

**Pelestarian plasma nutfah tanaman sukun (*Artocarpus altilis* L.) secara *in vitro*
Irawati Chaniago, Reni Mayerni, dan Benni Satria*)**

ABSTRACT

In vitro experiments have been carried out to determine the combination of concentrations of NAA and BAP to promote the growth of breadfruit explant. The experiments have also aimed at determining suitable concentration of mannitol in preserving the breadfruit germplasms. The experiments have been conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Andalas University Padang from February to September 2006. There were two series of experiments. The first had 8 treatments as follows: 0,25 ppm NAA + 1,75 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (A); 0,25 ppm NAA + 3,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (B); 0,50 ppm NAA + 1,75 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (C); 0,50 ppm NAA + 3,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (D); 0,75 ppm NAA + 1,75 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (E); 0,75 ppm NAA + 3,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (F); 1,0 ppm NAA + 1,75 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (G); and 1,0 ppm NAA + 3,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (H). The second experiment had seven treatments as follows: 0,0 g mannitol/L media (A); 5,0 g mannitol/L media (B); 10,0 g mannitol/L media (C); 15,0 g mannitol/L media (D); 20,0 g mannitol/L media (E); 25,0 g mannitol/L media (F), and 30,0 g mannitol/L media (G). The media used was Woody Plant Medium (WPM) with 20 g/L sucrose, 8 g/L agar, 2 g/L active charcoal, and pH 5.8. Every experimental units in both experiments were arranged in a completely randomized block design with 4 replicates. Data were analysed with ANOVA at 5% level of confidence and Duncan's New Multiple Range Test when necessary. Results show that 0.50 ppm NAA + 3.50 ppm BAP + 0,10 ppm kinetin resulted in the best growth of the breadfruit explant regarding its highest number of living explant and plantlet formed. Shootlet growth was promoted by the 0.25 ppm NAA + 3,50 ppm BAP + 0,10 ppm kinetin treatment. Mannitol at 20 g/L medium is the best treatment for the purpose of the preservation of the breadfruit germplasms *in vitro*.

Key word: breadfruit, *in vitro*, auksin, sitokinin, mannitol

*) Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang

I. PENDAHULUAN

Penyediaan pangan penduduk Indonesia yang sangat bergantung pada beras menyebabkan terbukanya peluang upaya diversifikasi pangan. Produk tanaman sukun dapat dijadikan salah satu alternatif sumber pangan karena berbagai hal antara lain ketahanan terhadap hama dan penyakit, ketahanan terhadap kekeringan, pencegahan erosi serta penerimaan konsumen. Selain sebagai sumber pangan, sukun juga dapat dijadikan sebagai bahan pencampur pakan.

Buah sukun memiliki nilai gizi yang tinggi sehingga dapat dijadikan sebagai sumber pangan alternatif. Bahkan beberapa unsur gizi tepung sukun melebihi nilai gizi tepung terigu, seperti kandungan kalsium dan fosfor. Selain itu, tepung sukun juga mengandung vitamin C yang tidak terdapat pada tepung terigu.

Salah satu kendala utama dalam perbanyakan tanaman sukun adalah sulitnya tanaman ini diperbanyak secara generatif karena tanaman sukun menghasilkan buah tanpa biji. Tanaman sukun diperbanyak secara vegetatif dengan cangkok dan tribus akar yang mengakibatkan sedikitnya jumlah bibit yang tersedia dengan pertumbuhan yang kurang seragam. Tanaman sukun semakin berkurang jumlahnya karena penebangan tanpa diikuti oleh peremajaan. Bila kondisi ini dibiarkan berlarut-larut maka bukan tidak mungkin tanaman sukun akan mengalami kepunahan.

Untuk mencegah terjadinya kepunahan tanaman sukun sebagai salah satu tanaman penting sebagai bahan pangan, dapat dilakukan dengan perbanyakan massal dan pelestarian plasma nutfah secara *in vitro*. Untuk tujuan konservasi secara *in vitro* bisa dicapai dengan menambahkan zat osmotikum seperti mannitol kedalam media tumbuh.

