

Induksi Tunas Tanaman Rasberi Hitam (*Rubus occidentalis* L.) Melalui *Direct Organogenesis* Secara *In Vitro*

LUH PUTU SUGIARI
MADE SRITAMIN^{*)}
RINDANG DWIYANI

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana

Jl. PB. Sudirman Denpasar 80231 Bali

^{*)}Email: madesritamin@gmail.com

ABSTRACT

Induction of Black Raspberry Buds (*Rubus occidentalis* L.) Through Direct Organogenesis In Vitro. Supervised

Black Raspberry plants are sources of various bioactive compounds such as phenolic compounds or phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, flavonols, and tannins that are used as medicine. Black Raspberry also have a wide market share, the price reaches Rp 200,000 per kg. Propagation of black raspberry in a conventional way requires a long time. This study aims to obtain black raspberry seedlings in a relatively short time and large quantities through direct organogenesis in vitro. This research was divided into two, namely research on the sterilization method and the effect of growth regulators with six treatments. The data were analyzed descriptively. The results of this study indicated that sterilization using tween 20 and vitamin C could reduce the occurrence of contamination and browning in explants respectively by 33.3% and 100%. The used of MS media + 2 ppm BAP + 150 ml coconut water + 0.01 ppm NAA (K4) treatment showed a response of growth of shoots and leaves on the plantlet of 100%.

Keywords: *black raspberry, sterilization method, growth regulatory substances*

1. Pendahuluan

1.1. Latar Belakang

Tanaman rasberi hitam (*Rubus occidentalis* L.) atau yang biasa disebut *blackcap* pertama kali ditemukan pada tahun 1830 di Amerika Utara. Tanaman dalam famili *Rosaceae* mencakup stroberi, rasberi hitam, rasberi merah, dan aprikot. Rasberi hitam dapat dimanfaatkan sebagai obat dari berbagai macam penyakit, karena merupakan sumber dari berbagai senyawa bioaktif seperti senyawa fenolik yakni asam fenolik, flavonoid, antosianin, flavanol, dan tannin, karatinoid yang terlihat secara langsung dari warna ungu kehitaman pada buahnya. Penelitian yang pernah dilakukan menunjukkan flavonoid dari rasberi hitam bermanfaat sebagai anti oksidan, dan anti inflamatori (De Souza *et al.*, 2014). Karena potensi tersebut, rasberi hitam sangat

potensial untuk dikembangkan menjadi salah satu tanaman yang digunakan untuk mengobati penyakit kanker.

Perbanyakan rasberi hitam secara konvensional menggunakan biji memerlukan waktu yang cukup lama hingga tanaman dapat menghasilkan buah, yakni sekitar 7 bulan hingga siap dipindahkan ke lahan. Sedangkan stek tanaman rasberi hitam akan mengganggu proses pembentukan buah pada induk tanaman, ditambah dengan semakin seringnya tanaman di stek pertumbuhan vegetatif akan semakin cepat dan dapat menurunkan produktifitas buah rasberi hitam. Melihat kondisi tersebut, perlu adanya perbanyakan bibit rasberi hitam, salah satu alternatif yang dapat dilakukan dengan menggunakan teknik kultur jaringan.

Perbanyakan tanaman melalui teknik kultur jaringan secara *in vitro* memiliki peluang besar untuk menghasilkan jumlah bibit tanaman yang banyak dalam waktu relatif singkat sehingga menjadi lebih ekonomis. Teknik perbanyakan ini dapat dilakukan tanpa tergantung musim (Hambali *et al.*, 2006). Selain itu, teknik kultur jaringan mampu menghasilkan bibit yang bermutu, seragam, memiliki sifat yang identik dengan induknya, masa non produktif lebih singkat dan produktivitasnya lebih tinggi (Yunus *et al.*, 2009).

