

OPL

258
10/1002
A

ISSN 1410-4377

Buletin

Plasma Nutfah

Volume 7 Nomor 1 Tahun 2001



**Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Departemen Pertanian**

Daftar Isi

Penanggung Jawab
Ketua Komisi Nasional Plasma Nutfah

Kusuma Diwyanto

Dewan Redaksi

Sugiono Moeljopawiro

Surahmat Kusumo

Maharani Hasanah

Subandriyo

Redaksi Pelaksana

Husni Kasim

Hermanto

Alamat Redaksi

Sekretariat Komisi Nasional

Plasma Nutfah

Jalan Merdeka 147 Bogor 16111

Telp/Faks. (0251) 327031

E-mail: genres@indo.net.id

Buletin ilmiah *Plasma Nutfah* diterbitkan oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian secara berkala, dua kali setahun, memuat tulisan hasil penelitian dan tinjauan ilmiah tentang eksplorasi, konservasi, karakterisasi, evaluasi, dan utilisasi plasma nutfah tanaman, ternak, ikan, dan mikroba yang belum pernah dipublikasi di media lain.

Variasi Morfologi dan Isoenzim pada Tanaman Garut (<i>Marantha arundinaceae</i>)	<i>Sudiarto dan D. Sukmadjaja</i>	1
Karakterisasi Plasma Nutfah Bawang Merah	<i>Suryadi, Luthfy, dan Yenni Kusandriani</i>	8
Beberapa Jenis Herba Bermanfaat sebagai Sumber Plasma Nutfah Obat Tradisional	<i>Endjo Djauhariya dan Sukarman</i>	12
Daya Dukung Satwa Herbivora (Rusa, Kuda, dan Kerbau) di Pulau Rinca Taman Nasional Komodo	<i>R. Garsetiasih</i>	22
Sumber Daya Genetik untuk Perbaikan dan Perakitan Varietas Unggul Baru Tanaman Pangan	<i>T.S. Silitonga, S.G. Budiarti, S.A. Rais, dan Asadi</i>	26
Perbanyak dan Penyimpanan Tanaman <i>Raufolesia serpentina</i> secara <i>In Vitro</i>	<i>Endang Gati L. dan Ika Mariska</i>	40
Koleksi Plasma Nutfah Bawang Merah Tahan Bercak Ungu, Antraknose, dan Virus	<i>Suryadi dan Euis Suryaningsih</i>	46

Gambar sampul:

Tanaman dan umbi garut (*Marantha arundinaceae*)



Perbanyakan dan Penyimpanan Tanaman *Rauwolfia serpentina* secara *In Vitro*

Endang Gati Lestari dan Ika Mariska
Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRACT

Pule pandak or rat root (*Rauwolfia serpentina*), which was classified endangered species, may be used to decrease hypertension, fever, heart and colon fever. Therefore, special effort need to be done to conserve it. This experiment aimed at conserving this species in *in vitro* culture with minimum growth, encapsulation, and cryopreservation. At shooting stage, most of double shoot were obtained by using basal media MS + BA 0.8 mg/l, and shoot yield was 14.2 after eight week. Rooting induction using basal media MS 0.5 + IBA 0.8 mg/l. In preservation by minimum growth, the best media was Monier media diluted it a half from basal media formulation combined by ancymidol 1.0 and 1.5 mg/l as retardant. The shoot height after six months age cultures were only 0.83 cm. In preservation by encapsulation, the explant used were the tip of meristem or one internode of shoot. The use of paclobutrazol 0.5 mg/l inhibited the growth of explant till six months of age. Cryopreservation in liquid nitrogen could be done by vitrification method. The initial application of 0.4 M sucrose where four days and additional of cryoprotectant MIX 1 for 120 minutes gave good result, where the explant could be grown normally after storing at -196°C. Several preservation experiment tried did not decrease the growth ability of explant in regeneration media.

Key words: *Rauwolfia serpentina*, propagation, preservation, *in vitro*, cryopreservation.

