

Pengaruh Kolkisin terhadap Keragaman Fenotipe secara *In Vitro* pada Tanaman Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

The Effect of Colchicine on In Vitro Phenotypic Diversity in Stevia Plants (Stevia rebaudiana Bertoni)

Desty Novitasari^{1*}, Chatimatun Nisa², Nofia Hardarani²

¹ Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lambung Mangkurat, Indonesia.

² Program Studi Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Lambung Mangkurat, Indonesia.

*email pengarang korespondensi: dnovi1611@gmail.com

Diterima: 10 Agustus 2023; Diperbaiki: 14 Oktober 2023; Disetujui: 13 November 2023

How to Cite: Novitasari, D., Nisa, C., & Hardarani, N. (2023). Pengaruh Kolkisin terhadap Keragaman Fenotipe secara *In Vitro*. *Agroekotek View*, Vol 6(3), halaman 46-53.

ABSTRACT

Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) is a plant that produce low-calorie natural sweeteners that can be used as a substitute for sugar cane for people with Diabetes Mellitus (DM) and obesity. Improvements to the properties of stevia in order to produce low-calorie natural sweeteners are mostly carried out in the laboratory using in vitro techniques. The media used were Murashige and Skoog with the addition of IAA dan BAP. This study aims to determine the phenotypic diversity in stevia with the addition of various concentrations and duration of immersion of the mutagen in the form of colchicine and to find the best interaction treatment used. The study was in the form of a two-factor randomized block design, the first factor being various concentrations of colchicine, namely $k_0 = 0\%$ as control, $k_1 = 0,03\%$ and $k_2 = 0,05\%$. The second factor was the duration of colchicine immersion, namely $t_1 = 24$ hours and $t_2 = 48$ hours. The result of this study indicate that the interaction of concentration and duration of colchicine immersion has a significant effect on the percentage of contamination with a concentration of 0,05% treatment and 24 hours immersion as the best contamination percentage treatment of 8,33%. The highest percentage of live explants was treated with a 24 hours immersion period of 8,34% and the lowest percentage was found in the 48 hour immersion treatment at 0%. The lowest percentage of browning was in the 0,05% colchicine concentration treatment at 58,33% and the highest percentage was found in the 0,03% concentration colchicine treatment at 93,75%.

Copyright © 2023 Agroekotek View. All rights reserved.

Keywords:

In Vitro; stevia; phenotypic diversity; colchicine

Pendahuluan

Meningkatnya penderita DM dikarenakan kebutuhan gula yang dikonsumsi tidak terkontrol sehingga terjadi peningkatan gula darah (Wahyuni, 2016). Pengobatan dan pemeliharaan penderita DM memerlukan dana yang sangat besar tiap tahunnya karena semakin banyak obat paten yang harus selalu dikonsumsi. Penggunaan bahan alam oleh masyarakat semakin meningkat dikarenakan murah, mudah didapat dan

banyak anggapan bahwa penggunaan bahan alam memiliki efek samping jauh lebih rendah dibandingkan obat kimia. Salah satu tanaman yang dipercaya dapat menurunkan kadar glukosa darah saat ini, yaitu stevia. Pengembangan stevia sebagai penghasil gula alternatif diharapkan dapat menambah pasokan bahan pemanis nasional guna membantu program swasembada gula, di samping menyediakan pemanis alami yang sehat (Sumaryono, 2011).

Stevia tidak dapat tumbuh dan berproduksi dengan baik pada semua lokasi di Indonesia. Lahan harus berada pada ketinggian 500–1000 Mdpl dengan suhu 14-27 °C, curah hujan antara 1600-1850 mm/tahun. Memerlukan tanah dengan pH 5-7. Umumnya sensitif terhadap kekeringan khususnya pada saat awal pertumbuhan (Sumaryono, 2011). Sehingga perlu melakukan metode penanaman lain agar dapat mengatasi masalah tersebut.