Zat pengatur tumbuh ini akan sangat mempengaruhi proses pertumbuhan dan morfogenesis eksplan yang diinginkan, pemberian zat pengatur tumbuh yakni berupa auksin dan sitokinin. Hormon BAP (*6-benzylaminopurine*) termasuk dalam golongan hormon sitokinin sintetik yang berpengaruh dalam pembentukan eksplan yaitu pembentukan tunas, multiplikasi tunas dan memicu pembelahan sel dalam metabolisme tanaman untuk membentuk bagian organ yang diperlukan (Ashraf, *et al.*, 2014). Zat pengatur tumbuh alami dapat diperoleh dari berbagai buah-buahan, salah satunya adalah buah kelapa muda (Seswita, 2010). Glukosa yang terdapat dalam air kelapa paling sesuai sebagai sumber karbohidrat untuk proliferasi pertumbuhan PLB angerk dendrobium (Nambiar *et al.*, 2012). Penggunaan air kelapa jika dipadukan dengan sitokinin akan mempunyai pengaruh positif dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* dalam meningkatkan terbentuknya tunas.

Kegagalan pada teknik kultur jaringan sering disebabkan oleh adanya kontaminasi dan *browning* pada eksplan dan media kultur. Sterilisasi merupakan suatu upaya untuk menghilangkan mikroorganisme penyebab kontaminasi pada eksplan. Beberapa bahan kimia yang dapat digunakan untuk mensterilkan permukaan eksplan adalah deterjen cair, *clorox*, alkohol, tween 20, dithane, benlate dan vitamin C untuk mencegah terjadinya *browning* pada eksplan. Berdasarkan pemaparan diatas, maka akan dilakukan penelitian mengenai pertumbuhan tunas tanaman rasberi hitam pada media Murashige dan Skoog (MS). Menggunkana penambahan sitokinin jenis BAP dan air kelapa muda secara kultur jaringan menggunakan *direct organogenesis* dan menguji metode sterilisasi yang paling tepat untuk digunakan dalam kultur jaringan rasberi hitam.

1.2 Tujuan

1. Untuk mendapatkan metode sterilisasi terbaik pada kultur jaringan tanaman rasberi hitam yang dapat menekan terjadinya kontaminasi dan *browning*.
2. Untuk mengetahui komposisi media yang mampu menginduksi tunas tanaman rasberi hitam secara *in vitro*.

1.3 Hipotesis

1. Metode sterilisasi dengan penambahan tween 20 dan perendaman dalam vitamin C mampu menekan terjadinya kontaminasi atau *browning* pada eksplan tanaman rasberi hitam.
2. Pemberian BAP dan air kelapa pada media MS mampu memberikan hasil terbaik dalam perbanyakan tanaman rasberi hitam.

2. Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Desember 2019 sampai bulan Juni 2020, di Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Percobaan Fakultas Pertanian, Universitas Udayana beralamat di Jalan Pulau Moyo, Denpasar. Bahan tanam yang digunakan tunas lateral tanaman rasberi hitam, yang diperlakukan dengan penyemprotan selama empat hari menggunakan dithane 2g/l. Formulasi media dasar yang digunakan Media Murashige dan Skoog (MS), derajat keasaman media diatur pada pH 5,6-5,8. Bahan sterilan (Deterjen, dithane, benlate, *Clorox*, vitamin C, tween 20, dan alkohol).

Penelitian ini menggunakan 6 tarap perlakuan yakni K0 = MS + 0,01 ppm NAA, K1 = MS + 0,01 ppm NAA + 2 ppm BAP, K2 = MS + 0,01 ppm NAA + 150 mL/L air kelapa, K3 = MS + 0,01 ppm NAA + 4 ppm BAP, K4 = MS + 0,01 ppm NAA + 2 ppm BAP + 150 mL/L air kelapa, K5 = MS + 0,01 ppm NAA + 4 ppm BAP + 150 mL/L air kelapa, setiap perlakuan diulang sebanyak 2 kali sehingga diperoleh 12 unit percobaan. Setiap unit percobaan ditanam 1 eksplan. Hasil eksplan terbaik pada penelitian I digunakan kembali pada penelitian II.

