PERBANYAKAN GAMBIR (*Uncaria gambir*) MELALUI INDUKSI KALUS SECARA *IN VITRO*

(Propagation of gambir (*Uncaria gambir*) by callus induction *in vitro*)

Istino Ferita, Benni Satria, dan Djafaruddin*

ABSTRACT

An experiment was carried out at the plant tissue culture Laboratory of Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Andalas University, Padang from September to December 1999. The objective of the experiment was to obtain the best combination of 2,4-D and kinetin to increase callus induction, and combination of NAA, kinetin and BAP to increase callus generation of gambir *in vitro*. Two factor treatments were arranged in Completely Randomized Design (CRD) with 4 replications. The first factor was concentration of 2,4-D i.e:0,0; 0,5; and 1,0 ppm and the second factor was concentration of kinetin i.e :0,0; 0,5; 1,0; and 1,5 ppm. For stage callus regeneration, callus formed on stage callus induction were cultured on combination concentration of 0,5 ppm NAA + 0,1 ppm kinetin + 3,0 ppm BAP. Observations were on percentage of browning, percentage of callus, percentage of live, and percentage of shootlet. Result indicated that the interaction of concentration of 0,5 ppm, 2,4-D and 0,5 ppm kinetin was the best in callus induction. For stage callus regeneration formed shootlet, rootlet, and planlet on combination concentration of 0,5 ppm NAA + 0,1 ppm kinetin + 3,0 ppm BAP.

PENDAHULUAN

Tanaman gambir (*Uncaria gambir*) merupakan komoditas ekspor tradisional spesifik Sumatera Barat (Daswir dan Kusuma, 1993). Gambir banyak digunakan sebagai bahan penyamak kulit, pembatik, obat-obatan, cat dan kosmetika serta sebagai campuran pemakan sirih. Dalam bidang farmasi kandungan tanin pada gambir dapat digunakan sebagai penawar racun alkaloid dan logam berat (Deman dan Suherdi, 1992).

Pada tahun 1994 tercatat bahwa volume ekspor gambir sebesar 1.038.839 kg dengan nilai US $ 2.512.280 dan pada tahun 1995 meningkat menjadi 1.129.882 kg dengan nilai US $ 1.873.066 serta tahun 1996 menjadi 1.660.906 kg dengan nilai US $ 3.441.508 (Biro Pusat Statistik Jakarta, 1997). Terlihat bahwa permintaan terhadap gambir selalu meningkat, sehingga dapat diperkirakan bahwa tanaman gambir mempunyai prospek masa depan yang cerah. Namun pengusahaannya menemui kendala-kendala.

Salah satu persoalan yang dihadapi pada tanaman gambir adalah rendahnya produktivitas hasil. Produktivitas dan kualitas hasil sangat tergantung pada bahan tanaman yang digunakan. Sampai saat ini belum diperoleh varitas gambir unggul. Didaerah sentra produksi ditemukan tiga tipe secara morfologis, yaitu tipe udang, cubadak, dan riau. Dari informasi petani, tipe udang mempunyai kandungan getah yang paling tinggi.

Teknik kultur jaringan merupakan salah satu alternatif yang digunakan untuk membantu memperoleh varitas tanaman baru yang memiliki kualitas lebih baik dalam jumlah yang banyak, waktu relatif singkat dan bebas penyakit sistemik. Dengan perbanyakan klonal juga dapat memperoleh enzim dan produk metabolit sekunder secara *in vitro*, dan juga dapat digunakan sebagai studi model sistem ekspresi gen pada tumbuhan.

Aplikasi teknik kultur jaringan pada tanaman gambir belum banyak dilakukan dan dilaporkan. Pemanfaatan teknik kultur jaringan pada tanaman gambir cukup penting, karena antara lain ; didasarkan kepada sukarnya dilakukan perbanyakan vegetatif secara konvensional (stek, rundukan, dan lain-lain). Deanan dan Idris (1992) melaporkan bahwa tingkat keberhasilan perbanyakan vegetatif secara konvensional pada tanaman gambir rendah sekali, hanya 0-15%.