Persyaratan *in vitro* bagi pertumbuhan dan perkembangan potongan tajuk sebagai explant akan bervariasi menurut ukuran explant, tujuan kultur, dan genotype tanaman (Dodds and Roberts, 1982). Explant yang berupa meristem pucuk mutlak membutuhkan hormon eksogen untuk keberhasilan kultur *in vitro*. Akan tetapi, explant yang berupa pucuk tajuk yang memiliki primordia daun dapat memasok hormon secara endogen. Meskipun demikian, penggunaan pucuk tajuk sebagai sumber explant masih sering membutuhkan penambahan hormon eksogen untuk keberhasilannya. Beberapa faktor nutrisi juga berperan penting dalam menunjang keberhasilan kultur pucuk tajuk. Kultur pucuk tajuk ini membutuhkan auksin eksogen dan seringkali juga membutuhkan sitokinin (Smith dan Murashige, 1970; Shabde dan Murashige, 1977). Penelitian yang

berhasil mengkulturkan pucuk tajuk tanaman sukun sehingga membentuk plantlet belum banyak dilaporkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi NAA dan BAP yang dapat memberikan pertumbuhan terbaik explant sukun secara *in vitro*, dan untuk mendapatkan konsentrasi mannitol yang dapat meminimalkan pertumbuhan plantlet sukun sehingga upaya konservasi plantlet sukun secara *in vitro* sebagai sumber plasma nutfah dapat terpenuhi.

II. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang. Penelitian berlangsung mulai bulan Februari sampai September 2006.

Bahan-bahan yang diperlukan untuk penelitian ini meliputi pucuk apikal tanaman sukun, zat kimia penyusun media WPM, Bacto agar, NAA (*naphthaleneacetic acid*), BAP (*benzylzminopurine*), aquadest steril, ethanol 95%, Tween 20, natrium hipoklorite, sucrose, plastic wrap, aluminium foil, dan lain-lain.

Alat-alat yang diperlukan adalah *laminar air flow cabinet* (LAFC), *autoclave*, botol kultur, gelas *Beaker*, cawan *Petri*, pipet, pisau scalpel, labu Erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur, lemari pendingin, timbangan analitik, pH meter, dan lain-lain.

Penelitian ini berlangsung dalam dua tahap. Tahap pertama bertujuan untuk menentukan komposisi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang sesuai untuk mendukung pertumbuhan dan regenerasi explant tunas pucuk tanaman sukun. Tahap kedua bertujuan untuk menentukan konsentrasi mannitol yang sesuai untuk meminimalkan pertumbuhan plantlet sukun pada komposisi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang terbaik yang diperoleh dalam tahap pertama.

Perlakuan pada tahap pertama adalah delapan komposisi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP. Untuk masing-masing perlakuan ditambahkan 0,10 ppm Kinetin. Perlakuan yang diberikan pada percobaan tahap pertama ini adalah:

- 0,25 ppm NAA + 1,75 ppm BAP + 0,1 ppm Kinetin (A);
- 0,25 ppm NAA + 3,50 ppm BAP + 0,1 ppm Kinetin (B);
- 0,50 ppm NAA + 1,75 ppm BAP + 0,1 ppm Kinetin (C);
- 0,50 ppm NAA + 3,50 ppm BAP + 0,1 ppm Kinetin (D);
- 0,75 ppm NAA + 1,75 ppm BAP + 0,1 ppm Kinetin (E);
- 0,75 ppm NAA + 3,50 ppm BAP + 0,1 ppm Kinetin (F);

1,00 ppm NAA + 1,75 ppm BAP + 0,1 ppm Kinetin (G); dan
1,00 ppm NAA + 3,50 ppm BAP + 0,1 ppm Kinetin (H).

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada tahap pertama ini dipilih satu komposisi media yang memberikan hasil terbaik diantara kedelapan komposisi media tersebut. Kemudian planlet hasil tahap pertama tersebut akan dijadikan sumber explant untuk tahap kedua. Pada tahap kedua, plantlet dikulturkan pada media terbaik dari percobaan tahap pertama yang ditambahkan mannitol sebagai perlakuan osmotikum. Konsentrasi mannitol yang digunakan adalah sebagai berikut:

0,0 g mannitol/L media (A);
5,0 g mannitol/L media (B);
10,0 g mannitol/L media (C);
15,0 g mannitol/L media (D);
20,0 g mannitol/L media (E);
25,0 g mannitol/L media (F), dan
30,0 g mannitol/L media (G).