Salah satu teknologi yang dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah teknik kultur *in vitro*. Kultur *in vitro* merupakan teknik yang ideal untuk memperbanyak secara cepat individu tanaman unggul yang jumlahnya masih terbatas. Teknik tersebut dapat digunakan mengingat stevia tidak dapat tumbuh pada semua lokasi di Indonesia. Variasi somaklonal dapat digunakan sebagai sumber keragaman genetik untuk sifat-sifat yang berguna (*useful traits*) untuk tujuan pemuliaan tanaman. Variasi somaklonal juga merupakan sarana alternatif dalam pemuliaan tanaman untuk menciptakan varietas baru yang resisten terhadap penyakit, herbisida, toleran terhadap kondisi lingkungan ekstrim seperti kekeringan, pH rendah dan memperbaiki kualitas hasil (Larkin dan Scowcroft, 1981; Griga, 1995; Ignacimuthu, 1997; Kuksova, 1997).

Variasi somaklonal dapat dilakukan dengan teknik mutasi menggunakan mutagen fisika seperti sinar gamma atau mutagen kimia seperti: EMS, Dietil Sulfat (DES), Metil Metan Sulfonat (MMS), hidroksi amina, dan kolkisin. Kolkisin adalah jenis mutagen kimia umum yang digunakan untuk meningkatkan keragaman genetik berupa penggandaan kromosom (Damayanti, 2012). Dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya didapatkan bahwa kolkisin dapat meningkatkan keragaman genetik pada stevia. Perendaman stevia pada kolkisin dengan dosis 0,04% selama 48 jam dapat meningkatkan bobot basah serta bobot kering planlet stevia *in vitro* (Sinta, 2018).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh interaksi konsentrasi dan lama perendaman saja yang ditimbulkan oleh kolkisin pada keragaman fenotipe tanaman stevia serta Mengetahui interaksi antara konsentrasi dan lama perendaman kolkisin yang memberikan hasil terbaik terhadap keragaman fenotipe tanaman stevia. Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai acuan dalam pemuliaan secara *in vitro* untuk tanaman stevia. Selain itu sebagai dasar penelitian untuk meningkatkan keragaman genetik stevia pada beberapa peubah yang ditempuh secara bioteknologi.

Bahan dan Metode

Bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah buku daun stevia, media MS, ZPT, sterilan, aquades, kolkisin, cawan petri, botol tanam, *cling wrap*, labu ukur, gelas ukur, gelas Erlenmeyer, pipet ukur, neraca Ohaus, pH meter, autoklaf, oven, LAF, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, alumunium foil. Penelitian ini berlangsung di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru selama empat bulan yakni dari bulan Maret-Juli 2021.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial 2 faktor. Faktor pertama adalah beberapa konsentrasi kolkisin (K), yaitu k_0 = Kolkisin 0 % (kontrol), k_1 = Kolkisin 0,03 % dan k_2 = Kolkisin 0,05 %. Faktor kedua berupa lama perendaman bahan tanam (T), yaitu t_1 = 24 jam dan t_2 = 48 jam. Dari percobaan

tersebut terdapat 6 kombinasi perlakuan dengan 4 ulangan, pada setiap satuan percobaan terdiri 6 botol tanam sehingga diperoleh jumlah keseluruhan 144 botol percobaan.