ABSTRAK

Pule pandak atau akar tikus (*Rauwolfia serpentina*) termasuk tanaman obat langka. Kegunaannya antara lain adalah sebagai obat penurun tekanan darah tinggi, penurun panas, radang jantung dan radang usus. Untuk membantu konservasi tumbuhan obat langka tersebut telah dilakukan percobaan perbanyakan dan penyimpanan secara *in vitro* dengan pertumbuhan minimal, enkapsulasi, dan penyimpanan dalam keadaan beku dengan nitrogen cair. Pada tahap pertunasan, tunas ganda paling banyak dihasilkan dari media dasar MS + BA 0,8 mg/l. Dengan media tersebut dihasilkan 14,2 tunas pada minggu ke-8. Untuk induksi perakaran digunakan media dasar MS 0,5 + IBA 0,8 mg/l. Media penyimpanan terbaik untuk memperoleh pertumbuhan minimal adalah Monier yang setengahnya dari formulasi media dasar kombinasi diencerkan dengan zat penghambat tumbuh ancymidol 1,0 dan 1,5 mg/l. Tinggi tunas pada biakan umur enam bulan hanya 0,83 cm. Penyimpanan dengan

enkapsulasi eksplan yang digunakan dapat berupa meristem pucuk atau batang satu buku. Penggunaan paclobutrazol sebanyak 0,5 mg/l dapat menghambat pertumbuhan eksplan hingga umur enam bulan. Penyimpanan dengan pembekuan dalam nitrogen cair dapat dilakukan dengan metode vitrifikasi. Perlakuan awal 0,4 M sukrosa selama 4 hari dan penggunaan krioprotektan MIX I selama 120 menit memberikan hasil yang cukup baik. Setelah penyimpanan pada temperatur -196°C, eksplan dapat tumbuh kembali. Beberapa perlakuan penyimpanan yang dicoba tidak menurunkan kemampuan tumbuh eksplan pada media regenerasi.

Kata kunci: *Rauwolfia serpentina*, perbanyakan, penyimpanan, *in vitro*, kriopreservasi.

PENDAHULUAN

Pule pandak atau akar tikus (*Rauwolfia serpentina* Benth. Ex.Kurz) merupakan tumbuhan obat asli Indonesia, yang berpotensi untuk dikembangkan. Kegunaannya antara lain adalah sebagai obat penurun panas, penurun tekanan darah tinggi, radang jantung dan radang usus. Dilaporkan bahwa tumbuhan tersebut termasuk langka dan mulai kritis keberadaannya (Zuhud *et al.*, 1994). Hal ini disebabkan karena tumbuhan tersebut dipanen langsung dari alam dan belum dibudidayakan secara optimal.

Tumbuhan ini banyak digunakan untuk bahan baku obat tradisional maupun obat modern. Sekitar 10 jenis obat menggunakan ekstrak murni *R. serpentina* atau dicampur dengan bahan lain. Tumbuhan ini mengandung antara lain reserpin, amalicine, rescinnamine, sterol dan alseroxylon (Youngken, 1957).

Perbanyakan pule pandak secara konvensional biasanya menggunakan benih, tetapi perlu waktu lama untuk menghasilkan bibit. Di samping itu, benih yang dihasilkan dari tiap pohonnya hanya sedikit. Untuk mengatasi hal ini perlu alternatif lain yaitu perbanyakan tunas melalui kultur *in vitro*.

Penyimpanan dengan teknik *in vitro* mempunyai banyak keuntungan, antara lain adalah: (1) materi yang disimpan dalam kultur *in vitro* lebih mudah untuk pertukaran antarlaboratorium, (2) tidak memerlukan areal yang luas, (3) relatif sedikit menggunakan tenaga kerja, dan (4) mengurangi gangguan yang disebabkan oleh faktor biotik maupun abiotik. Meskipun demikian, teknik ini memerlukan tenaga terampil dan sarana laboratorium yang memadai.

Keberhasilan dalam perbanyakan *in vitro* dipengaruhi antara lain oleh formulasi media dasar, zat pengatur tumbuh, lingkungan tumbuh, jenis eksplan dan kemampuannya untuk beregenerasi. Pemilihan formulasi media yang tepat merupakan kunci keberhasilan teknik *in vitro*.

