

PERBANYAKAN TANAMAN ANIS (*Pimpinella anisum* L.) SECARA *IN VITRO*

Oti Rostiana

Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik

ABSTRAK

Anis merupakan tanaman introduksi dari negara sub tropis yang menghasilkan minyak atsiri, dengan komponen utama anetol. Untuk memperoleh bahan tanaman yang banyak dalam waktu singkat, dilakukan perbanyakan *in vitro* melalui kultur tunas di dalam media MS yang diperkaya dengan sitokinin yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan jenis dan konsentrasi sitokinin yang tepat untuk menginduksi tunas anis secara *in vitro*. Penelitian dilakukan dalam Rancangan Acak Lengkap pola faktorial dengan 2 faktor, diulang 5 kali. Faktor pertama adalah jenis sitokinin yaitu Kinetin, BAP dan TDZ. Faktor kedua adalah taraf konsentrasi yaitu 1, 1,5; 2; 2,5 dan 3 mg/l. Hasil penelitian menunjukkan interaksi yang nyata antara jenis sitokinin dan konsentrasinya terhadap kecepatan tumbuh eksplan. Tunas paling cepat berinisiasi di dalam media yang diperkaya kinetin $\leq 1,5$ mg/l (5 hari). Jumlah tunas terbanyak dihasilkan dari media yang diperkaya TDZ dengan konsentrasi optimum 3 mg/l (13,5). Rata-rata jumlah daun terbanyak dihasilkan dari perlakuan TDZ dengan konsentrasi 3 mg/l (19,2 daun). TDZ dengan konsentrasi 3 mg/l merupakan perlakuan paling efektif untuk inisiasi tunas anis *in vitro*.

Kata kunci : Minyak atsiri, anis, *in vitro*, kinetin, BAP, TDZ

ABSTRACT

In vitro Propagation of Anise (*Pimpinella anisum* L.)

Anise is an introduced plant of temperate region which produced essential oils, anethol. For the purpose of an efficient rapid mass propagation of limited seeds, tissue culture of anise was performed on MS medium supplemented with different kinds of cytokinins. In obtaining an appropriate plant growth regulator for the shoots growth of anise *in vitro*, 3 kinds of cytokinins were applied, e.g. BAP

TDZ and Kinetin. The experiments were arranged in randomly complete block design with 2 factors and 5 replications. First factor was cytokinins types e.g. Kinetin, BAP and TDZ and second, concentrations of cytokinins e.g. 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 mg/l. The result showed that there is an interaction effect between kinds of cytokinins and their concentrations on the growth rates of explants. The most rapidly growth was found on the medium supplemented with ≤ 1.5 mg/l kinetin (5 days after culture). On the other hands, the highest shoots growth was obtained on the medium supplemented with TDZ with the optimum concentration of 3 mg/l (13.5 shoots/explant). Similar to the shoots growth, the highest number of leaves was obtained on the medium supplemented with TDZ with the optimum concentration of 3 mg/l (19.2 leaves/explant). From this research it is concluded that medium supplemented with TDZ with the optimum concentration of 3 mg/l resulted in the most rapid shoots growth of anise *in vitro*.

Key words : Essential oils, anise, *in vitro*, kinetin, BAP, TDZ

PENDAHULUAN

Anis (*Pimpinella anisum* L.) merupakan salah satu tanaman introduksi yang tergolong famili Apiaceae, berasal dari Asia kecil, Yunani dan Mesir. Bagian tanaman yang digunakan adalah buahnya yang mengandung minyak atsiri yang terdiri dari anethol (80 - 90%), pinen, fenchon, metil kavikol, anisaldehyd, kamfen, felandren dan minyak lemak (Guenther, 1990; Stephens, 1994). Minyak atsiri anis digunakan dalam industri parfum, kosmetika, sabun, detergen, makanan dan minuman, serta industri obat (Hornok, 1992).