Pelaksanaan penelitian dimulai dengan pembuatan media. Media dasar yang digunakan adalah media MS. Pembuatan media MS terdiri dari bahan-bahan senyawa unsur hara makro, unsur hara mikro, Fe-Na EDTA, vitamin, myo-inositol, ZPT, aquades yang ditambahkan bahan pematat berupa agar-agar. Pada penelitian ini ditambahkan ZPT berupa IAA 1 ppm dan BAP 1 ppm. Selanjutnya adalah sterilisasi media. Botol tanam yang telah berisi media disterilkan dengan menggunakan metode sterilisasi basah, yaitu menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 17,5 psi selama 15 menit. Kemudian dimasukkan dalam ruang steril (ruang inkubasi) dengan temperature 25 °C. Sebelum digunakan, LAF disterilkan dulu dengan mengusapkan atau menyemprotkan alkohol 70% pada dindingnya dan didiamkan dulu selama ± 30 menit. Bahan tanam yang akan digunakan merupakan buku daun stevia. Sebelum dilakukan penanaman, eksplan terlebih dahulu disterilkan. Proses sterilisasi eksplan dimulai dengan mencuci bersih eksplan dengan air mengalir, lalu dibersihkan menggunakan detergen selama 2 menit kemudian dibilas sebanyak tiga kali. Pada bilasan ketiga, air bilasan dicampur tween 20 sebanyak 2 tetes dan dibilas. Setelah itu eksplan digojog dengan fungisida 6% dan bakterisida 3% masing-masing selama 1 jam. Eksplan direndam sesuai dengan perlakuan dosis kolkisin, yaitu kontrol 0 % (k_0), 0,03% (k_1), dan 0,05% (k_2). Kemudian eksplan disterilisasi di dalam LAF. Di dalam LAF eksplan dibilas dengan aquades 1 kali 2 menit lalu digojog menggunakan alkohol 70% selama 2 menit dan dibilas dengan aquades 1 kali 2 menit. Kemudian digojog menggunakan sublimat 0,1% selama 3 menit dan dibilas dengan aquades 1 kali 2 menit. Selanjutnya digojog menggunakan Bayclin 5% selama 10 menit dan dibilas menggunakan aquades 3 kali 2 menit. Penanaman dilakukan pada eksplan yang telah direndam selama 24 jam terlebih dahulu, kemudian penanaman dilanjutkan pada eksplan yang telah direndam selama 48 jam. Eksplan dipotong sepanjang 1 cm lalu ditanam di dalam botol kultur dengan posisi tegak. Satu botol berisi satu eksplan buku. Eksplan yang sudah ditanam diinkubasi di ruang inkubator yang disinari dengan suhu 25-28 °C dan lampu TL 1000-3000 lux. Subkultur dilakukan setiap 4 minggu setelah tanam (MST). Tujuan subkultur adalah agar eksplan tetap mendapatkan unsur hara dan nutrisi untuk pertumbuhannya dalam proses kultur jaringan.

Parameter pengamatan pada penelitian ini adalah persentase eksplan hidup (%), persentase kontaminasi (%), waktu muncul kontaminasi (hst) dan persentase *browning* (%). Data yang telah diperoleh dianalisis terlebih dahulu dengan uji kehomogenan ragam Bartlett. Jika data homogen dilanjutkan dengan analisis ragam (ANOVA), namun jika data tidak homogen dilakukan transformasi data dan selanjutnya dilakukan analisis ragam. Apabila perlakuan berpengaruh nyata atau sangat nyata akan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) atau HSD (*Honestly Significance Different*) pada taraf nyata 5 %.

Hasil dan Pembahasan

Rekapitulasi Hasil Sidik Ragam

Berdasarkan uji Bartlett, uji kehomogenan pada persentase kontaminasi dan persentase eksplan hidup menunjukkan ragam homogen. Rekapitulasi hasil sidik ragam pengaruh konsentrasi kolkisin, lama perendaman dan interaksinya terhadap variabel yang diamati dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rekapitulasi hasil sidik ragam pengaruh konsentrasi kolkisin dengan lama perendaman berbeda terhadap multiplikasi tunas stevia secara *in vitro*

Variabel Pengamatan	Perlakuan			KK(%)
	Konsentrasi	Lama Perendaman	Interaksi	
Persentase eksplan hidup	tn	*	tn	26,26
Persentase kontaminasi	*	tn	tn	29,92
Persentase browning	**	tn	tn	28,34
Waktu muncul kontaminasi	tn	tn	tn	29,62

