

## Pengaruh Metode Sterilisasi Permukaan terhadap Kultur Biji Jeruk *Japansche Citroen* (JC) *Citrus limonia* Osbeck

MUSTIKA TUWO<sup>\*</sup>), ANDI NURHIQMAH DEWI, YOSHELIN GAYATRI  
DWIMUTIARA APPA, RESKIA IMTIHANI RAMDANI,  
AURELIA SALSABILA

Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Hasanuddin, Makassar 90245, Indonesia

<sup>\*</sup>Email: [mustikatuwo@gmail.com](mailto:mustikatuwo@gmail.com)

### ABSTRACT

**Effect of Surface Sterilization Methods on Seed Culture of JC *Citrus limonia* Osbeck.** *Japansche Citroen* (JC) *Citrus limonia* Osbeck is one type of citrus that is commonly used as rootstock. JC seed propagation through in vitro culture will be more effective. The initiation stage is the first step of in vitro culture to obtain microbial-free explants and initiate the initial growth. At this stage the problem of contamination becomes the main limiting factor. This study aims to obtain the appropriate method of sterilizing of JC orange seed explants in in vitro culture propagation. A total of four sterilization methods have been tested at the Tissue Culture Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Hasanuddin University. The sterilization material used is tween 80, fungicide, 20-30% NaOCl and 90% alcohol. The variables observed in this study were the time of appearance of contamination, the percentage of types of contaminants (bacteria and fungi), the percentage of sterile explants and the percentage of live explants after 28 days of culture. The results showed that the fourth method was the optimal sterilization method with the lowest contamination level of 30% of the other three methods with the highest explant survival rate of 60% compared to the other three methods.

---

Keywords: *explant, initiation, JC seeds, sterilizing agents*

### PENDAHULUAN

Jeruk *Citrus* sp. merupakan salah satu tumbuhan dari famili Rutaceae termasuk komoditi hortikultura yang digemari masyarakat dan memiliki nilai ekonomi tinggi dilihat dari banyaknya permintaan dan produksi jeruk yaitu

lebih dari 120 juta ton per tahun (Hanif, 2020). Rasa yang asam manis dengan harga ekonomis serta fungsi kandungan nutrisi yang bermanfaat bagi kesehatan membuat jeruk dari tahun ke tahun semakin banyak diminati masyarakat baik dikonsumsi dari buah segar secara

langsung maupun dari olahan. Jeruk memiliki kandungan karbohidrat, serat, vitamin C, kalium, folat, vitamin A, vitamin B6 dan magnesium (Rasud dkk., 2015; Adenaike and Abakpa, 2021; Khan et al., 2021).

Bibit jeruk berkualitas dapat diperoleh melalui penggabungan sifat unggul dari tanaman batang bawah dan batang atas. Secara umum jenis jeruk yang banyak digunakan sebagai batang bawah adalah *Japansche Citroen* (JC) *Citrus limonia* Osbeck (Jenks et al., 2007; Eed et al., 2011; Jayanti dkk., 2015). Jeruk JC merupakan varietas hibrida yang dihasilkan dari persilangan antara *Citrus nobilis* (siam) dengan *Citrus medica* (sukade) yang diketahui berasal dari negara India juga biasa disebut *rangpur lime*, *china lime*, *pink lime* atau *vinegar lime* (Oksana dkk., 2011; Acevedo et al., 2012; Almeida et al., 2019).

Jeruk JC memiliki keunggulan dengan pohon yang kuat, mampu menghasilkan buah dalam jumlah yang banyak, perakaran serta kanopi luas dan dalam, daya adaptasi besar pada berbagai varietas jeruk batang atas dan berbagai jenis lahan, toleran terhadap kekeringan, penyakit busuk akar dan nematoda jeruk (Sugiyatno, 2017;

Berutu et al., 2018). Jeruk JC mampu bertahan pada kondisi lahan rawa daerah pasang surut dengan baik serta buah hasil sambung batang dengan jeruk JC sebagai batang bawah cenderung lebih manis (Andrini dkk., 2013; Jayanti dkk., 2015). Berdasarkan keunggulan dari jeruk JC inilah yang kemudian menjadikannya sebagai varietas jeruk batang bawah dengan nilai permintaan lebih tinggi dari varietas jeruk batang bawah lainnya.