Anis dapat diperbanyak secara generatif maupun vegetatif. Perbanyakan generatif dengan biji yang tidak terseleksi akan menghasilkan variasi cukup besar. Oleh karena itu, perbanyakan vegetatif atau klonal yang akan menghasilkan tanaman baru yang sama dengan tanaman induknya merupakan alternatif yang baik. Meskipun demikian, perbanyakan klonal secara konvensional memerlukan bahan tanaman dalam jumlah besar sehingga teknik kultur jaringan merupakan salah satu alternatif dalam perbanyakan tanaman secara massal dengan bahan baku relatif sedikit.

Sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang sering digunakan untuk memperbanyak tunas secara *in vitro*. 6-Benzyl Aminopurine (BAP) adalah salah satu jenis sitokinin yang sering digunakan untuk pembentukan tunas aksilar. Penambahan BAP 10 mg/l pada kultur *in vitro* Lili (Winarsih *et al.*, 1998) menghambat pertumbuhan "bulblet", tetapi memacu pertumbuhan tunas dengan jumlah tunas per eksplan maksimum 8. Sedangkan pada perbanyakan *in vitro* *piretrum* dengan eksplan tunas lateral, tunas ganda terbentuk pada medium Murashige and Skog (MS) yang diperkaya BAP atau kinetin sebanyak 5 mg/l (Sukmadjaja dan Mariska, 1989). Efektivitas BAP di dalam menginduksi tunas, juga terlihat pada kultur *in vitro* *purwoceng*, dimana media MS yang diperkaya BAP menginduksi tunas lebih cepat daripada media yang diperkaya kinetin (Gati *et al.*, 1990).

Selain BAP dan kinetin, zat pengatur tumbuh yang mempunyai aktivitas sitokinin kuat adalah thidiazuron (TDZ). TDZ sering digunakan un-

tuk menginduksi tunas tanaman rekalsitran, terutama tanaman berkayu. Penambahan TDZ dengan konsentrasi rendah ($< 0,22$ mg/l) dapat menyebabkan proliferasi (multiplikasi) tunas aksilar lebih baik daripada jenis sitokinin lain (Huetteman dan Preece, 1992). Penelitian ini mengkaji efektivitas ketiga jenis sitokinin tersebut di dalam menginduksi tunas anis secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan sejak Agustus 2002 sampai dengan Januari 2003, di Laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Plasma Nutfah dan Pemuliaan, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), Bogor.

Bahan yang digunakan adalah tunas aseptik yang diperoleh dari perkecambahan biji anis *in vitro* di dalam media MS padat (agar 0,8%). Tunas aseptik kemudian dikulturkan di dalam media MS padat yang diperkaya dengan jenis sitokinin yang berbeda (kinetin, BAP dan TDZ) pada konsentrasi yang berbeda (1; 1,5; 2; 2,5 dan 3 mg/l). Penelitian dilakukan dalam rancangan acak lengkap, 2 faktor dengan 5 ulangan. Faktor pertama adalah jenis sitokinin, yaitu kinetin, BAP dan TDZ. Faktor kedua adalah konsentrasi yaitu 1, 1,5; 2; 2,5 dan 3 mg/l. Pemeliharaan kultur dilakukan pada kondisi pencahayaan ± 2.000 lux selama 16 jam dan 8 jam pada kondisi gelap, dengan suhu ruangan 22°C.

Parameter/peubah yang diamati adalah penampakan tunas seperti warna tunas, warna daun dan vigor, kecepatan tumbuh eksplan (lamanya eksplan berinisiasi tunas), jumlah tunas, tinggi tunas, dan jumlah daun.

Pengamatan dilakukan setiap minggu selama delapan minggu. Data yang diperoleh diuji dengan analisis varians untuk RAL Faktorial, kemudian pengujian dilanjutkan dengan uji Duncan's.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kecepatan tumbuh

Jenis sitokinin dan konsentrasinya berpengaruh terhadap kecepatan tumbuh. Inisiasi tunas baru terjadi antara 5–7 hari setelah kultur bergantung pada jenis perlakuan (Tabel 1).