Keterangan: ** = Berpengaruh sangat nyata, * = Berpengaruh nyata, tn = Tidak berpengaruh nyata, KK = Koefisien keragaman

Berdasarkan hasil uji Bartlett dengan taraf 5% pada variabel persentase eksplan hidup, persentase kontaminasi dan persentase *browning* menunjukkan ragam data homogen sehingga dilakukan analisis ragam. Pada penelitian ini, tidak adanya keragaman fenotipe disebabkan oleh jumlah eksplan yang hidup dan bertahan sangat sedikit.

Persentase Eksplan Hidup

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa lama perendaman menunjukkan pengaruh signifikan terhadap persentase eksplan hidup. Hasil uji BNJ pengaruh lama perendaman terhadap persentase eksplan hidup dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 2. Rata-rata persentase eksplan hidup (%) pada beberapa lama perendaman berbeda

Lama Perendaman	Jumlah Eksplan Hidup	Persentase Eksplan Hidup (%)
24 jam	0,08±13,30	8,33 a
48 jam	0,00±0,00	0,00 b

Keterangan: - Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan bahwa perlakuan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf 5%
 - Angka merupakan rerata dan standar deviasi dari 4 ulangan

Berdasarkan Tabel 2 dapat diketahui bahwa persentase eksplan hidup yang didapatkan tergolong kecil dengan persentase terbesar terdapat pada perlakuan lama perendaman kolkisin selama 24 jam baik untuk perlakuan konsentrasi kolkisin 0%, 0,03% dan 0,05%, yaitu sebesar 8,33%. Sedangkan pada perlakuan lama perendaman 48 jam, tidak terdapat satupun eksplan yang hidup yang ditunjukkan dengan persentase eksplan hidup sebesar 0%. Perlakuan lama perendaman tersebut berbeda nyata terhadap perlakuan lama perendaman selama 48 jam. Eksplan yang dikategorikan sebagai eksplan hidup jika secara visual eksplan menunjukkan hijau, tidak terkontaminasi, *browning* dan tidak menunjukkan perubahan warna menuju coklat kering (Rodinah *et al.* 2016).

Pengamatan eksplan hidup dilakukan dengan mengamati eksplan secara visual selama 90 hari. Eksplan yang digunakan pada penelitian ini diambil dari bagian buku daun tanaman stevia. Eksplan yang hidup ada 2 jenis, yaitu tunas dan kalus. Eksplan yang bertunas terdapat pada perlakuan konsentrasi kolkisin 0,03 % dan lama perendaman 24 jam (k_{1t_1}). Sedangkan eksplan yang membentuk kalus terdapat pada perlakuan konsentrasi kolkisin 0% (kontrol) dan lama perendaman 24 jam (k_{0t_1}), dan konsentrasi 0,05% dan lama perendaman 24 jam (k_{2t_1}).

Eksplan membentuk kalus yang bertahan hingga 12 mst terdapat pada konsentrasi 0% atau kontrol dan lama perendaman 24 jam (k_{0t_1}). Hal ini dikarenakan kalus pada perlakuan konsentrasi kolkisin 0,05% dan lama perendaman 24 jam (k_{2t_1}) mengalami kematian pada minggu ke-8. Terjadinya kematian eksplan tersebut diduga disebabkan oleh gagalnya sel untuk menyesuaikan kondisi biologi sel dengan jumlah kromosom berbeda setelah terpapar kolkisin.