Penyimpanan biakan secara *in vitro* dapat dilakukan dengan penyimpanan pertumbuhan minimal (antara lain enkapsulasi) dan kriopreservasi. Dengan cara ini, biakan yang disimpan diusahakan tetap hidup dalam waktu lama tetapi tidak terjadi perubahan fisiologis pada jaringannya.

Untuk menghambat pertumbuhan biakan dapat dilakukan dengan menambahkan senyawa retardan (paclobutrazol dan ancymidol), atau menggunakan senyawa osmotik (manitol/sorbitol), dan menurunkan suhu ruang penyimpanan. Selain dengan cara tersebut dapat pula menggunakan komposisi media yang miskin hara, umumnya dapat dilakukan dengan mengurangi konsentrasi garam-garam anorganik menjadi 0,5 hingga 0,1 dari formulasi media dasar.

Paclobutrazol merupakan retardan yang menghambat biosintesis giberelin melalui penghambatan oksidasi dari kaurene menjadi asam kaurenoik. Paclobutrazol masuk ke dalam jaringan tumbuhan secara pasif melalui daun, batang, akar dan ditranslokasikan melalui xylem. Beberapa tanaman yang berhasil disimpan menggunakan zat penghambat tumbuh paclobutrazol antara lain adalah *Alyxia stellata* (pulasari), menggunakan medium 0,5 MS yang dikombinasikan dengan paclobutrazol 5 mg/l.

Cara tersebut dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman sampai minggu ke-12 (Gati *et al.*, 1994). Demikian pula pada tanaman

nilam (*Pogostemon cablin*. Benth), paclobutrazol 4 mg/l yang dikombinasikan dengan pengenceran media MS menjadi setengahnya dapat menghambat pertumbuhan tanaman sampai bulan ke-6 (Gati, 1999).

Teknik penyimpanan *in vitro* melalui pertumbuhan minimal antara lain dengan cara memasukkan bahan tanaman dalam kapsul alginat. Penyimpanan dengan kapsul alginat sudah banyak dilaporkan, antara lain oleh Maruyama *et al.* (1997) pada tanaman *Cedrella odorata* dan *Guazuma crinita* Mart, eksplan dapat disimpan selama 12 bulan. Hasil penelitian Gati (1999) terhadap tanaman nilam menunjukkan bahwa eksplan yang disimpan dalam larutan ancymidol 4 mg/l belum menembus kapsul sampai umur enam bulan.

Selain teknik tersebut, saat ini telah dikembangkan pula penyimpanan plasma nutfah dalam kultur *in vitro* dengan metode pembekuan (kriopreservasi). Cara ini potensial digunakan untuk penyimpanan jangka panjang (Withers, 1980). Dengan metode kriopreservasi, biakan tanaman disimpan pada suhu -196°C . Untuk melindungi jaringan tanaman dari kerusakan, sebelum biakan disimpan digunakan krioprotektan. Beberapa penelitian kriopreservasi yang memberikan hasil yang baik antara lain pada *Corylus* sp., *Fragaria* sp., *Purus* sp., *Rubus* sp. (Ashmore, 1997) dan *Cucumis melo* (Ogawa *et al.*, 1997) dengan teknik pembekuan lambat dan *Camellia japonica* (Janeiro *et al.*, 1997).

PERBANYAKAN MELALUI KULTUR *IN VITRO*

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah batang satu buku berukuran 1 cm dan tunas terminal berukuran 0,5 cm. Sterilisasi eksplan menggunakan HgCl_2 0,5% selama 4 menit kemudian klorok 30% selama 5 menit dan selanjutnya dengan klorok 20% selama 10 menit, terakhir eksplan dicuci dengan aquades steril sebanyak tiga kali.

Komposisi media dasar Murashige dan Skoog (MS) digunakan sebagai media dasar, dan ditambah sukrosa 30 g/l, serta zat pengatur tumbuh BA dan

vitamin dari grup B. Kemasaman media dibuat sedemikian rupa hingga ber-pH \pm 5,7 dengan menambahkan HCl atau KOH 1N. Untuk memadatkan media digunakan agar Swallow sebanyak 7,5 g/l. Biakan di dalam botol kultur disimpan dalam rak kultur yang disinari lampu TL dengan intensitas penyinaran sebesar 1000 lux, dengan lama penyinaran 16 jam dalam sehari.