Pengamatan dilakukan setiap hari, variabel yang diamati adalah persentase kontaminasi eksplan, persentase *browning*, persentase pembentukan tunas, persentase tidak terjadi morfogenesis pada eksplan, dan jumlah daun pada planlet.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Hasil

Salah satu permasalahan yang menghambat keberhasilan kultur jaringan adalah adanya kontaminasi dan *browning*. Jumlah kultur eksplan tanaman rasberi hitam (*Rubus occidentalis* L.) yang terkontaminasi terbanyak didapatkan pada metode A yaitu 100% dan terkontaminasi terkecil diperoleh pada metode B yaitu 33,3% (Tabel 1). Sedangkan yang mengalami *browning* terbanyak didapatkan pada Metode C yaitu 100%. Metode B menggunakan sterilan menggunakan tween 20 untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi serta direndam dalam vitamin C untuk menghindari terjadinya

browning. Kontaminasi dan *browning* ini terjadi sejak 3 hari sampai 14 hari setelah tanam (hst).

Tabel 1. Pengaruh metode sterilisasi eksplan pada 14 hari setelah tanam.

Metode sterilisasi	Kontaminasi (%)	<i>Browning</i> (%)	Eksplan hidup (%)
Metode A	100%	0	0
Metode B	33,3%	0	66,7%
Metode C	0	100%	0

3.1.1 Hasil Penelitian II : Pengaruh Komposisi Media Terhadap Induksi Tunas Tanaman Rasberi Hitam

Hasil pengamatan menunjukkan pada perlakuan K4 eksplan tanaman bertunas 9 hari setelah tanam dan pada perlakuan K5 menunjukkan eksplan tanaman bertunas pada 10 hari setelah tanam.

Tabel 2. Pengaruh perlakuan terhadap waktu terjadinya kontaminasi, persentase eksplan terkontaminasi (%), waktu pembentukan tunas (hst) dan persentase tumbuh tunas (%)

Parameter	Perlakuan					
	K0	K1	K2	K3	K4	K5
Waktu terjadinya kontaminasi (hst)	7	-	3	-	-	-
Persentase eksplan terkontaminasi (%)	100	0	100	0	0	0
Waktu pembentukan tunas (hst)	-	-	-	-	9	10
Persentase eksplan bertunas (%)	0	0	0	0	100	100

Keterangan : (-) belum terjadi perubahan pada eksplan saat dilakukan pengamatan

Tabel 3. Pengaruh perlakuan terhadap persentase tidak terjadi morfogenesis eksplan (%) dan jumlah daun yang terbentuk pada 31 hst

Parameter	Perlakuan					
	K0	K1	K2	K3	K4	K5
Persentase Tidak Terjadi Morfogenesis (%)	0	100	0	100	0	0
Jumlah daun yang terbentuk	0	0	0	0	8	0

3.2 Pembahasan

Metode B menunjukkan bahwa penambahan satu tetes tween 20 pada bahan sterilan terbukti efektif untuk menekan terjadinya kontaminasi pada metode B sebesar 33,3%. Tween 20 merupakan salah satu bahan yang ditambahkan ke dalam sterilan yang berfungsi untuk menurunkan tegangan permukaan larutan sehingga kontak dengan tanaman menjadi lebih baik dan sterilan menjadi lebih efektif (Zulkarnain, 2009).

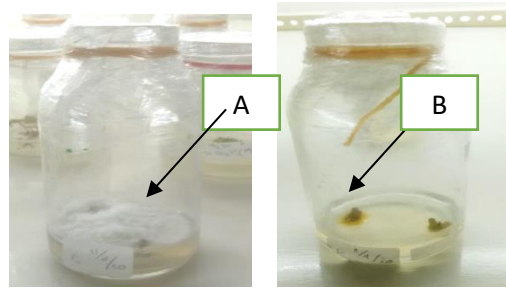
Larutan tween 20 umumnya berfungsi sebagai surfaktan untuk meningkatkan efektivitas sterilisasi, sehingga tegangan permukaan bahan disinfektan menjadi lebih rendah dan menyebabkan bahan disinfektan dapat menyentuh lekukan-lekukan kecil atau rongga-rongga kecil seperti celah-celah di antara bulu-bulu halus yang ada pada eksplan sehingga eksplan benar-benar steril. Majid (2014) melaporkan pada kultur *Salacia chinensis*, sterilisasi permukaan dengan etanol 70% dan penambahan satu tetes tween 20 selama 15 menit terbukti lebih efektif untuk eksplan daun mencapai 99%.