Persentase Kontaminasi

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa konsentrasi menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap persentase kontaminasi. Hasil uji BNJ pengaruh konsentrasi terhadap persentase kontaminasi dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 3. Rata-rata persentase kontaminasi (%) pada beberapa konsentrasi kolkisin berbeda

Konsentrasi Kolkisin	Jumlah Eksplan Terkontaminasi	Persentase Kontaminasi (%)
0 %	37,50±23,15	37,50 a
0,03%	16,67±8,91	16,67 b
0,05%	12,50±14,77	12,50 b

Keterangan: - Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan bahwa perlakuan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf 5%
- Angka merupakan rerata dan standar deviasi dari 4 ulangan

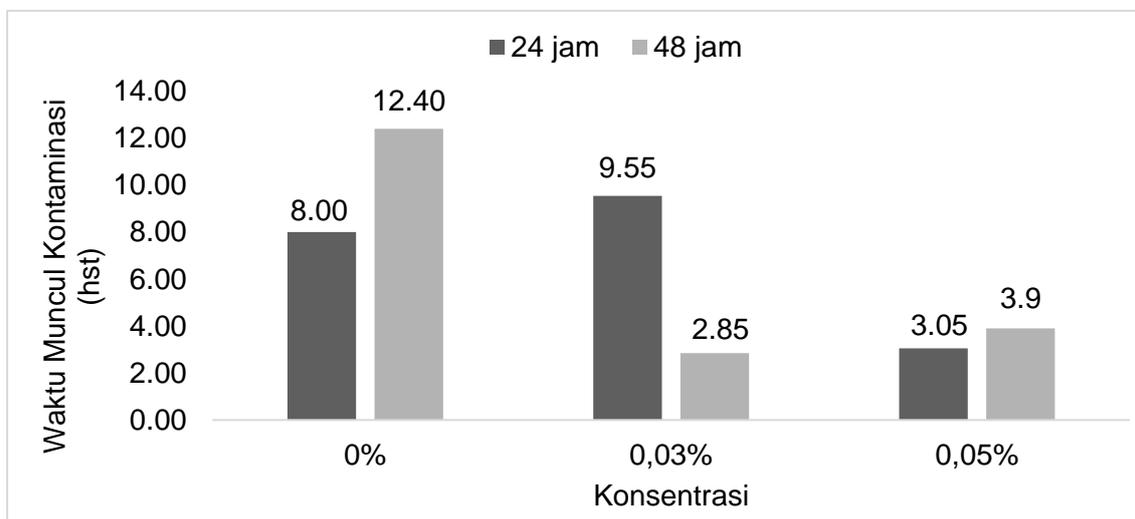
Berdasarkan pada tabel 3, dapat diketahui bahwa persentase kontaminasi terendah terdapat pada perlakuan konsentrasi kolkisin 0,05%, yaitu sebesar 12,50%. Sedangkan persentase kontaminasi tertinggi terdapat pada perlakuan konsentrasi kolkisin 0% sebesar 37,50%. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan yang tidak diberi perlakuan konsentrasi kolkisin memberikan persentase yang lebih besar daripada yang diberi perlakuan konsentrasi kolkisin.

Kontaminasi diduga disebabkan oleh faktor lingkungan, manusia, eksplan dan media, serta genotipe tanaman yang rentan terkena kontaminasi. Kontaminasi terjadi karena lingkungan yang tidak steril, kontaminan sudah memenuhi seluruh botol kultur atau eksplan yang tertutup kontaminasi (Gunawan, 2007). Sumber kontaminasi dapat berasal dari eksplan tumbuhan, organisme kecil yang masuk ke dalam media, alat yang tidak steril dan lingkungan kerja yang kotor (Gunawan, 1989 dalam Susilowati & Listyawati, 2001). Lebih besarnya persentase kontaminasi pada perlakuan kontrol dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi 0,03% dan 0,05% diduga disebabkan oleh kolkisin yang bersifat toksik dan karsinogenik. Sifat kolkisin tersebut diduga meracuni kontaminan sehingga tidak dapat berkembang.