Menurut Oksana dkk. (2011), jeruk JC merupakan jeruk dengan jumlah biji per buah sekitar lima sampai sepuluh biji saja sehingga hanya akan menghasilkan sedikit tanaman jika diperbanyak secara generatif pada media semai. Oleh karena itu, perbanyak benih JC melalui kultur *in vitro* akan lebih efektif dalam menghasilkan benih tanaman lebih cepat dalam jumlah yang besar, unggul dan bebas patogen (Ayu dkk., 2017). Penggunaan bahan eksplan menjadi masalah sumber kontaminan, sehingga diperlukan optimasi sterilisasi eksplan pada tahap awal kultur *in vitro*. Sterilisasi permukaan merupakan tahap yang wajib pada proses awal kultur *in vitro*, terutama eksplan yang digunakan berasal dari tanaman di lapangan (Meghwal et al., 2000).

Optimalisasi bahan sterilisasi merupakan langkah awal untuk mengurangi kontaminasi. Konsentrasi yang sesuai dan durasi paparan bahan sterilan sangat penting untuk meningkatkan persentase keberhasilan kultur *in vitro* karena konsentrasi yang tidak tepat akan menghambat pembelahan dan pertumbuhan sel (Hashim *et al.*, 2021). Efektivitas setiap bahan sterilan dalam mengurangi persentase kontaminan perlu dikaji karena setiap eksplan dari jenis tanaman yang berbeda, kadang berbeda pula teknik dan bahan sterilannya (Fitriani dkk., 2019). Beberapa bahan sterilisasi yang digunakan untuk dekontaminasi jaringan tanaman adalah fungisida, alkohol, tween 80, HgCl<sub>2</sub> dan NaClO (Mahmoud and Al-Ani, 2016; Neliyati *et al.*, 2019). Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan metode sterilisasi eksplan biji jeruk JC yang tepat dalam perbanyak kultur *in vitro*.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Tempat dan Waktu Percobaan**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2021 sampai dengan Maret 2022 di Laboratorium Kultur Jaringan, Departemen Biologi, Fakultas

Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar. Bahan tanaman yang digunakan adalah biji jeruk *Japansche citroen* JC diperoleh dari Jaya Bibit Purworejo, Jawa Tengah, media dasar *Murashige and Skoog* (MS), bioagar 7 g/L, sukrosa 30 g/L, NaOH 1 N, HCl 1 N, akuades, detergen, natrium hipoklorit (NaClO), tween 80, alkohol 70% dan alkohol 90%.

### **Pembuatan Media**

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Murashige and Skoog* (MS). Pembuatan media 1 L dibutuhkan media MS sebanyak 4,43 g kemudian ditambahkan sukrosa 30 g/L dan agar-agar 7 g/L lalu ditambahkan akuades hingga 1 L. Selanjutnya dilarutkan dalam gelas kimia sambil diaduk dengan batang pengaduk hingga homogen. Setelah itu, diukur pH-nya 5,8 (jika medium terlalu basa maka tambahkan HCl 1 N, namun jika medium terlalu asam maka tambahkan KOH 1 N). Selanjutnya, media dipanaskan hingga homogen lalu disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

### Sterilisasi Eksplan Biji Jeruk JC

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan mencuci bersih biji jeruk JC dengan air mengalir kemudian dicuci dengan detergen dan dibilas lagi sampai busanya hilang dan biji dikupas kulit luarnya. Sterilisasi berikutnya dilakukan dengan empat metode sterilisasi yang berbeda untuk mencari komposisi bahan sterilan yang efektif untuk kultur *in vitro* biji jeruk JC. Pada metode pertama digunakan tween 80, NaClO 20% dan alkohol 90%, metode kedua dengan tween 80, NaClO 30% dan alkohol 90%, metode ketiga dengan tween 80, fungisida dan alkohol 90%, metode keempat dengan tween 80, fungisida, NaOCl 30% dan 20% serta alkohol 90%. Fungisida dan NaClO merupakan bahan sterilan yang umumnya digunakan dalam sterilisasi kultur *in vitro* (Aseesh and Sushma, 2016; Gerolino *et al.*, 2015; Minipara *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2021). Bahan lainnya yang digunakan yaitu tween 80 dan alkohol 90%. Metode pertama yaitu setelah biji dikupas kulit luarnya biji direndam dengan tween 80 selama 15 menit lalu dibilas aquades sebanyak tiga kali dan direndam dalam larutan NaOCl 20% selama 15 menit dan dibilas aquades sebanyak tiga kali. Dilakukan hal yang sama terhadap