Pada penelitian ini, kontaminasi disebabkan oleh jamur dan bakteri. Namun lebih banyak didominasi oleh jamur dibandingkan dengan bakteri (Gambar 1 A). Bila terkena kontaminasi bakteri maka tanaman akan basah atau menyebabkan lendir yang berwarna coklat kekuningan. Sedangkan bila terkontaminasi oleh jamur, tanaman akan lebih kering, dan akan muncul hifa jamur pada tanaman yang terserang dan biasanya dapat dicirikan dengan adanya garis-garis seperti benang yang berwarna putih sampai abu-abu.

Kontaminasi karena bakteri ini lebih sulit untuk diketahui penyebabnya, karena bakteri tidak saja ada pada bahan tanaman dibagian permukaan tetapi juga ada pada bagian dalam eksplan. Biasanya bila ada di permukaan respon kontaminasinya sangat cepat, dalam tempo dua kali 24 jam sudah bisa terlihat (Gambar 1 B).

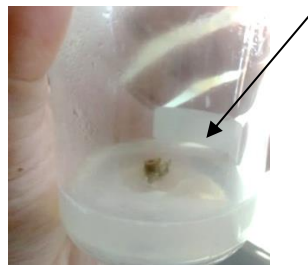
Sterilisasi yang dilakukan pada metode C tidak menyebabkan terjadinya kontaminasi, hal ini dimungkinkan karena pada metode B dan C menggunakan bahan sterilan deterjen dan perendaman eksplan dilakukan menggunakan kombinasi antara benlate dan dithane masing-masing 2 g/liter.

Perendaman eksplan dengan diterjen efektif membunuh virus dan bakteri, karena deterjen mengandung sodium lauryl sulfate (SLS) berperan dalam menghambat pertumbuhan sejumlah mikroorganisme melalui aksi absorpsi dan penetrasi melalui pori-pori dinding sel, diikuti dengan interaksi komponen sel membran, lipid, dan protein. Sedangkan kombinasi antara benlate dan dithane yang memiliki kemampuan menekan terjadinya kontaminasi. Benlate dengan bahan aktif benomil 50% merupakan fungisida sistemik bersifat spesifik mengganggu mitosis β -tubulin dan pembelahan sel (Frac, 2016). Bahan aktif benomil bersifat eradikan dengan menghambat pertumbuhan miselium sebelum atau setelah terinfeksi. Dithane dengan bahan aktif mankozeb merupakan fungisida nonsistemik bekerja sebagai agen pengkhelat unsur yang dibutuhkan oleh jamur sehingga terjadi penghambatan pertumbuhan.



Gambar 1. Kontaminasi pada eksplan dalam botol (A) Kontaminasi Jamur (B) Kontaminasi Bakteri

Selain kontaminasi, eksplan juga mengalami mati fisiologis. Ciri kultur mati fisiologis diawali dengan pencoklatan (*browning*). *Browning* merupakan suatu karakter munculnya warna coklat atau hitam sering kali membuat pertumbuhan dan perkembangan eksplan terhambat dan mengakibatkan kematian pada jaringan (Gambar 2).



Gambar 2. *Browning* pada eksplan umur 9 hst

Persentase kultur *browning* pada Metode C sebesar 100% (Tabel 1). *Browning* pada eksplan terjadi akibat adanya aktivitas enzim oksidase dan tirosinase yang dilepaskan atau disintesis dan tersedia pada kondisi oksidatif ketika jaringan dilukai. Enzim dan substrat dalam keadaan normal akan bertahan dalam ruang yang berbeda di dalam sel dan akan keluar bersama-sama pada saat sel dilukai atau hampir mati. Penghambatan pertumbuhan yang tidak diperbaiki terjadi ketika fenol teroksidasi menjadi senyawa quinon yang tinggi dan mengoksidasi protein menjadi senyawa melanat yang makin meningkat dan dapat menjadi racun bagi tanaman (Chang, 2009).