Kontaminasi yang terjadi berupa munculnya fungi dan bakteri. Eksplan yang terkontaminasi bakteri berasal dari kontaminan internal yang terlihat dari dasar eksplan di dalam media kultur. Sementara itu, eksplan juga terkontaminasi fungi yang awalnya muncul pada eksplan lalu mengkontaminasi media hingga menutupi seluruh area botol kultur, ada juga yang muncul dari media lalu mengkontaminasi hingga menutupi seluruh area botol kultur. Kontaminasi tertinggi disebabkan oleh bakteri dengan persentase sebesar 64,57%, sedangkan untuk fungi sebesar 35,43%.

Waktu Muncul Kontaminasi

Pada variabel waktu muncul kontaminasi dilakukan uji non-parametrik Friedman yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan antara kedua faktor perlakuan pada waktu muncul kontaminasi. Grafik rata-rata waktu muncul kontaminasi pada beberapa konsentrasi kolkisin dan lama perendaman berbeda dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Rata-rata waktu muncul kontaminasi pada konsentrasi kolkisin dan lama perendaman berbeda

Dari gambar 5 dapat dilihat bahwa waktu muncul kontaminasi tercepat terdapat pada eksplan yang diberi perlakuan konsentrasi kolkisin 0,03% dengan lama perendaman selama 48 jam. Sedangkan waktu muncul kontaminasi terlama terdapat pada perlakuan konsentrasi kolkisin 0% dengan lama perendaman selama 48 jam. Hasil tersebut menunjukkan bahwa waktu muncul kontaminasi tercepat dan terlama terdapat pada perlakuan lama perendaman yang sama, yaitu 48 jam.

Munculnya kontaminasi tercepat dan terlama pada perlakuan lama perendaman selama 48 jam diduga dipengaruhi oleh kondisi rak kultur dan botol kultur yang kurang steril serta kontaminan yang sudah ada didalam botol kultur maupun kontaminan yang masih menempel pada eksplan meskipun telah disterilkan. Menurut Rahmawati & Lukmana, (2019) kecepatan kontaminasi dipengaruhi oleh kondisi ruang inkubasi yang kurang steril, teknis sterilisasi eksplan dan faktor genetik dari eksplan itu sendiri.

Persentase *Browning*

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa konsentrasi kolkisin memberikan pengaruh yang signifikan terhadap persentase *browning*. Hasil uji BNJ pengaruh konsentrasi kolkisin terhadap persentase *browning* dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata persentase *browning* (%) pada beberapa konsentrasi kolkisin berbeda

Konsentrasi Kolkisin	Jumlah Eksplan <i>Browning</i>	Persentase <i>Browning</i> (%)
0 %	0,83±15,43	83,33 a
0,03%	0,94±8,63	93,75 a
0,05%	0,58±23,57	58,33 b

Keterangan: - Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan bahwa perlakuan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf 5%
- Angka merupakan rerata dan standar deviasi dari 4 ulangan

Pada tabel 4 memperlihatkan persentase *browning* terjadi pada semua perlakuan konsentrasi kolkisin dengan persentase tertinggi terdapat pada perlakuan konsentrasi kolkisin 0,03% (k_2), yaitu sebesar 93,75%. Walaupun tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi kolkisin 0%. Perlakuan konsentrasi kolkisin 0,05% (k_3) menunjukkan persentase *browning* terkecil sebanyak 58,33%. Perlakuan tersebut berbeda nyata terhadap perlakuan konsentrasi kolkisin 0% dan 0,03%.

Pada penelitian ini, munculnya *browning* terjadi pada minggu pertama. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan stevia pada penelitian ini memiliki laju *browning* yang cepat sehingga eksplan terhambat dalam menerima nutrisi yang terdapat dalam media. Menurut Setiawan *et al.* (2014), eksplan yang mengalami *browning* akan terhambat perkembangannya lalu menyebabkan kematian sel secara sistemik. Apabila sel telah mengalami kematian maka tidak akan diperoleh sel yang aktif membelah.