metode kedua dengan mengganti larutan NaOCl 30%, metode ketiga dan keempat dengan fungisida. Kemudian dilakukan perendaman alkohol 90% selama 15 menit dan dilakukan pencucian dengan aquades steril sebanyak tiga kali untuk semua metode. Pada metode keempat dilanjutkan perendaman NaOCl 20% selama 15 menit dan dibilas aquades steril sebanyak tiga kali. Proses selanjutnya adalah perendaman alkohol 90% selama 15 menit lalu dilakukan pencucian dengan aquades steril sebanyak tiga kali (Tabel 1).

### Penanaman Biji Jeruk JC

Biji yang telah disterilkan ditanam pada media MS dengan setiap perlakuan dilakukan sebanyak lima kali ulangan. Setiap botol kultur diisi dengan lima biji jeruk JC. Kemudian botol kultur disimpan pada rak kultur. Ruang penyimpanan memiliki suhu ruangan  $\pm$  19-24°C dan intensitas cahaya yang baik untuk pertumbuhan biji.

### Analisis Data

Pengamatan dilakukan terhadap waktu muncul kontaminasi, persentase jenis kontaminan (bakteri dan jamur), persentase eksplan steril dan persentase eksplan hidup pada masing-masing

eksplan setelah 28 hari kultur. Nilai rata-rata dihitung menggunakan software (Microsoft Office Excel Worksheet).

Tabel 1. Perlakuan metode sterilisasi biji jeruk JC

Tahapan	Metode Pertama	Metode Kedua	Metode Ketiga	Metode Keempat
1	Pencucian dengan deterjen selama 3 menit, dibilas dengan air mengalir	Pencucian dengan deterjen selama 3 menit, dibilas dengan air mengalir	Pencucian dengan deterjen selama 3 menit, dibilas dengan air mengalir	Pencucian dengan deterjen 3 menit, dibilas dengan air mengalir
2	Kulit biji dikupas	Kulit biji dikupas	Kulit biji dikupas	Kulit biji dikupas
3	Perendaman tween 80 selama 15 menit, dibilas aquades steril 3 kali	Perendaman tween 80 selama 15 menit, dibilas aquades steril 3 kali	Perendaman tween 80 selama 15 menit, dibilas aquades steril 3 kali	Perendaman tween 80 selama 15 menit, dibilas aquades steril 3 kali
4	Perendaman NaOCl 20% selama 15 menit, dibilas aquades steril 3 kali	Perendaman NaOCl 30% selama 15 menit, dibilas aquades steril 3 kali	Perendaman fungisida selama 15 menit, dibilas aquades steril 3 kali	Perendaman fungisida selama 15 menit, dibilas aquades steril 3 kali
5	Perendaman akohol 90% selama 15 menit	Perendaman akohol 90% selama 15 menit	Perendaman alkohol 90% selama 15 menit	Perendaman NaOCl 30% selama 15 menit
6	Pencucian dengan aquades steril 3 kali	Pencucian dengan aquades steril 3 kali	Pencucian dengan aquades steril 3 kali	Pencucian dengan aquades steril 3 kali
7	-	-	-	Perendaman NaOCl 20% selama 15 menit, dibilas aquades steril 3 kali
8	-	-	-	Perendaman akohol 90% selama 15 menit
9	-	-	-	Pencucian dengan aquades steril 3 kali

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis data menunjukkan metode sterilisasi keempat menghasilkan persentase kontaminasi 47% paling rendah dibandingkan tiga metode sterilisasi lain setelah 20 hari perlakuan yaitu metode pertama 96,67%, metode

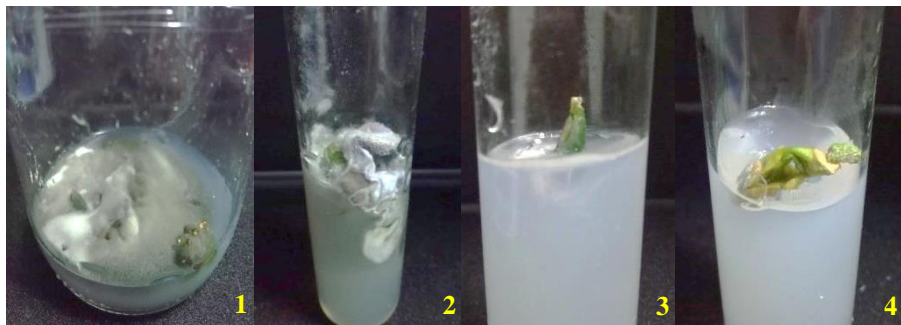
kedua 90% dan metode ketiga 70% (Tabel 2). Kontaminasi mikroba dapat muncul karena sterilisasi yang kurang optimal sehingga menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Hal ini disebabkan karena mikroba berkompetisi dalam hal nutrisi