Pada metode A dan B yang digunakan dalam proses sterilisasi tidak ditemukan adanya eksplan yang mengalami *browning* (Tabel 1), hal ini mungkin disebabkan oleh perendaman eksplan dalam vitamin C steril sebanyak 100 ppm. Perendaman tersebut bertujuan untuk mengurangi reaksi antara enzim polifenolase, oksigen, dan senyawa polifenol yang bertanggung jawab dalam proses terjadinya *browning* (Syamsir, 2011). Senyawa antioksidan telah banyak digunakan dalam penelitian kultur jaringan, karena mampu menekan terjadinya kontaminasi pada berbagai jenis tanaman. Penelitian dari Q. Wei *et al.*, (2004) pada kultur jaringan pisang Cavendish menunjukkan asam askorbat tidak hanya dapat menekan terjadinya *browning* pada eksplan, namun dapat meningkatkan pertumbuhan akar pada eksplan.

Pada penelitian II, diperoleh waktu pembentukan tunas tercepat oleh K4 dengan perlakuan konsentrasi 2 ppm BAP + 150 ml/L air kelapa + 0,01 ppm NAA yakni 9 hari setelah tanam. Penumbuhan tunas terjadi menandakan sudah adanya aktivitas di dalam sel (Gambar 3).



Gambar 3. Pertumbuhan tunas pada 9 hst

Zat pengatur tumbuh *6-Benzil Amino Purine* (BAP) yang digunakan pada penelitian mempengaruhi perkembangan dari eksplan rasberi hitam. Akibat dari pemberian BAP tersebut, dapat memacu proses pembentukan tunas sesuai dengan fungsinya sebagai sitokonin, yaitu merangsang pembelahan sel tanaman. Penambahan BAP dalam media tumbuh tanaman juga berperan dalam peningkatan material hidup sel melalui dua titik kontrol, yaitu merangsang metabolisme dan sintesis protein.

Air kelapa sebagai sumber sitokinin alami terbukti efektif dalam menginduksi tunas eksplan rasberi hitam. Air kelapa mengandung zat yang penting untuk pertumbuhan kultur yaitu kandungan asam amino, asam nukleat, purin, asam organik, gula, vitamin dan mineral (George, 1984). Pada penelitian ini menunjukkan kombinasi antara zat pengatur tumbuh BAP dan air kelapa muda mampu untuk mendorong pembentukan tunas pada eksplan tanaman pada perlakuan K4 dibandingkan dengan perlakuan lain tanpa penambahan air kelapa muda. Kompleksitas kandungan hormon dan mineral dalam air kelapa melengkapi fungsi dari BAP untuk mempengaruhi multiplikasi tunas pada planlet. (Indriani, 2014), melaporkan penambahan BAP 1 ppm yang diinteraksikan dengan air kelapa pada konsentrasi 5%, mampu menambah rata-rata pertumbuhan tunas krisan sebesar 5.03 cm.

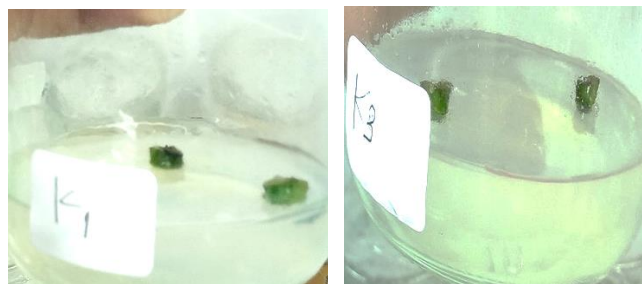
Pertumbuhan tunas melalui tahap meristemoid (Gambar 4) terjadi pada perlakuan K5, dengan konsentrasi 4 ppm BAP + 150 ml/liter air kelapa + 0,01 ppm NAA. Hal ini diduga terjadi karena konsentrasi BAP dan air kelapa yang tinggi untuk pembentukan tunas rasberi hitam. (Gunawan, 1995) menyatakan bahwa penggunaan BAP dengan konsentrasi yang tinggi dan waktu yang lama akan menurunkan jumlah planlet normal yang diperoleh. Pemberian BAP dan air kelapa dalam kadar yang tinggi dapat mengakibatkan planlet berukuran kecil dan daun tidak mengalami pertumbuhan yang maksimal.