Tabel 1 menunjukkan tanggapan eksplan terhadap media perlakuan pada minggu ke-4 setelah tanam. Dari berbagai takaran BA yang diberikan ternyata pemakaian BA 0,8 mg/l dapat menghasilkan tunas terbanyak sejak minggu ke-4. Pada minggu ke-8, rata-rata jumlah tunas yang dihasilkan rata-rata 14,2 buah, berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan lainnya. BAP merupakan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin yang banyak digunakan untuk memacu proliferasi tunas (Zaer dan Mapes, 1982). Pada umumnya tanaman memiliki tanggap yang lebih baik terhadap BA dibanding kinetin dan 2-iP sehingga BA lebih efektif untuk produksi tunas *in vitro* pada banyak tanaman.

Tabel 1. Rata-rata jumlah tunas pada media perlakuan BAP, umur biakan empat dan delapan minggu.

Perlakuan BAP (mg/l)	Rata-rata jumlah tunas	
	Minggu ke-4	Minggu ke-8
0	1,34 c	1,34 c
0,3	3,50 b	5,00 d
0,5	3,83 b	6,33 c
0,8	5,67 a	14,17 a
1,0	3,50 b	10,00 b
1,2	1,00 c	1,00 c

Angka selajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 0,05 DMRT.

Sumber: Seswita *et al.* (1993).

Tabel 2. Rata-rata jumlah akar, pengaruh konsentrasi media dasar dan IBA, umur biakan empat minggu.

Perlakuan (mg/l)	Rata-rata jumlah akar
MS + IBA 0,3	1,5 b
MS + IBA 0,8	0,8 b
MS 0,5 + IBA 0,3	1,5 b
MS 0,5 + IBA 0,5	0,1 c
MS 0,5 + IBA 0,8	3,3 a

Sumber: Seswita *et al.* (1993).

Pada *Pimpinella pruatjan* Molck, tunas *in vitro* dalam medium dasar MS diberi BA 5 mg/l memberikan hasil tunas rata-rata 5 buah/eksplan (Mariska *et al.*, 1991). Husni (1997) melaporkan, untuk perbanyak tunas inggu (*Ruta angustifolia* Pers.) yang menggunakan eksplan tunas aksilar satu buku, perlakuan terbaik adalah medium 0,75 MS + BA 2 mg/l, menghasilkan sebanyak 18,4 tunas pada kultur umur empat minggu.

Pada tanaman daun dewa (*Gynura procumbens*), pemakaian BA 2 mg/l memberikan hasil terbaik untuk multiplikasi tunas. Pada minggu ke-8 dihasil sebanyak 20,1 tunas (Gati dan Purnamaningsih, 1994).

Perakaran pule pandak formulasi media yang terbaik adalah MS yang diencerkan setengahnya dan diberi IBA 0,8 mg/l (Tabel 2). Pada percobaan formulasi media lainnya, jumlah akar nyata lebih sedikit dibanding perlakuan IBA 0,8 mg/l. Jumlah akar yang banyak dapat meningkatkan bidang serapan hara, yang sangat menentukan dalam setiap tahap aklimatisasi.

PENYIMPANAN MELALUI KULTUR *IN VITRO*

Penyimpanan Pertumbuhan Minimal

Media Padat

Penyimpanan dengan pertumbuhan minimal media dasar Monier ditambah ancymidol (0,5-1,5 mg/l) dan 0,5 Monier + ancymidol 0-1,5 mg/l menghasilkan tunas dengan tinggi rata-rata 0,85 cm pada umur biakan enam bulan (Tabel 3).

Pada media tersebut terjadi pemendekan ruas batang. Hal ini disebabkan oleh adanya aktivitas GA₃ dalam jaringan yang terhambat dengan adanya retar dan ancymidol. Kombinasi media yang miskin akan mineral dengan senyawa retardan dapat lebih menghambat pertumbuhan biakan. Media dasar Monier mempunyai kadar NH₄⁺ rendah. Di samping itu, kadar senyawa organik hanya myo inositol.