Teknik kultur jaringan juga dapat membantu perbanyakan tipe udang lebih cepat, karena tipe ini lambat berbunga dan biji yang dihasilkan lebih sedikit, jika dibandingkan dengan tipe lainnya. Selanjutnya perbanyakan generatif berupa biji akan menyebabkan terganggunya stabilitas genetik tanaman tersebut sehingga akan menghasilkan tanaman yang memiliki sifat genetik yang tidak sama dengan induknya (Camacho-Bustos, 1983).

Teknik kultur jaringan juga dapat merakit varitas gambir dalam jangka waktu yang relatif lebih singkat dibandingkan dengan metoda pemuliaan konvensional. Seperti diketahui sampai saat ini belum ada perakitan varitas untuk mendapatkan produktivitas dan kualitas hasil yang

* Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang

tinggi. Petani masih menggunakan bibit yang berasal dari benih yang tidak terpilih ataupun dari tanaman yang dipungut dikebun sekitarnya. (Suherdi, Denian, dan Syamsu, 1991).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang terbaik guna mendorong induksi kalus dan regenerasi kalus gambir.

BAHAN DAN METODA

Percobaan ini telah dilaksanakan mulai bulan September hingga Desember 1999, di Laboratorium Kultur jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas padang.

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah eksplan yang berasal dari tunas gambir yang diambil dari kebun petani (telah berkayu) di Payakumbuh, dan sebagai percobaan tambahan juga digunakan eksplan yang berasal dari hasil perkecambahan benih dalam media kultur. Media WPM. Ke dalam 1 liter media WPM ditambahkan 10 g/l sukrosa untuk subkultur, dan 20 g/l untuk induksi kalus, ZPT Kinetin, NAA, 2,4-D, dan BAP, 7 gram agar, 2 gram arang aktif. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah alkohol 70%, Agrimicyn, Benlate, Tween-20, NaOH, HCl, Bayclin, asam askorbit, akuades steril, dan lain-lain.

Alat-alat yang digunakan meliputi; timbangan analitik, gelas piala, gelas ukur, labu ukur, corong gelas, kertas saring, pemanas elektrik, autoklaf, shaker, oven, botol kultur, pH meter, pinset, gunting skapel, petridish, laminar air flow cabinet, aluminum foil, plastik isolasi, dan lain-lain.

Percobaan ini disusun secara faktorial 3x4 dalam Rancangan Acak Lengkap, dengan 4 kali ulangan. Percobaan tahap induksi terdiri dari 2 faktor. Faktor I adalah ZPT auksin (2,4-D) yang terdiri dari 3 taraf konsentrasi yaitu : 0 ppm, 0,5 ppm, 1,0 ppm, dan 1,5 ppm. Faktor ke II adalah ZPT Kinetin terdiri dari 4 taraf yaitu : 0 ppm, 0,5 ppm, 1,0 ppm, dan 1,5 ppm. Kalus yang terbentuk melalui percobaan induksi kalus pada media WPM yang diperkaya dengan konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang terbaik, setelah 3 minggu dikulturkan, kalus tersebut diregenerasi melalui subkultur pada media WPM yang diperkaya dengan 0,5 ppm NAA +0,1 ppm kinetin + 3,0 ppm BAP, dan 20 g/l media. Data hasil pengamatan dianalisis dengan uji F dan uji lanjut BNJ pada taraf 5%.

Pelaksanaan terdiri dari sterilisasi botol dan alat, pembuatan media WPM, persiapan bahan tanaman, induksi kalus, subkultur kalus (regenerasi), pemeliharaan, dan pengamatan. Pengamatan dilakukan terhadap A. Eksplan gambir yang berasal dari tunas gambir di lapangan (berkayu) yang meliputi persentase eksplan yang mengalami kecoklatan, persentase eksplan yang membentuk kalus, persentase hidup, dan persentase eksplan yang membentuk shootlet ;B. Eksplan gambir yang berasal dari benih kecambah yang dikulturkan meliputi persentase eksplan hidup, persentase eksplan membentuk shootlet, persentase eksplan membentuk rootlet, dan persentase eksplan membentuk planlet.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Eksplan gambir yang berasal dari tunas gambir di lapangan (berkayu)

Umumnya pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang berasal dari tunas tanaman gambir yang tumbuh dikebun petani, mengalami pencoklatan (browning) rata-rata 100%. Kecuali pada perlakuan 0,5 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin eksplan yang mengalami pencoklatan adalah sebesar 95%, sedangkan 5% lagi dari eksplan tersebut mengalami pertumbuhan dan perkembangan membentuk kalus.