dengan eksplan. Kontaminasi mikroba juga dapat mempengaruhi kematian jaringan (nekrosis) dan menghambat pertumbuhan tunas maupun akar eksplan. Kondisi steril adalah faktor yang menentukan keberhasilan kultur *in vitro*, sehingga pemilihan metode

sterilisasi yang tepat sangat penting dilakukan optimasi (Natasha dan Restiani, 2019) untuk mendapatkan metode sterilisasi yang efisien dengan persentase kontaminasi rendah dan kelangsungan hidup eksplan yang tinggi (Shukla *et al.*, 2019).

Tabel 2. Pengaruh perlakuan sterilisasi pada kultur *in vitro* biji jeruk JC

Metode	Waktu muncul kontaminasi (HST)	Persentase Jenis Kontaminan (%)		Total Kontaminasi	Persentase eksplan steril (%)	Persentase eksplan hidup (%)
		Bakteri	Jamur			
1	3	60,00 ± 8.24	36,67 ± 3.80	96,67	3,33 ± 0,00	0 ± 0,00
2	6	37,00 ± 5.00	53,00 ± 4.35	90,00	10,00 ± 3,33	33,33 ± 3,16
3	10	40,00 ± 4.22	30,00 ± 1.49	70,00	30,00 ± 3,33	56,00 ± 3,86
4	20	37,00 ± 4.73	10,00 ± 3.33	47,00	53,00 ± 4,08	75,00 ± 2,26



Gambar 1. Kondisi eksplan biji setelah perlakuan sterilisasi (1) dan (2) eksplan terkontaminasi jamur, (3) eksplan terkontaminasi bakteri, (4) eksplan dalam kondisi aseptik.

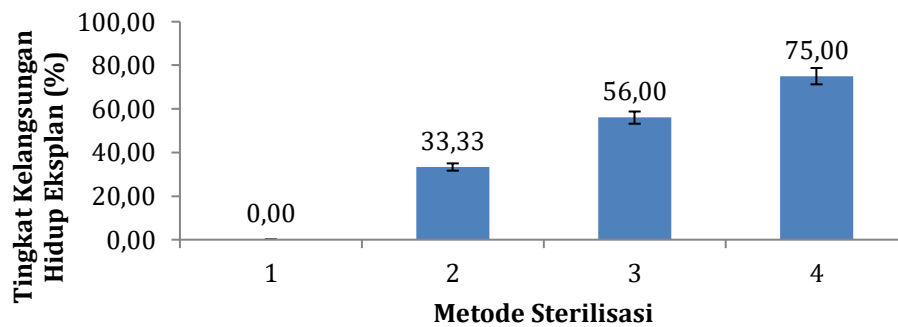
Jenis kontaminasi yang muncul pada eksplan adalah jamur dan bakteri. Pada kontaminasi jamur gejala yang terlihat adanya hifa putih, sedangkan kontaminasi bakteri gejala di sekitar eksplan dan media mengandung lendir (Gambar 1). Menurut Wahyono *et al.* (2021) kontaminasi yang sering terjadi

pada kultur jaringan tanaman mengandung dua jenis kontaminasi yaitu bakteri dan jamur. Jika pada tahap sterilisasi permukaan eksplan tidak berhasil, maka kultur *in vitro* tidak dapat diperoleh (Natasha dan Restiani, 2019).

Untuk membedakan jenis kontaminan jamur atau bakteri dapat

dilihat dari ciri fisik yang tampak pada eksplan dan media kultur. Saat terkontaminasi bakteri, muncul lendir karena bakteri langsung menyerang jaringan tubuh tanaman itu sendiri. Sedangkan jika terkontaminasi jamur

atau fungi, akan muncul hifa jamur pada tanaman yang terserang dan biasanya ditandai dengan adanya garis-garis putih abu-abu (seperti benang) (Wahyono *et al.*, 2021).