Inisiasi tunas tercepat diperlihatkan oleh eksplan yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan kinetin (5 hari), sedangkan eksplan yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya TDZ paling lambat berinisiasi (7 hari).

Tabel 1. Rata-rata kecepatan tumbuh eksplan anis di dalam media MS yang diperkaya dengan berbagai jenis dan konsentrasi sitokinin

Table 1 Average growth-rate of anise explant on MS media supplemented with various kinds and concentration of cytokinins

No	Perlakuan/Treatments (mg/l)	Kecepatan tumbuh (hari)/ Growth-rate (days)
1	Kinetin	
	1	5
	1,5	5
	2	6
	2,5	6
2	3	6
	BAP	
	1	6
	1,5	6
	2	6
3	2,5	6
	3	6
	TDZ	
	1	6
	1,5	7
	2	6
	2,5	6
	3	6

Penambahan kinetin eksogen menginduksi kinerja kinetin endogen (Wattimena *et al.*, 1991), sehingga mempercepat inisiasi tunas anis. Diantara ketiga jenis sitokinin yang digunakan, kinetin dan BAP memacu kecepatan tumbuh tunas lebih cepat dibandingkan dengan TDZ (Tabel 1).

Jumlah tunas

Jenis sitokinin yang diaplikasikan tidak berpengaruh nyata terhadap jumlah tunas anis pada umur 4 minggu setelah tanam (MST) tetapi konsentrasinya berpengaruh sangat nyata (Tabel 2 dan 3). Pada umur 8 MST, ketiga jenis sitokinin serta konsentrasinya memberikan pengaruh yang nyata terhadap jumlah tunas.

Tabel 2. Rata-rata jumlah tunas anis di dalam media MS yang diperkaya dengan tiga jenis sitokinin pada taraf konsentrasi yang berbeda, umur 4 dan 8 minggu setelah kultur

Table 2. Average numbers of anise shoot on MS medium supplemented with three kinds of cytokinins at various concentrations, 4 and 8 weeks after culture

Perlakuan/ Treatments	Jumlah Tunas/ Numbers of shoot			
	4 Minggu/ Weeks		8 Minggu/ Weeks	
Kinetin 1 mg/l	3,2	b	6,8	ab
Kinetin 1,5 mg/l	3	b	6,1	b
Kinetin 2 mg/l	3,5	ab	6,4	ab
Kinetin 2,5 mg/l	3,5	ab	7,2	ab
Kinetin 3 mg/l	4,6	a	9,1	a
BAP 1 mg/l	3,7	ab	6,6	b
BAP 1,5 mg/l	3,5	ab	6,9	b
BAP 2 mg/l	3,3	ab	6,7	b
BAP 2,5 mg/l	3,1	b	8,3	b
BAP 3 mg/l	3,9	a	11	a
TDZ 1 mg/l	4,1	ab	10	b
TDZ 1,5 mg/l	3	b	6,4	b
TDZ 2 mg/l	3,9	ab	7,5	b
TDZ 2,5 mg/l	4	ab	10	b
TDZ 3 mg/l	4,5	a	13,5	a

Keterangan angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama, tidak berbeda nyata menurut 5% DMRT

Note numbers followed by the same letters within each column are not significantly different at 5% DMRT

Pada umur 8 minggu media yang diperkaya TDZ rata-rata menghasilkan tunas lebih banyak (9,5) dibandingkan dengan media yang diperkaya BAP (7,9) atau kinetin (7,1) dengan konsentrasi optimum untuk TDZ (3 mg/l), BAP (3 mg/l) maupun kinetin (3 mg/l). (Tabel 2 dan 3).