Pemakaian paklobutrazol dan media dasar MS dapat pula menghambat perpanjangan ekplan

meristem maupun batang satu buku tanaman pule pandak (Prasetyorini, 2000). Dengan pemberian paklobutrazol 0,75 mg/l pada eksplan meristem, panjang tunas hanya 0,5 cm sampai hari ke-54 setelah tanam.

Hal yang sama didapatkan pada pemakaian paklobutrazol 0,5 mg/l. Seiring dengan peningkatan paklobutrazol maka daun yang dihasilkan makin sedikit. Penghambatan terhadap pemanjangan tunas juga didapatkan pada eksplan berupa batang satu buku (Tabel 4).

Hal serupa dinyatakan oleh Hoden (1989) bahwa paklobutrazol 2 ppm menghambat tinggi tanaman kentang *in vitro* sampai biakan berumur enam bulan. Tunas paling pendek dihasilkan dari perlakuan paklobutrazol 0,5 dan 0,75 mg/l yaitu 3,3 cm. Penghambatan tunas yang lebih nyata dapat dilihat pada Tabel 3. Tampaknya ancymidol lebih efektif menghambat pertumbuhan biakan daripada paklobutrazol.

Enkapsulasi

Meristem pucuk tanaman pule pandak yang dibungkus dengan kapsul alginat, baik yang diberi zat penghambat tumbuh paklobutrazol maupun kontrol, tidak berbeda nyata. Pertumbuhan meristem tersebut sangat lambat dan bahkan mendekati dorman. Hal ini disebabkan oleh perlakuan penyimpanan dalam kapsul alginat selain dapat memberikan tekanan secara fisik pada eksplan yang disimpan juga berpengaruh dalam meminimalkan pertumbuhan yang diakibatkan oleh reduksi proses respirasi. Dengan demikian teknik tersebut merupakan salah satu alternatif yang efektif untuk menyimpan tanaman melalui teknik kultur *in vitro*. Yuehea dan Wenning (1994) dalam Maruyama *et al.* (1997) berhasil menyimpan tunas mikro *Eucalyptus grandis* dan *E. erophylus* selama 10 bulan pada temperatur 30/25°C dengan laju regenerasi sebesar 53%.

Tabel 3. Rata-rata jumlah tunas dan panjang tunas pada media perlakuan tumbuh, umur biakan enam bulan.

Perlakuan	Rata-rata		Keterangan
	Jumlah tunas	Tinggi tunas (cm)	
Monier	1,0 c	1,15 de	ruas batang normal
0,5 Monier	1,0 c	2,99 c	ruas batang normal
Monier + Paclo 1	1,0 c	2,15 cde	ruas batang normal
Monier + Paclo 3	1,0 c	2,18 cde	ruas batang normal
Monier + Paclo 5	1,0 c	2,64 bcd	ruas batang agak pendek
0,5 Monier + Paclo 1	1,0 c	7,72 a	ruas batang normal
Monier + Paclo 3	1,0 c	3,00 bc	ruas batang normal
Monier + Paclo 5	2,3 a	1,23 de	ruas batang agak pendek
Monier + ancymidol 0,5	1,7 abc	0,88 e	ruas batang pendek
Monier + ancymidol 1,0	2,0 ab	0,80 e	ruas batang pendek
Monier + ancymidol 1,5	1,5 bc	0,83 e	ruas batang pendek
0,5 Monier + Ancym 0,5	1,0 c	1,38 cde	ruas batang pendek
0,5 Monier + Ancym 1,0	1,0 c	0,85 e	ruas batang pendek
0,5 Monier + Ancym 1,5	1,0 c	1,02 de	ruas batang pendek

Sumber: Purnamaningsih dan Gati (1997).

Tabel 4. Rata-rata tinggi tunas (cm) *R. serpentina in vitro* dalam medium MS yang ditambah beberapa taraf konsentrasi paklobutrazol.

