rudrabhatla, S., Potlakayala, S.D., Josekutty, P., dan Deepkamal, K. (2011). *Direct shoot bud differentiation and plantlet regeneration from leaf and petiole explants of Begonia tuberhybrida*. *HortScience*. 46(5):759–764.
doi:10.21273/hortsci.46.5.759.
- Natasha, K., dan Restiani, R. (2019). *Optimasi sterilisasi eksplan pada kultur in vitro ginseng jawa (Taliu paniculatum)*. *Symposium of Biology Education (Symbion)*. 2: 87–95.
- Ndakidemi, C. F., Mneney, E., dan Ndakidemi, P. A. (2014). *Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning in in vitro culture of Brahylaena huillensis using nodal segments*. *American Journal of Plant Sciences*. 5(1): 187–191.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2014.51024>.
- Neliyati, N., Lizawati, L., dan Zulkarnain, Z. (2019). *The evaluation of sterilization protocol for sprout explants in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) tissue culture*. *Journal of Physics: Conference Series*. 1402(3). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1402/3/033024>.
- Pasaribu, G., Budianto, E., Cahyana, H., dan Saepudin, E. (2020). *A review on genus Saurauia: chemical compounds and their biological activity*. *Pharmacognosy Journal*. 12(3): 657–666. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.97>.

- Poniewozik, M., Parzymies, M., dan Szot, P. (2022). *Effect of activated charcoal and ascorbic acid on in vitro morphogenesis and o-dihydroxyphenols content in Paphiopedilum insigne*. Horticultural Science. 49(1): 48–51. <https://doi.org/10.17221/68/2020-HORTSCI>.
- Setiani, N.A., Nurwinda, F., Astriany D. (2018) *Pengaruh desinfektan dan lama perendaman pada sterilisasi eksplan daun sukun (Artocarpus altilis (Parkinson ex. F.A Zorn) Fosberg)*. Biotropika - Journal of Tropical Biology. 6(3): 78-82.
- Silalahi, E. K., Tamrin, Marpaung, L., dan Siburian, R. (2021). *Preliminary activity test of pirdot (Saurauia Vulcani, Korth) leaves collected from Aek Nauli forest, North Sumatera (Indonesia)*. AIP Conference Proceedings. 2342. <https://doi.org/10.1063/5.0045490>.
- Surya, M. I., dan Ismaini, L. (2021). *Perbandingan metode sterilisasi untuk perbanyakan Rubus rosifolius secara in vitro*. Al-Kaunyah: Jurnal Biologi. 14(1): 127–137. <https://doi.org/10.15408/kaunyah.v14i1.16325>.
- Syabana, M. A., Marianingsih, P., Hermita, N., Rohimah, I. (2017). *Induksi dan pertumbuhan kalus tanaman stevia (Stevia rebaudiana Bertoni M.) dengan perbedaan konsentrasi PEG (Polyethylene Glycol) pada kondisi pencahayaan secara in vitro*. Biodidaktika. 12(2): 57–68. Taghizadeh, M., dan Dastjerdi, M. G. (2021). *Inhibition of browning problem during the callogenesis. of Spartium junceum L. Ornamental Horticulture*. 27(1): 68–77. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.V27I1.2230>.
- Wati, T., Astarini, I. A., Pharmawati, M., dan Hendriyani, E. (2020). *Perbanyakan Begonia bimaensis Undaharta & Ardaka dengan teknik kultur jaringan*. Metamorfosa: Journal of Biological Sciences. 7(1): 112. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2020.v07.i01.p15>.
- Wijawati, N., Habibah, A., Musafa, F., Mukhtar, K., dan Anggraito, Y. U. (2019). *Pertumbuhan kalus rejasa (Elaeocarpus grandiflorus) dari eksplan tangkai daun pada kondisi gelap*. Life Science. 8(1): 17–24. <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/LifeSci>.