Persentase eksplan yang mengalami pencoklatan sangat tinggi merupakan fenomena yang wajar. Hal ini disebabkan tanaman gambir banyak mengandung senyawa tanin dan polifenol lainnya terutama pada bagian tunas dan akar tanaman gambir yang telah berkayu. Tetapi yang terpenting adalah dengan dilakukan percobaan beberapa kali terhadap kultur gambir tersebut, akan diperoleh cara-cara yang sesuai dan tepat untuk mengatasi permasalahan pencoklatan itu, sehingga senyawa-senyawa penghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan dapat dieliminir nantinya.

1. Persentase eksplan yang mengalami pencoklatan

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa eksplan mulai mengalami pencoklatan 1 minggu setelah pengkulturan. Persentase eksplan yang mengalami pencoklatan sampai umur 9 minggu rata-rata 100% pada tiap-tiap perlakuan, kecuali pada perlakuan dengan konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin, ternyata persentase eksplan yang mengalami pencoklatan adalah 95% seperti ditunjukkan pada Tabel 1.

Pemberian 2,4-D dan kinetin dengan konsentrasi berbeda belum berpengaruh terhadap penurunan persentase eksplan yang mengalami pencoklatan. Terjadinya keadaan seperti ditunjukkan oleh Tabel 1, diduga karena konsentrasi ZPT 2,4-D dan kinetin belum seimbang dalam mendorong pertumbuhan dan perkembangan eksplan gambir yang berasal sari tunas gambir di kebun, dimana memiliki kandungan tanin dan polifenol lain yang tinggi. Jika terjadi oksidasi pada eksplan gambir tersebut, maka eksplan tersebut akan mudah mengalami pencoklatan dengan demikian akan menghambat pertumbuhan dan perkembangan

eksplan, yang selanjutnya menyebabkan jaringan eksplan menjadi mati.

Pengaruh sitokinin yang lebih dominan dibandingkan auksin dalam media kultur juga akan menambah terjadinya pencoklatan eksplan. Hal ini sesuai dengan pendapat Zaid (1985) bahwa ZPT eksogen terutama sitokinin dalam media kultur pada konsentrasi yang tinggi merupakan salah satu pemicu terjadinya pencoklatan pada eksplan yang dikulturkan. Hal ini disebabkan karena sitokinin merupakan salah satu faktor yang menjadi stimulan sintesis senyawa polyfenol.

Hasil penelitian Denian dan Hilma (1993) menunjukkan bahwa penggunaan media MS ditambah dengan BAP 1% dan 5%, eksplan mengalami pencoklatan 2-5 jam setelah eksplan itu dikulturkan. Sedangkan dengan penggunaan media Basis 5 (B5) ditambah dengan NAA 1, 5, dan 10%, ternyata eksplan mengalami pencoklatan 0,5 jam setelah eksplan dikulturkan.

Tabel 1. Persentase eksplan mengalami pencoklatan pada berbagai konsentrasi 2,4-D dan kinetin pada umur 9 minggu setelah tanam (MST)

Konsentrasi 2,4-D (ppm)	Konsentrasi kinetin (ppm)			
	0,0 (Ko)	0,5 (K1)	1,0(K2)	1,5(K3)
		%		
0,0 (Do)	100	100	100	100
0,5 (D1)	100	95	100	100
1,0(D2)	100	100	100	100

Angka-angka pada lajur dan baris yang sama berbeda tidak nyata sesamanya menurut uji F pada taraf 5%.