Gambar 4. Pertumbuhan Meristemoid pada 10 hst

Pembentukan meristemoid diawali dengan terjadinya pembengkakan pada planlet. Jaringan mesistem ini dapat diinduksi pembentukannya baik dengan melukai suatu bagian tubuh tumbuhan melalui proses kultur jaringan. Proses ini dipengaruhi oleh penyerapan air yang mengakibatkan dinding sel mengedur, sehingga ukuran eksplan membesar. Jaringan tanaman yang masih muda memiliki daya regenerasi yang lebih tinggi, sehingga selnya masih aktif membelah (Yunita, 2004).

Dari data hasil penelitian penambahan BAP secara tunggal tanpa adanya penambahan air kelapa pada media dasar MS kurang efektif mempercepat induksi tunas, hal ini terlihat dari perlakuan pada K1 : MS + 2 ppm BA + 0,01 ppm NAA dan K3 : MS + 4 ppm BA + 0,01 ppm NAA (Gambar 6). Tanpa penambahan air kelapa penggunaan BAP belum mampu menginduksi tunas pada 31 hst. Kompleksitas kandungan hormon dan mineral pada air kelapa mengakibatkan air kelapa mempengaruhi multiplikasi secara signifikan jika dibandingkan dengan hanya menggunakan BAP secara tunggal. (Magdalena *et al.*, 2002) menyebutkan bahwa penambahan sitokinin eksogen secara berlebih justru dapat menghambat sintesis sitokinin endogen sehingga mengganggu proses pembelahan sel.



Gambar 6. Tidak terjadi morfogenesis pada eksplan K1 dan K3 pada 31 hst

Pada pengamatan terakhir yakni 31 hst perlakuan dengan konsentrasi 2 ppm BAP + 150 ml/liter air kelapa + 0,01 ppm NAA pada K4 telah terbentuk 8 helai daun pada planlet (Tabel 2). Sehingga diduga pada sub kultur rasberi hitam ini konsentrasi 2 ppm BAP dengan penambahan 150 ml/liter air kelapa cukup optimal untuk mendukung pembentukan daun pada planlet, namun peningkatan konsentrasi BAP yang diberikan justru memperlambat kemunculan daun pada K5 dengan konsentrasi 4 ppm BAP + 150 ml/liter air kelapa + 0,01 ppm NAA. Menurut Wetter (1991) media MS mempunyai kandungan nitrat, kalium, dan ammonium yang layak untuk

memenuhi kebutuhan banyak jenis sel tanaman dalam kultur jaringan (Gambar 7). Penambahan air kelapa muda juga berpengaruh pada penambahan jumlah daun, karena air kelapa memiliki unsur K yang tinggi diikuti Na, Mg dan unsur-unsur lainnya. Proses pembentukan daun dalam kultur *in vitro* dengan penambahan air kelapa berkaitan dengan keberadaan unsur K dan Mg yang relatif tinggi pada media yang digunakan.



Gambar 7. Pertumbuhan Tunas Pada 31 hst

4. Kesimpulan dan Saran

4.1 Kesimpulan

1. Sterilisasi pada metode B dengan penambahan satu tetes tween 20 dan perendaman dalam vitamin C menekan kontaminasi dan *browning* masing-masing 33,3% dan 100%.
2. Penggunaan 2 ppm BAP dan air kelapa 150 mL/liter pada perlakuan K4 mampu menginduksi tunas eksplan rasberi hitam (*R. occidentalis* L.) secara *in vitro*.