Gambar 2. Tingkat kelangsungan hidup eksplan biji jeruk JC pada media MS setelah 28 hari perlakuan metode sterilisasi.

Tingkat kelangsungan hidup eksplan biji jeruk JC (Gambar 2) menunjukkan sterilisasi permukaan paling optimal adalah metode keempat sebesar 75,00% diikuti metode ketiga, metode kedua dan metode pertama masing-masing sebesar 56,00%, 33,33% dan 0%. Teknik sterilisasi dengan metode keempat yaitu pencucian dengan detergen selama 3 menit, perendaman tween 80 selama 15 menit, perendaman fungisida selama 15 menit, perendaman NaClO 30% selama 15 menit yang dilanjut dengan perendaman NaClO 20% selama 15 menit dan perendaman

alkohol 90% selama 15 menit. Sterilisasi merupakan tahap awal pada proses inisiasi kultur *in vitro* sebagai upaya pemusnahan kontaminasi mikroba (bakteri dan jamur) pada eksplan. Sterilisasi pada eksplan dapat dilakukan dengan berbagai macam bahan sterilan. Bahan sterilan yang umumnya digunakan dalam kultur *in vitro* adalah natrium hipoklorit, kalsium hipoklorit, etanol, merkuri klorida, hidrogen peroksida, dan perak nitrat (Mihaljevic *et al.*, 2013). Pada penelitian ini digunakan detergen, tween 80, fungisida, NaClO dan alkohol 90%.

Detergen dan tween 80 umum digunakan pada tahap pra-sterilisasi. Detergen merupakan bahan sterilan yang digunakan untuk menghilangkan lapisan lilin yang melekat pada permukaan eksplan dan mengurangi sebagian mikroba yang mungkin masih menempel pada bagian eksplan (Akhtar *et al.*, 2011). Tween 80 berfungsi sebagai peningkat penetrasi (Akhtar *et al.*, 2011) dan biasanya dicampurkan dengan detergen untuk merendam jenis-jenis eksplan sebelum dilakukan sterilisasi (Surya dan Ismaini, 2021). Fungisida merupakan pestisida yang secara spesifik membunuh atau menghambat pertumbuhan dan perkembangan fungi. Fungisida sangat diperlukan dalam proses sterilisasi, khususnya beberapa eksplan yang berasal dari lapangan (Surya dan Ismaini, 2021). Natrium hipoklorit (NaClO) merupakan desinfektan yang umum digunakan dalam kultur *in vitro*. NaClO bersifat toksik bagi jaringan tanaman sehingga diperlukan konsentrasi yang tepat sebagai agen sterilan (Mahmoud and Al-Ani, 2016). NaClO memberikan hasil yang cukup memuaskan. Konsentrasi rendah 10% menunjukkan persentase kontaminasi tinggi 40%. Peningkatan konsentrasi NaClO hingga 50%

menurunkan persentase kontaminasi 30% (Mahmoud and Al-Ani, 2016). NaClO termasuk bahan sterilisasi dengan kategori lemah/ ringan, sehingga diperlukan persentase yang tinggi dalam penggunaannya (Mahmoud and Al-Ani, 2016). Kesesuaian antara waktu perendaman eksplan dan konsentrasi NaClO perlu diperhatikan karena sifatnya yang fitotoksisitas (Surya dan Ismaini, 2021).

Alkohol adalah senyawa organik yang memiliki gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada atom karbon dan atau atom karbon lain. Alkohol merupakan denaturan protein yang memberikan sifat antimikrobial yang efektif memecah protein dalam mikroba. Alkohol juga merupakan pelarut lipid sehingga dapat merusak membran sel (Adji dkk, 2007). Pada kultur *in vitro*, alkohol dengan konsentrasi 70% dan 90% sering digunakan sebagai salah satu antiseptik dalam proses sterilisasi. Selain digunakan untuk sterilisasi eksplan, alkohol juga digunakan sebagai salah satu bahan untuk sterilisasi alat dan lingkungan kerja pada kegiatan kultur *in vitro* (Surya dan Ismaini, 2021).