2. Persentase eksplan yang membentuk kalus

Pada Tabel 2 di atas terlihat bahwa persentase eksplan yang hidup adalah 0%, kecuali pada pemberian konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin menunjukkan persentase hidup 5%. Hal ini diduga karena kemampuan eksplan untuk dapat bertahan hidup sampai umur 9 minggu MST sangat dipengaruhi oleh besarnya persentase eksplan mengalami pencoklatan. Semakin tinggi persentase eksplan mengalami pencoklatan maka semakin kecil kemampuan eksplan untuk bertahan hidup. Eksplan yang berasal dari tunas gambir di kebun (telah berkayu) memiliki kandungan tanin dan polifenol lain yang tinggi, sehingga jika terjadi oksidasi pada eksplan, maka akan lebih mudah eksplan mengalami pencoklatan, yang dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan, akhirnya eksplan tidak mampu untuk bertahan hidup, sehingga dapat menyebabkan jaringan eksplan mati (Satria, 1999).Konsentrasi sitokinin yang kurang tepat dalam media kultur juga merupakan salah satu pemicu terjadinya pencoklatan pada eksplan yang dikulturkan, sehingga dapat menyebabkan jaringan eksplan mati (Zaid, 1985).

Tabel 2. Persentase eksplan yang hidup pada berbagai konsentrasi 2,4-D dan kinetin pada umur 9 minggu setelah tanam (MST)

Konsentrasi 2,4-D (ppm)	Konsentrasi kinetin (ppm)			
	0,0 (Ko)	0,5(K1)	1,0(K2)	1,5(K3)
		%		
0,0(Do)	0	0	0	0
0,5(D1)	0	5	0	0
1,0(D2)	0	0	0	0

Angka-angka pada lajur dan baris yang sama berbeda tidak nyata sesamanya menurut uji F pada taraf 5%.

3. Persentase eksplan yang membentuk Shootlet

Hasil percobaan tahap induksi kalus yang dilaksanakan beberapa kali pengulangan, setelah dilakukan pengamatan ternyata hanya diperoleh data untuk peubah persentase eksplan yang mengalami pencoklatan dan persentase eksplan membentuk kalus. Kalus yang terbentuk satu buah pada perlakuan konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin pada ulangan ke dua disubkultur pada media WPM regenerasi kalus pada konsentrasi 0,5 ppm NAA + 0,1 ppm kinetin + 3,0 ppm BAP. Hasil percobaan regenerasi kalus ternyata dari 4 potong kalus yang disubkultur pada media WPM tersebut diperoleh sebanyak 3 buah tetap membentuk kalus dan satu buah membentuk shootlet. Terbentuknya shootlet dari kalus yang disubkultur diduga karena adanya pengaruh keseimbangan konsentrasi auksin (NAA), sitokinin (kinetin dan BAP) eksogen dan endogen yang ada dalam eksplan dan media kultur. Sesuai dengan laporan Gunawan (1988) bahwa ZPT eksogen dan endogen merupakan faktor pemicu untuk proses-

proses pertumbuhan morfogenesis. Selanjutnya pembentukan shootlet memerlukan sitokinin yang lebih tinggi dari pada auksin sesuai dengan fungsi sitokinin yaitu merangsang pertumbuhan shootlet (Wattimena, 1988).

B. Eksplan yang berasal dari tunas kecambah gambir hasil kultur *in vitro*

Dari Tabel 3 di atas dapat dilihat bahwa pada kombinasi perlakuan konsentrasi 0,5 ppm NAA+0,1 ppm kinetin +3,0 ppm BAP, rata-rata persentase eksplan yang hidup mencapai 95%, rata-rata eksplan membentuk shootlet mencapai 25%, membentuk rootlet 15%, dan membentuk plantlet mencapai 55%. Tingginya rata-rata persentase eksplan yang hidup diduga karena kandungan tanin dan polifenol lainnya yang terdapat dalam eksplan yang berasal dari tunas kecambah gambir hasil kultur in vitro relatif rendah, dan masih dapat dieliminir oleh pengaruh senyawa tersebut dengan sterilisasi eksplan dalam asam askorbit dan penambahan arang aktif dalam media, sehingga setelah eksplan dikulturkan pada media tersebut (seperti dalam Tabel 4), ternyata eksplan tetap dapat bertahan sampai umur 3 minggu setelah dikulturkan.