Kedua tahapan percobaan ini dikerjakan menurut rancangan acak kelompok (RAK) dengan 4 ulangan. Untuk setiap satuan percobaan disiapkan 10 botol kultur sehingga tiap ulangan terdapat 40 botol kultur. Digunakannya rancangan acak kelompok disini mengingat keterbatasan tenaga dan sarana peralatan sehingga tidak memungkinkan untuk mengerjakan semua ulangan dalam satu waktu. Dengan demikian, pengertian kelompok disini berarti kelompok waktu pengerjaan ulangan.

Sterilisasi media, botol kultur, aquadset, cawan Petri, dan pisau scalpel dilakukan dengan *autoclave* pada tekanan 1,1 kg/cm², suhu 121°C, selama 20 menit. Lantai dan dinding *laminar air flow cabinet* disterilisasi dengan ethanol 70% dan lampu ultraviolet (*germicidal UV-lamp*).

Basal media yang digunakan sebagai media tumbuh explant adalah media WPM dengan 20 g/L sukrosa, 8 g/L Bacto agar, dan 2 g/L arang aktif serta ZPT sesuai perlakuan dan pH 5,8. Media disterilisasi pada tekanan 1,1 kg/cm², suhu 121°C, selama 20 menit

Sterilisasi explant yang berupa pucuk apikal sukun dilakukan dengan merendam dalam Tween 20 selama 1 menit kemudian dalam larutan asam askorbat 0,2 g/L selama 20 menit. Kemudian explant direndam di dalam larutan streptomycin + Benlate 0,12 g/L, kemudian direndam dalam 70% ethanol selama 1 menit. Selanjutnya, explant

direndam di dalam larutan natrium hipoklorit 2% selama 10 menit. Kemudian, explant tersebut dicuci dengan cara mengguncang-guncangkannya di dalam labu Erlenmeyer yang berisi aquadest steril selama 4 menit. Pencucian ini dilakukan sebanyak 5 kali dan dikerjakan di dalam *laminar air flow cabinet*. Setelah disterilisasikan, pucuk apical tersebut diletakkan pada cawan Petri steril di dalam *laminar air flow cabinet*.

Pucuk apical yang sudah disterilisasikan tersebut diiris dengan pisau scalpel steril sekitar 5 mm. Explant ini kemudian ditanam pada media yang sesuai dengan perlakuan pada percobaan tahap pertama. Setiap botol kultur ditanami 1 potong explant, kemudian botol itu ditutup dengan *plastic wrap*. Setelah penanaman selesai dikerjakan, kultur diinkubasikan pada suhu 25°C dengan penyinaran sekitar 2500 *lux* sekitar 14 jam per 24 jam. Dua belas minggu setelah tanam beberapa peubah diamati seperti: persentase explant yang hidup, persentase explant yang membentuk kalus, persentase explant yang membentuk shootlet, dan persentase explant yang membentuk plantlet. Sedangkan peubah yang diamati dalam penelitian tahap kedua adalah: jumlah plantlet hidup, jumlah daun plantlet, dan tinggi plantlet

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Persentase explant yang hidup dan persentase kalus

Pengamatan terhadap persentase explant yang hidup dan persentase kalus disajikan pada Tabel 1. Dari data yang diperoleh dapat digambarkan bahwa penambahan NAA dan BAP masing-masing 0,50 dan 3,50 ppm kedalam media WPM mampu memberikan angka persentase explant hidup tertinggi. Peningkatan konsentrasi NAA sampai 0,50 ppm mampu meningkatkan persentase explant hidup. Akan tetapi persentase explant hidup terendah diperoleh pada perlakuan kombinasi 0,25 ppm NAA dan 3,50 ppm BAP. Auksin dan sitokinin yang diberikan telah mampu meningkatkan daya tahan explant sukun untuk tetap hidup dalam percobaan ini.