## SIMPULAN

Sterilisasi permukaan pada biji jeruk JC optimal diperoleh pada metode keempat yaitu pencucian dengan detergen selama 3 menit, perendaman tween-80 selama 15 menit, perendaman fungisida selama 15 menit, perendaman NaOCl 30% selama 15 menit yang dilanjutkan dengan perendaman NaOCl 20% selama 15 menit dan perendaman alkohol 90 % selama 15 menit. Metode keempat menghasilkan persentase eksplan steril 53% dengan persentase eksplan hidup 75%.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Universitas Hasanuddin Tahun Anggaran 2022 melalui Skim Penelitian Dosen Penasehat Akademik (PDPA) dengan nomor kontrak 1476/UN4.22/PT.01.03/2022. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

## DAFTAR PUSTAKA

Acevedo, B., Ricciardi, G., Martinez, N., Lorenzo, D., and Dellacassa, E. (2012). Chemical Profiles of

Rangpur lime (*Citrus limonia*) Peel Oils of Different Cultivars of Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 24(2): 131–136.

Adenaika, O., and Abakpa, G. O. (2021). Antioxidant Compounds and Health Benefits of Citrus Fruits. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, 13(2): 65–74.

Adji, D., Zuliyanti dan Larashanty, H. (2007). Perbandingan Efektivitas Sterilisasi Alkohol 70%, Inframerah, Otoklaf dan Ozon Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus subtilis*. *J. Sain Vet*, 25(1): 17-24.

Akhtar, N., Rehman, M.U., Khan, H.M.S., Rasool, F., Saeed, T., and Murtaza, G. (2011). Penetration Enhancing Effect of Polysorbate 20 and 80 on the In Vitro Percutaneous Absorption of L-Ascorbic Acid. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3): 281-288.

Almeida, L. S., Sousa, E. M. R., da Silva, P. H., Oliveira, T. M., de Almeida, A. A. F., Filho, M. A. C., Soares Filho, W. D. S., and Gesteira, A. da S. (2019). The Morphological Study and Gene Expression Analysis in Citrus Hybrid with a Short Juvenile Period. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 19(3): 262-268.

Andrini, A., Suharsi, T. K., dan Surahman, M. (2013). Studi Poliembrioni dan Penentuan Tingkat Kemasakan Fisiologis Benih *Japansche Citroen* (JC) Berdasarkan Warna Kulit Buah. *Jurnal Hortikultura*, 23(3): 195-202.

Aseesh, P., and Sushma, T. (2016). Efficient Micropropagation of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck from Cotyledonary Explants Suitable for the Development of Commercial

- Variety. *African Journal of Biotechnology*, 15(34): 1806–1812.
- Ayu, Y. P. K., Arry, S., Mudji, S., dan Lilik, S. (2017). Studi Poliembriologi pada Benih Batang Bawah Jeruk *Japansche Citroen* (JC). *Jurnal Produksi Tanaman*, 5(9): 1497-1504.
- Berutu, F. S., Dita, A., dan Darmawan, S., 2018. Pertumbuhan Tunas Citrumelo (*Citrus paradise* Macfadon cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) pada Berbagai Konsentrasi Nutrisi untuk Pertumbuhan Lambat (*Slow Growth*) secara *In Vitro*. *Jurnal Produksi Tanaman*, 6(1): 83-91.
- Eed, A. M., Begum, H., Sivaramakrishnan, S., Silva, J. A. T. da, Amrender-Reddy, S., and Al-gabal, A. Q. (2011). Global Science Books Rapid Protocol for *In Vitro* Multiplication of *Citrus limonia* Osbeck Rootstock. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 5(1): 78–82.
- Fitriani, Y., Wijana, G., dan Darmawati, I. A. P. (2019). Teknik Sterilisasi dan Efektivitas 2,4-D Terhadap Pembentukan Kalus Eksplan Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) *In Vitro*. *J. Agric. Sci. and Biotechnol.*, 8(1): 41-52.
- Gerolino, E. F., Talita, P. C. C., Arquimedes, S. F., Eliezer, R. S., Regina, A. C. G., and Arildo, J. B. D. O. (2015). Evaluation of Limonoid Production in Suspension Cell Culture of *Citrus sinensis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 25: 455-461.
- Hanif, Z. (2020). *Pengembangan Agribisnis Jeruk Nusantara*. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika.
- Hashim, S. N., Ghazali, S. Z., Sidik, N. J., Chia-Chay, T., and Saleh, A. (2021). Surface Sterilization Method for Reducing Contamination of *Clinacanthus nutans* Nodal Explants Intended for *In-vitro* Culture. *E3S Web of Conferences*, 306: 1-8.
- Jayanti, M. A. D., Sugiyatnto, A., Roviq, M., dan Magfhoer, D. (2015). Kompatibilitas Tujuh Varietas Calon Interstock Tanaman Jeruk pada Batang Bawah *Japansche Citroen* (JC). *Jurnal Produksi Tanaman*, 10(10): 1-10.
- Jenks, M. A., Hasegawa, P. M., and Jain, S. M. (2007). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer.
- Khan, U. M., Sameen, A., Aadil, R. M., Shahid, M., Sezen, S., Zarrabi, A., Ozdemir, B., Sevindik, M., Kaplan, D. N., Selamoglu, Z., Ydyrys, A., and Anitha, T. (2021). Citrus Genus and Its Waste Utilization: A Review on Health-Promoting Activities and Industrial Application. *Review Article*, 1: 1-17.
- Mahmoud, S. N., and Al-Ani, N. K. (2016). Effect of Different Sterilization Methods on Contamination and Viability of Nodal Segments of *Cestrum nocturnum* L. *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)*, 4(1): 4-9.
- Meghwal, P. R., Sharma, H. C., and Singh, S. K. (2000). Effect of Surface Sterilizing Agents on *In Vitro* Culture Establishment of Guava (*Psidium guajava* L.). *J. Appl.Hort*, 2(2): 94-95.
- Mihaljević, I., Dugalić, K., Tomaš, V., Viljevac, M., Pranjić, A., Čmelik, Z., Puškar, B., and Jurković, Z. 2013. *In Vitro* Sterilization Procedures for Micropropagation of ‘oblačinska’ Sour Cherry.