Takaran paklobutrazol (mg/l)	Tinggi tunas (cm) pada umur	
	8 MST	36 MST
0,00	3,3 a	4,9 a
0,25	2,0 b	4,3 ab
0,50	1,8 bc	3,6 b
0,75	1,6 c	3,3 b

Angka selajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji Duncan's α 0,50

Sumber: Prasetyorini (2000).

Tabel 5 menunjukkan daya tumbuh eksplan pule pandak yang rendah dengan adanya paklobutrazol dan pengenceran media dasar MS. Pada penyimpanan tanaman nilam hasil variasi somaklonal, zat penghambat tumbuh ancymidol 4 mg/l kombinasi dengan media dasar MS 0,5 memberikan hasil terbaik. Eksplan berupa batang satu buku yang disimpan pada perlakuan tersebut sampai bulan ke-6 belum menembus kapsul dan masih berwarna hijau (Gati, 1999).

Penyimpanan dengan Pembekuan

Cara lainnya yang dapat dipakai untuk menyimpan plasma nutfah dalam kultur *in vitro* adalah dengan teknik pembekuan. Menurut Sakai *et al.* (1991), pembekuan sel dan meristem merupakan cara penyimpanan plasma nutfah untuk waktu lama. Dengan teknik ini, sel-sel dan meristem atau bagian lain dari tumbuhan dibekukan di bawah kondisi terkontrol dalam nitrogen cair pada suhu -196°C .

Pada Tabel 6 dapat dilihat daya hidup tunas pucuk masih rendah. Untuk itu perlu dicoba jenis krioprotektan lainnya maupun periode waktu perlakuan sebelum pembekuan dalam nitrogen cair. Banyak aspek yang menentukan keberhasilan penyimpanan dengan pembekuan antara lain perlakuan awal, jenis eksplan, jenis krioprotektan dan *thawing*.

Tunas pule pandak yang disimpan dengan cara kriopreservasi yang mampu beregenerasi setelah disimpan dalam nitrogen cair adalah tunas-tunas yang diberi perlakuan awal sukrosa pada konsentrasi 0,4 M selama empat dan enam hari. Setelah diberi perlakuan awal tersebut kemudian diikuti perlakuan krioprotektan MIX selama 120 menit. Dari percobaan kriopreservasi diketahui tunas pucuk yang berukuran 4-7 mm dapat disimpan dalam nitrogen cair.

Tabel 5. Rata-rata daya hidup (%) meristem *R. serpentina* dalam kapsul alginat.

Perlakuan penyimpanan (mg/l)	Umur penyimpanan (minggu)	
	8	54
MS + paklobutrazol	0,00	94,3
	0,25	96,0
	0,50	88,3
	0,75	83,3
0,5 MS + paklobutrazol	0,00	87,0
	0,25	89,0
	0,50	89,0
	0,75	88,3
0,25 MS + paklobutrazol	0,00	92,7
	0,25	86,7
	0,50	74,0
	0,75	82,7

Sumber: Prasetyorini (2000).

Tabel 6. Pengaruh jenis dan waktu perlakuan awal terhadap rata-rata daya hidup (%) tunas pucuk *R. serpentina* setelah kriopreservasi.

Perlakuan awal	Waktu perlakuan awal (hari)					
	0	1	2	3	4	5
Sukrosa (0,4 M)	0	0	0	0	20	0
Sukrosa (0,5 M)	0	0	0	0	0	0

Sumber: Prasetyorini (2000).

KESIMPULAN

Media untuk pertunasan *in vitro* tanaman pule adalah MS ditambah BA 0,8 mg/l untuk perakaran dan pada media MS 0,5 + IBA 0,8 mg/l 100% tunas dapat berakar. Eksplan yang dipakai untuk penyimpanan sebaiknya adalah tunas pucuk atau batang satu buku. Penyimpanan dapat dilakukan dengan pertumbuhan minimal atau enkapsulasi. Penyimpanan dengan pertumbuhan minimal dilakukan dengan menggunakan media dasar Monier yang diencerkan menjadi setengahnya ditambah ancymidol 1,0 mg/l atau menggunakan media MS + paklobutrazol 0,75 mg/l.