Perimbangan konsentrasi auksin dan sitokinin dalam media tumbuh dapat meningkatkan kemampuan hidup, pertumbuhan dan perkembangan jaringan explant (George dan Sherrington, 1984). Diduga bahwa kombinasi konsentrasi NAA dan BAP yang diujikan dalam percobaan ini sudah cukup baik karena dapat mempertahankan hidup explant sekurang-kurangnya sebanyak 55%. Angka ini sudah cukup baik untuk tingkat keberhasilan hidup explant, terutama untuk tanaman berkayu.

Tabel 1. Persentase explant yang hidup dan persentase pembentukan kallus umur 12 minggu setelah tanam pada berbagai kombinasi NAA dan BAP

Konsentrasi (ppm)			% explant hidup	% kallus
NAA	BAP	Kinetin		
0,25	1,75	0,1	85,00 ab	45,00 bcd
0,25	3,50	0,1	55,00 d	10,00 e
0,50	1,75	0,1	80,00 abc	50,00 abc
0,50	3,50	0,1	95,00 a	5,00 e
0,75	1,75	0,1	75,00 bc	55,00 ab
0,75	3,50	0,1	70,00 bcd	30,00 d
1,00	1,75	0,1	70,00 bcd	65,00 a
1,00	3,50	0,1	65,00 cd	25,00 cd
			KK = 15,03%	KK = 28,763%

Angka-angka pada lajur yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama adalah berbeda tidak nyata menurut DNMRT pada taraf nyata 5%

Beberapa kombinasi konsentrasi NAA dan BAP memberikan pengaruh yang bervariasi terhadap persentase terbentuknya kallus dari explant tunas pucuk tanaman sukun. Persentase explant membentuk kallus berkisar antara 5 – 65%. Persentase kallus tertinggi diperoleh pada perlakuan kombinasi konsentrasi NAA dan BAP berturut-turut 1,00 dan 1,75 ppm, sedangkan persentase explant membentuk kallus yang paling kecil diperoleh pada perlakuan 0,50 ppm NAA dan 3,50 ppm BAP. Potensi explant tunas pucuk tanaman sukun untuk membentuk kallus dapat terekspresikan secara maksimal pada perlakuan kombinasi konsentrasi NAA 1,00 ppm dan BAP 1,75 ppm. Kombinasi konsentrasi ini adalah yang paling sesuai untuk inisiasi dan pembentukan kallus pada kondisi percobaan ini.

2. Persentase explant membentuk shootlet dan plantlet

Kombinasi konsentrasi NAA dan BAP memberikan pengaruh yang berbeda terhadap persentase terbentuknya shootlet dan plantlet tunas pucuk tanaman sukun (Tabel 2). Konsentrasi NAA 0,25 ppm dengan 1,75 ppm BAP mampu meningkatkan persentase shootlet maksimal yang terbentuk. Peningkatan konsentrasi BAP sampai 3,50 ppm pada konsentrasi NAA 0,25 ppm tidak mampu meningkatkan persentase shootlet. Sedangkan peningkatan konsentrasi NAA sampai 1,00 ppm dengan BAP 1,75 ppm tidak berhasil membentuk shootlet pada kondisi percobaan ini.

Persentase pembentukan plantlet yang tertinggi diperlihatkan oleh perlakuan kombinasi konsentrasi 0,50 ppm NAA dan 3,50 ppm BAP. Sama halnya dengan

persentase pembentukan shootlet yang terendah, persentase pembentukan plantlet yang terendah juga diperlihatkan oleh perlakuan konsentrasi NAA 1,00 ppm dengan BAP 1,75 ppm. Perlakuan ini bahkan tidak berhasil untuk membentuk plantlet.