- Journal of Agricultural Sciences*, 58(2): 117-126.
- Minipara, D., Hareshkumar, D., Ghansyam, P., Subhash, N., and Sushil, K. (2021). Identification of Best Surface Sterilization Treatment and Control of Endophtic Bacterial Contamination in *Annona squamosal* L. *International Journal of Plant & Soil Science*, 29(6): 1-10.
- Natasha, K., and Restiani, R., 2019. Optimasi Sterilisasi Eksplan pada Kultur *In Vitro* Ginseng Jawa (*Talium paniculatum*). *Prosiding Symbion (Symposium on Biology Education), Prodi Pendidikan Biologi, FKIP, Universitas Ahmad Dahlan (30 Agustus 2019)*. 87-95.
- Neliyati, N., Lizawati, L., and 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: 1-6.
- Oksana, Elfi, R., & Syamsul. (2011). Peranan Berbagai Macam Media Tumbuh Bagi Pertumbuhan Stek Daun Jeruk JC (*Japansche Citroen*) dengan Beberapa Konsentrasi BAP. *Jurnal Penelitian*, 11(1): 1-8.
- Rasud, Y., Ulfah, S., dan Baharia. (2015). Pertumbuhan Jeruk Manis (*Citrus sinensis* L.) dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi Sitokinin Secara *In Vitro*. *Jurnal Agroland*, 3(22): 197-204.
- Shukla, S., Singh, M., Kumar, A., Rajbhar, Y., Kumar, M., and Singh, S. P. (2019). Effects of Surface Sterilization Agents Under *In Vitro* Culture of Banana (*Musa paradisiaca* L.) Variety "Udhayam". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1): 843-846.
- Sugiyatno, A., 2017. *Potensi Penggunaan Beberapa Varietas Batang Bawah Sebagai Interstock untuk Memacu Pertumbuhan Benih Jeruk*. Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika. Malang.
- Surya, M. I., dan Ismaini, L. (2021). Perbandingan Metode Sterilisasi untuk Perbanyakkan *Rubus rosifolius* Secara *In Vitro*. *Al-Kaunyah: Jurnal Biologi*, 14(1): 127-137.
- Wahyono, N. D., Hasanah, N., and Nurprahastani, N. (2021). Optimization of Sterilization Techniques and Effects of Coconut Water for the Induction of Shoots of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Proceedings of The 3rd International Conference on Food and Agriculture*, 2021.
- Yao, N., Bi, F., Wang, Y., Jr, G. F., Hyuk Suh, J., Tang, X., Zhang, Y., and Gmitter Jr, F. G. (2021). Metabolomic Analysis Provides New Insight Into Tolerance of Huanglongbing in Citrus. *Front. Plant Sci*, 12: 710598.