Ditambah dengan adanya perlakuan konsentrasi kolkisin yang akan menghambat pertumbuhan eksplan jika diberikan dalam dosis yang tinggi. Dengan demikian tingkat kematian eksplan oleh *browning* menunjukkan persentase besar daripada persentase yang terjadi pada penelitian Kariena (2019) yang meneliti tentang sterilan pada eksplan stevia, menghasilkan persentase *browning* sebesar 17%. Sedangkan pada penelitian Sari (2019) yang meneliti tentang ZPT pada eksplan stevia menunjukkan persentase tertinggi *browning* sebesar 60% dan terendah sebesar 11,3%.

Lebih besarnya persentase *browning* pada perlakuan konsentrasi kolkisin 0,03% terhadap persentase *browning* pada konsentrasi 0,05% disebabkan oleh banyaknya eksplan pada perlakuan konsentrasi kolkisin 0,05% mengalami perubahan warna yang awalnya seperti mengalami pencokelatan (*browning*) kemudian menjadi putih (nekrosis) dan tidak menunjukkan perkembangan apapun hingga akhir penelitian. Diduga besarnya konsentrasi kolkisin dapat mengganggu pertumbuhan dan perkembangan eksplan stevia.

Kesimpulan

Konsentrasi dan lama perendama kolkisin tidak memberikan pengaruh nyata terhadap keragaman fenotipe tanaman stevia. Tidak adanya interaksi yang terjadi antara konsentrasi kolkisin dan lama perendaman terhadap persentase eksplan hidup, persentase kontaminasi, waktu muncul kontaminasi dan persentase *browning*.

Daftar Pustaka

Damayanti, F., Roostika, I., & Samsurianto, S. (2012). Induksi Keragaman Somaklonal Tanaman Kantong Semar (*Nepenthes Mirabilis*) Dengan Mutagen Kimia Kolkisin Secara in Vitro. In *Prosiding Seminar Biologi* (Vol. 9, No. 1).

- Griga, M., Stejskal, J., & Beber, K. (1995). Analysis of tissue culture-derived variation in pea (*Pisum sativum* L.)—preliminary results. In *The Methodology of Plant Genetic Manipulation: Criteria for Decision Making* (pp. 335-339). Springer, Dordrecht.
- Gunawan, I. (2007). *Perlakuan sterilisasi eksplan anggrek kuping gajah (Bulbophyllum beccarii Rchb. f) dalam kultur in vitro*.
- Ignacimuthu, S. (1997). *Plant Biotechnology*. Science Publishers Inc. London.
- Kuksova, V. B., Piven, N. M., & Gleba, Y. Y. (1997). Somaclonal variation and in vitro induced mutagenesis in grapevine. *Plant cell, tissue and organ culture*, 49(1), 17-27.
- Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied genetics*, 60(4), 197-214.
- Rahmawati, L., & Lumakna, M. (2019). Pengaruh Lama Perendaman Sterilisasi Eksplan Daun Karet (*Hevea brasiliensis*) secara In Vitro. *Ziraa'ah Majalah Ilmiah Pertanian*, 44(3), 301-308.
- Rodinah, R., Razie, F., Naemah, D., & Fitriani, A. (2016). Respon Bahan Sterilan Pada Eksplan Jelutung Rawa (*Dyra Lowii*). *Jurnal Hutan Tropis*, 4(3), 240-245.
- Sinta, M. M., Wiendi, N. M. A., & Aisyah, S. I. (2018). Induksi mutasi *Stevia rebaudiana* dengan perendaman kolkisin secara in vitro. *Jurnal Menara Perkebunan*, 86(1), 1-10.
- Sumaryono. (2011). *Petunjuk Teknis Budidaya Tanaman Stevia*. Pusat Penelitian & Bioindustri Indonesia. Bogor.
- Wahyuni, F. (2016). *Ekstraksi Daun Stevia (Stevia rebaudiana) Menggunakan Microwave*.