Tabel 2. Persentase explant yang membentuk shootlet dan plantlet umur 12 minggu setelah tanam pada berbagai kombinasi NAA dan BAP

Konsentrasi (ppm)			% shootlet	% plantlet
NAA	BAP	Kinetin		
0,25	1,75	0,1	20,00 a	5,00 de
0,25	3,50	0,1	20,00 a	20,00 bc
0,50	1,75	0,1	15,00 ab	5,00 de
0,50	3,50	0,1	15,00 ab	70,00 a
0,75	1,75	0,1	10,00 abc	5,00 de
0,75	3,50	0,1	5,00 bc	30,00 b
1,00	1,75	0,1	0,00 c	0,00 e
1,00	3,50	0,1	15,00 ab	15,00 cd
			KK = 26,87%	KK = 23,55%

Angka-angka pada lajur yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama adalah berbeda tidak nyata menurut DNMRT pada taraf nyata 5%

Meskipun terbentuknya shootlet dan plantlet dipengaruhi oleh keseimbangan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin baik endogen maupun eksogen (Wiendi, Wattimena dan Winata, 1991), tetapi ada faktor lain yang ikut berperan dalam menentukan arah inisiasi maupun pertumbuhan shootlet dan plantlet. Perlakuan konsentrasi NAA 1,00 ppm dengan BAP 1,75 ppm belum berhasil menginisiasi terbentuknya shootlet maupun plantlet. Ketidakberhasilan ini tidaklah semata-mata karena komposisi ZPT yang tidak seimbang. Terdapat kemungkinan bahwa terdapat faktor lain, selain konsentrasi zat pengatur tumbuh, yang berperan dalam pembentukan shootlet dan plantlet pada penelitian ini. Faktor lain seperti ethylene diduga berperan pada terhambatnya pembentukan shootlet dan plantlet. Jona, Cattro dan Travaglio (2002) menyatakan bahwa gas ethylene bisa terbentuk di dalam botol kultur dan mengganggu pertumbuhan plantlet yang ada. Taji, Dodd, dan Williams (1997) menyatakan bahwa tanaman yang tumbuh pada kondisi dibawah cekaman akan menghasilkan sejumlah gas ethylene yang dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman itu sendiri.

3. Jumlah plantlet hidup, jumlah daun , dan tinggi plantlet

Pengamatan jumlah plantlet hidup, jumlah daun, dan tinggi plantlet setelah 12 minggu dikulturkan pada media yang ditambahkan perlakuan mannitol (Tabel 3).

Tabel 3. Persentase plantlet hidup, jumlah daun, dan tinggi plantlet umur 12 minggu setelah tanam pada berbagai konsentrasi mannitol

Konsentrasi mannitol	% plantlet hidup	Jumlah daun plantlet	Tinggi plantlet (cm)
0,00 g/L media	100	9,00	2,50
5,00 g/L media	100	8,00	2,30
10,00 g/L media	100	6,00	1,90
15,00 g/L media	100	6,00	1,60
20,00 g/L media	100	5,00	1,40
25,00 g/L media	50	3,00	1,20
30,00 g/L media	50	1,00	0,50

Rata-rata plantlet yang bertahan hidup berkisar antara 50 – 100% dari jumlah plantlet dikulturkan pada media yang mengandung mannitol. Demikian pula halnya dengan jumlah daun plantlet, ada yang bertambah dan ada yang berkurang dari jumlah daun pada saat dikulturkan yaitu 4 helai daun. Perlakuan tanpa mannitol berhasil meningkatkan jumlah daun plantlet sehingga menjadi yang tertinggi (9 helai daun). Sebaliknya perlakuan mannitol 30 g/L media mengakibatkan berkurangnya jumlah daun sehingga rata-rata menjadi hanya 1 helai saja. Perlakuan 20 g/L mannitol dianggap cukup baik untuk tujuan konservasi plantlet sukun secara *in vitro* karena pertumbuhannya bias diminimalisasi, sedangkan persentase plantlet hidup tetap 100%. Gati (2000) menyatakan bahwa pemberian tekanan osmotik sampai batas tertentu dapat memperpanjang masa simpan bahan tanam.

Tinggi plantlet sukun berkisar antara 0,50 – 2,50 cm, dari tinggi awal 1,20 cm sebelum ditransfer ke media yang mengandung mannitol. Peningkatan konsentrasi mannitol di dalam media secara konsisten diikuti oleh pengurangan tinggi plantlet. Untuk tujuan konservasi plantlet sebagai sumber plasma nutfah, konsentrasi mannitol 20 g/L media adalah yang terbaik. Hal ini disebabkan karena pada konsentrasi tersebut masih terjadi pertumbuhan tinggi plantlet dan juga jumlah daun plantlet. Mannitol dengan konsentrasi yang lebih tinggi telah menyebabkan terjadinya pengurangan tinggi plantlet.