Tabel 3. Persentase eksplan yang hidup, persentase shootlet, persentase rootlet, dan persentase eksplan yang membentuk plantlet pada kombinasi konsentrasi 0,5 ppm NAA + 0,1 ppm kinetin + 3,0 ppm BAP umur 3 MSO

Ulangan	Konsentrasi 0,5 ppm NAA+0,1 ppm kinetin+3,0 ppmBAP			
	----------%----------			
	Hidup	Shootlet	Rootlet	Plantlet
I	100	40	20	40
II	80	20	20	40
III	100	20	0	80
IV	100	20	20	60
Rata-rata	95	25	15	55

Pemberian ZPT eksogen yang tepat dapat merangsang pertumbuhan dan perkembangan morfogenesis dari jaringan eksplan, sehingga eksplan dapat bertahan hidup (Satria, Dwipa, dan Jamsari, 1999). George dan Sherrington (1984) dan Moore (1979) melaporkan bahwa ZPT merupakan senyawa organik yang dapat berfungsi merangsang dan hanya dibutuhkan dalam konsentrasi yang sangat rendah. Pada konsentrasi yang relatif tinggi dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan sel eksplan.

Selain dari itu juga diduga karena adanya pengaruh kandungan nutrisi dari media yang digunakan, dimana media WPM ini mempunyai konsentrasi ion rendah dan sulfat yang lebih tinggi dari media lainnya, sehingga mempunyai kandungan nutrisi lebih sesuai untuk tanaman berkayu. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian George dan Sherrington (1984) pada tanaman palmae; Triatminingsih dan Melda (1991) pada tanaman lengkeng; Satria, Dwipa, dan Jamsari (1999) pada tanaman manggis.

Terbentuknya shootlet, rootlet dan plantlet diduga karena adanya pengaruh ZPT endogen dan perlakuan kombinasi konsentrasi 0,5 ppm NAA + 0,1 ppm kinetin + 3,0 ppm BAP pada eksplan yang berasal dari tunas kecambah gambir hasil kultur *in vitro* yang memiliki kandungan tanin dan polifenol lain relatif rendah. Disamping itu juga dapt dipengaruhi oleh kemampuan totipotensi jaringan tanaman yang berbeda yang dijadikan sebagai eksplan.

Pertumbuhan dan perkembangan morfogenesis eksplan ditentukan oleh keseimbangan ZPT dalam eksplan. Pembentukan shootlet memerlukan sitokinin dalam eksplan yang relatif tinggi dari pada auksin, sesuai dengan fungsi sitokinin adalah untuk merangsang pertumbuhan tunas (Wattimena, 1988; Hartman, Flocker, dan Kofranek, 1981). Sedangkan untuk pembentukan akar diperlukan auksin dalam eksplan yang relatif tinggi dari pada sitokinin, sesuai dengan fungsi auksin untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan akar (George dan Sherrington, 1984).

Pembentukan plantlet (tanaman lengkap) sangat ditentukan oleh keseimbangan ZPT auksin dan sitokinin dalam eksplan (Satria, 1996). Dixon dan Gonzales (1994) melaporkan bahwa untuk mendapatkan keseimbangan ZPT dalam media maka perlu dilakukan manipulasi tingkat auksin dan sitokinin. Gunawan (1988) menyatakan bahwa ZPT merupakan faktor pemicu untuk proses-proses tumbuh dan morfogenesis eksplan membentuk shootlet, rootlet, dan plantlet. Weaver (1972) melaporkan bahwa keberhasilan perkembangan secara *in vitro* sangat dipengaruhi oleh faktor genetik dari tanaman dan keadaan lingkungan.

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Dari hasil percobaan yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Eksplan yang berasal dari tunas gambir yang diambil di kebun dan telah berkayu secara umum mengalami pencoklatan pada berbagai konsentrasi 2,4-D dan kinetin, sehingga

menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan.