Penyimpanan dengan enkapsulasi memberikan penghambatan yang lebih efektif, dengan menambahkan paklobutrazol konsentrasi 0,5-1 mg/l.

Penyimpanan dengan pembekuan dalam nitrogen cair dapat dilakukan dengan metode vitrifikasi. Perlakuan awal 0,4 M sukrosa selama empat hari dan menggunakan krioprotektan MIX I selama 120 menit, tidak mengurangi kemampuan tunas untuk beregenerasi secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashmore, S.E. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* Techniques for the conservation and use of plant genetic resources. IPGRI Rome. Italy. 67 p.
- Gati, E. dan R. Purnamaningsih. 1994. Mikropropagasi daun dewa melalui kultur *in vitro*. Dalam Pros. Simp. Penel. Bahan Obat Alam VII. Bogor 24-25 Nov 1994. Balitro, Bogor.
- Gati, E. 1999. Penyimpanan tunas nilam dengan enkapsulasi dan media padat dengan zat pengatur tumbuh paklobutrazol dan ancymidol. Tesis Fakultas Pasca-sarjana IPB. Bogor (tidak dipublikasi).
- Hoden, S. 1989. Pengaruh paklobutrazol, jenis dan letak eksplan terhadap pertumbuhan minimal tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) secara *in vitro*. Fakultas Pertanian IPB. Bogor (tidak dipublikasi).
- Husni, A. 1997. Perbanyakan dan penyimpanan in vitro melalui kultur jaringan. Bul. Plasma Nutfah 11:9-13.
- Janeiro, L.V., A. Ballester, and A.M. Vietez. 1997. *In vitro* response of encapsulated somatic embryos of *Camellia*. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 51(2): 119-125.
- Mariska, I., E. Gati, dan D. Sukmadjaja. 1991. Upaya pelestarian tumbuhan obat langka Purwoceng (*Pimpinella pruatjan*. Molk). Dalam Pros. Sem. Peles. Pemanfaatan Tumbuhan dari Hutan Tropis Indonesia. Fak. Kehutanan IPB. Bogor.
- Maruyama, E., Ikinoshita K, Ishii., K. Ohba, dan A. Saito. 1997. Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata*, L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25°C. Plant Cell Report 16: 393-396.
- Ogawa, R., M. Ishikawa. E. Niwata and K. Oosawa. 1997. Cryopreservation of shoot primordia cultures of melon using a slow prefreezing procedure. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 49(3):171-177.
- Purnamaningsih, R dan E. Gati. 1997. Penyimpanan dan regenerasi pule pandak melalui kultur *in vitro*. Dalam Prosiding Kongres I dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Biotek. Pertanian. Univ. 17 Agustus. Surabaya, 1-14 Maret 1997.
- Prasetyorini. 2000. Preservasi *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex. Kurz. (pule pandak) melalui teknik kultur *in vitro*. Disertasi pada Fak. Pascasarjana. IPB. Bogor.
- Sakai, A. S. Kobayashi, and I. Osyam. 1991. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs.) by simple freezing methods. Plant Science 74:243-284.
- Seswita, D., I. Mariska dan E. Gati. 1993. Perbanyakan tumbuhan langka *Rauwolfia serpentina* melalui teknik kultur *in vitro*. Bul. Tan. Industri 6:5-10.
- Withers, L.A. 1980. Preservation of germplasm in perspectives *In* Plant Cell and Tissue Culture. *In* K. Vasil (Ed). Int. Cytol. Suppl. 11B. p.101-136.
- Youngken, H.W. 1957. The pharmacognosy of *Rauwolfia*. *Rawolfia: Botany, Pharmacognosy, Chemistry and Pharmacology*. Boston, Toronto. p. 32.
- Zaer and Mapes. 1982. Action of growth regeneration. *In* Bonga and Durzan (Eds). *Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff. London. p. 231-235.
- Zuhud. E. A.M., Ekarelawan, dan S. Riswan. 1994. Hutan tropika Indonesia sebagai keanekaragaman plasma nutfah tumbuhan obat. Dalam Pelestarian pemanfaatan Keanekaragaman Tumbuhan Obat Hutan Tropika Indonesia. Bogor. p. 1-14.