Berkurangnya tinggi plantlet sebenarnya tidaklah diharapkan karena dapat mengganggu keseimbangan pertumbuhan plantlet; dan hal ini terlihat sangat jelas pada perlakuan konsentrasi mannitol yang tertinggi yaitu 30 mg/L media. Terjadi pengurangan yang cukup berarti pada tinggi plantlet dengan perlakuan mannitol 30 mg/L media. Hal ini terjadi karena mannitol dapat mempengaruhi potensial air di dalam jaringan, sehingga tunas apikal plantlet pada perlakuan ini menjadi mengering. Demikian juga dengan jumlah daun yang berkurang pada perlakuan mannitol 30 g/L media, daun yang paling dekat dengan tunas apikal mengalami kayu dan mengering.

Selain itu, konsentrasi mannitol yang tinggi tersebut dapat memicu terbentuknya gas ethylene di dalam botol kultur sehingga dapat menghambat pertumbuhan plantlet (Taji *et al.*, 1997; Jona *et al.*, 2002). Penghambatan pertumbuhan yang terjadi dapat juga disebabkan oleh berkurangnya klorofil secara terus-menerus pada daun plantlet sebelum akhirnya daun tersebut mengalami nekrosis dan gugur. Berkurangnya klorofil tersebut erat kaitannya dengan gas ethylene yang terbentuk di dalam botol kultur (Jona *et al.*, 2002). Jadi pengurangan jumlah daun dan tinggi plantlet pada percobaan ini sebenarnya adalah mekanisme yang kompleks dan saling terkait antara satu faktor dengan faktor lainnya.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian yang telah dilaksanakan mengenai upaya pelestarian plasma nutfah tanaman sukun dengan berbagai kombinasi konsentrasi NAA dan BAP serta pemberian mannitol sebagai bahan osmotikum kedalam media tumbuh secara *in vitro*, dapat diutarakan beberap kesimpulan sebagai berikut:

1. Perlakuan kombinasi konsentrasi 0,50 ppm NAA + 3,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin telah berhasil mendorong explant hidup dan membentuk plantlet
2. Kombinasi konsentrasi 1,00 ppm NAA + 1,75 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin adalah yang terbaik dalam menstimulasi explant membentuk kallus
3. Kombinasi konsentrasi 0,25 ppm NAA + 3,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin memperlihatkan hasil terbaik dalam mendorong explant membentuk shootlet
4. Mannitol 20 g/L media mampu meminimalisasi pertumbuhan plantlet.

Upaya konservasi plasma nutfah tanaman sukun secara *in vitro* dapat dilaksanakan dengan menambahkan 20 g mannitol per L media.

Ucapan terima kasih

Dengan telah selesainya penelitian ini, kami tim peneliti ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini. Semoga penelitian ini dapat memberi manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Daftar Pustaka

- Dodds, J. H. and L. W. Roberts. 1982. Experiments in plant tissue culture. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Gati, E. 2000. Aplikasi penyimpanan tanaman langka secara *in vitro* dengan pertumbuhan minimum. *Bulletin Plasma Nutfah*, 6(1):24-30.
- George, E. F. and P. D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd., Eversley, Basingstoke.
- Jona, R., A. Cattro and D. Travaglio, 2002, 'The climacteric feature of fruits is reflected in the sensitivity to ethylene of plantlets *in vitro*', *Scientia Horticulturae*, 94: 273-284.
- Shabde, M. N. and T. Murashige. 1977. Hormonal requirements of excised *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem *in vitro*. *Jap. Agric. Res. Quart.* 6:1-7.
- Smith, R. H. and T. Murashige. 1970. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. *Am. J. Bot.* 57:562-568.
- Taji, A., W. A. Dodd and R. R. Williams. 1997. *Plant Tissue Culture Practice*. 3rd edition, The University of New England Printery, Armidale.