4.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian ulang mengenai proses sterilisasi yang telah digunakan dalam penelitian ini dengan konsentrasi ZPT serta air kelapa yang mampu menginduksi tunas. Menggunakan ulangan yang lebih banyak lagi, sehingga dapat dilakukan perhitungan secara statistik untuk mendapatkan perlakuan yang paling efektif.
2. Sebelum melakukan proses kultur jaringan, pastikan sudah cukup memiliki literatur agar saat pengerjaan telah memahami langkah yang tepat dan mendapatkan hasil yang tidak mengecewakan.

Daftar Pustaka

- Ashraf, M.F., Aziz, M.A., Kemat, N. & Ismasil, I. 2014. Effect o cytokinin types, concentrations and their interactions on *in vitro* shoot regeneration of *Chlorophytum borivillianum* Sant. & Fernandez. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17 (2) : 275-279.
- Chang T.S. 2009. An updated riview of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 10 (3) : 2440-2475
- De Souza AC, ffp CARVALHO, cs Batista, RF Schwan and DR Dias. 2014. Sugarcane Bagasse Hydrolysis Usiang Yaest Cellulolytic Enzymes, *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23(10) : 1403-1412

- Fatimah, 2003. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang Press.
- FRAC. 2016. Recommendations for Fungicide Mixtures. Available online at: <http://www.frac.info/docs/defaultsource/publications/frac-recommendationsfor-fungicide-mixtures/fracrecommendations-for->
- George, E. F. & Sherrington, P. D., 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. England Eastern Press.
- Gunawan, L. W., 1995. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Bogor. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman PAU Bioteknologi IPB.
- Hambali, S. 2006. Ulasan: Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. *Jurnal AgoBiogen* 4(2): 83-88.
- Indriani, B.S. 2014. Efektivitas Substitusi Sitokinin dengan Air kelapa pada Medium Multiplikasi Tunas Krisan (*Chysanthemum indicum* L.) secara *In Vitro*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.
- Magdalena, T.S., L. Drozdowska., and M. Szota, 2002. Effect o cytokinins on *in vitro* morphogenesis and Ploidy o Pepper *Capsium annuum* L. *Electronic Journal*. 5 (1) : 26-30
- Majid, B. 2014. Establishment of an improve, efficient and eco-friendly micropropagation system in *Salacia Chinensis* L. an endangered antidiabetic medical plant. *Agriculture & Forestry*, 63 (2) : 17-20
- Neuenschwander, B. and T. W. Baumann. 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* 10:608-612
- Q. Wei, W.D. Lu, Y. Liao, S.-L. Pan, Y. Xu and L. Tang. 2004. *Plant Regeneration from Epicotyl Explant of HAtropa curca* 30 (2) : 475-478
- Santosa U dan Nursandi F. 2003. Pengaruh Pemberian Air kelapa terhadap pertumbuhan Kurma. Malang : Universitas Muhammadiyah Malang Press
- Seswita, D., 2010. Penggunaan Air kelapa Sebagai Zat Psengatur Tumbuh pada Multiplikasi Tunas Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) *in vitro*. *Jurnal Littri*, 16 (4) :135-140.
- Syamsir, E. 2011. Penuntun Praktikum Teknologi Pengolahan Pangan. Bogor (ID): Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Wetter and Constabel. 1991. *In vitro* regeneration of silktree (*Albizia julibrissin*) from excised roots. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44 (3) : 83-86
- Yunita, 2004. *Kultur Jaringan. Cara perbanyakannya secara efisien*. Cetakan Ketiga. Ago Media Pustaka. Jakarta.
- Yunus, A., Samanhudi, dan D. Noiyanti. 2009. Pengaruh konsentrasi IBA dan BA terhadap Pertumbuhan Eksplan Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) secara *in vitro*. *Jurnal Agosains* 9 (2) : 41-52.
- Zulkarnaen, 2009. *Kultur Jaringan Tanaman: Solusi Perbanyakannya Tanaman Budidaya*. Jakarta. Bumi Aksara.