2. Konsentrasi 0,5 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin dapat mendorong pembentukan kalus sebesar 5%.
3. Kombinasi konsentrasi 0,5 ppm NAA + 0,1 ppm kinetin + 3,0 ppm BAP telah mampu mendorong terjadinya regenerasi kalus membentuk tunas.
4. Eksplan yang berasal dari tunas kecambah gambir hasil kultur dapat mendorong pertumbuhan dan perkembangan eksplan membentuk shootlet, rootlet, dan plantlet pada konsentrasi 0,5 ppm NAA+0,1 ppm kinetin +3,0 ppm BAP

B. Saran

Untuk percobaan induksi dan regenerasi kalus gambir, sebaiknya menggunakan eksplan yang berasal dari tunas kecambah gambir hasil kultur *in vitro* pada berbagai konsentrasi NAA, kinetin dan BAP.

DAFTAR PUSTAKA

Biro Pusat Statistik Jakarta-Indonesia. 1997. Statistik perdagangan luar negeri Indonesia. Ekspor. Jilid/ Volume I. Jakarta. 356 hal.

Denian, A dan H. Idris. 1992. Perbanyakan tanaman gambir secara konvensional dan kultur jaringan. Laporan Tahunan bag. Proyek Littro Solok.

Denian, A. H. Syamsi. 1993. Kultur jaringan dan permasalahan pada tanaman gambir. balitro Solok. laporan penelitian. 30 hal.

Denian, A. dan Suherdi. 1992. Teknologi budidaya dan pengolahan gambir. Temu Tugas Aplikasi Paket Teknologi Pertanian Sub Sektor Perkebunan. Bukit Tinggi.

Dixon, R.A. and Gonzales. 1994. Plant cell culture a practical approach. Oxford . University Press. Oxford.

George, F.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegenetics Ltd. Eversley, Basingstocke, Hants, RG27 OQY. England. 709 p.

Gunawan, L.W. 1988. Teknik kultur jaringan tumbuhan. PAU Bioteknologi. IPB. Bogor. 252 hal.

Hartman, H.T, W.J. Flocker, and A.M Kofranek. 1981. Plant Science Growth Development and ultilization of cultivated plants. Prentice-hall Inc. Englewood Cliffs New Jersey.

Masyudi, M.F. 1992. Pengaruh zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP pada kultur jaringan biji padi masak penuh dalam Buletin Pertanian. 12 (1). Jakarta. p. 1-2.

Moore, T.C. 1979. Biochemistry and physiology of plant hormones. Springger-Verlag. New York. 174 p.

Pierick, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higer plants. Martinus Nijhoff publ. Dordrecht The Netherlands.

Rao, A.N, Y.M.Sin, N. Kothagoda, and Hutchinson. 1981. Cotyledon tissue culture of some tropical fruit. Pp. 134-140. In Proc. Symposium on tissue culture economically important plants, Singapore.

Satria, D. 1996. Respon eksplan epikotil manggis (*Garcinia mangostana* L) terhadap dosis arang aktif dengan kombinasi konsentrasi BAP dan NAA secara *in vitro* (tesis) Pascasarjana. Universitas Andalas padang. 76 hal.

Satria, B, I. Dwipa, dan Jamsari. 1999. Regenerasi kalus manggis (*Garcinia mangostana* L) secara kultur in vitro. Jurnal Stigma ISSN 0853-3776 SK Akreditasi Dikti No 53 / Dikti/kep/1998. Vol. VII. No. 1 Hal 56-60. Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang.

Wattimena, G.A. 1988. Zat pengatur tumbuh tanaman. PAU IPB dan Sumberdaya Informasi IPB. Bogor. 148 hal.

Weaver, R.J. 1972. Plant growth substances in agriculture. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 423 p.

Wiendi, N.M.A, G.A. Wattimena, dan L.W. Gunawan. 1991. Perbanyakan tanaman pp. 17-174. Dalam Bioteknologi Tanaman (ed). G.A. Wattimena PAU Bioteknologi IPB. Bogor.

Zaid, A. 1985. *In vitro* browning of tissue and media with special emphasis to date palm culture a review. Pp. 561-566. In Acta Horticulture. Vol. II.

----------ooOoo----------