Berdasarkan data di atas peningkatan jumlah tunas umumnya sejalan dengan peningkatan konsentrasi untuk masing-masing jenis sitokinin. Hal ini menunjukkan bahwa baik kinetin, BAP, maupun TDZ pada konsentrasi tinggi lebih memacu peningkatan jumlah tunas dibandingkan pada konsentrasi rendah. Dari ketiga jenis sitokinin yang diaplikasikan, TDZ menghasilkan rata-rata jumlah tunas terbanyak (9,5) dan berbeda nyata dengan kinetin serta BAP

Tabel 3. Rata-rata jumlah tunas anis di dalam media MS yang diperkaya dengan kinetin, BAP dan TDZ, umur 4 dan 8 minggu setelah kultur

Table 3. Average numbers of anise shoot on MS medium supplemented with kinetin, BAP and TDZ, 4 and 8 weeks after culture

Jenis sitokinin/ Cytokinins types	Jumlah tunas/Numbers of shoot			
	4 Minggu/Weeks		8 Minggu/Weeks	
Kinetin	3,6	a	7,1	b
BAP	3,5	a	7,9	b
TDZ	3,9	a	9,5	a

Keterangan angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama, tidak berbeda nyata menurut 5% DMRT

Note numbers followed by the same letters within each column are not significantly different at 5% DMRT

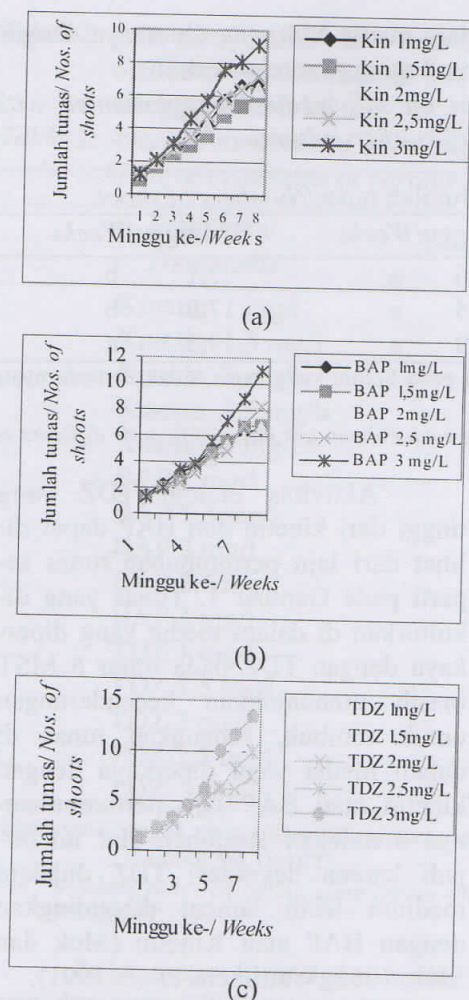
Aktivitas kinetin di dalam jaringan tumbuhan adalah memacu pembelahan dan pemanjangan sel, inisiasi tunas, inisiasi akar, dan memecah dormansi (Devlin, 1975). BAP merupakan sitokinin sintesis yang mempunyai efek pemanjangan batang, sedangkan TDZ dapat merangsang pembentukan kalus, menginduksi organogenesis, dan menstimulasi produksi etilen endogen (Lu, 1993; Mok *et al.*, 1987). Diantara ketiga jenis sitokinin tersebut, TDZ aktivitasnya lebih tinggi daripada Kinetin sehingga lebih efektif dalam menginduksi tunas. Selain itu, aplikasi TDZ dapat mengaktifkan sintesis sitokinin endogen tipe purin di dalam jaringan tanaman dan mempengaruhi metabolisme sehingga meningkatkan respon pertumbuhan dan meningkatkan jumlah tunas baru lebih banyak dibandingkan dengan mengaplikasikan BAP (Thomas dan Katterman, 1986).

Aktivitas biologi TDZ yang tinggi dari kinetin dan BAP dapat dilihat dari laju pertumbuhan tunas seperti pada Gambar 1 Tunas yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan TDZ pada umur 8 MST masih menunjukkan kecenderungan untuk tumbuh, sedangkan tunas di dalam media yang diperkaya dengan kinetin atau BAP laju pertumbuhannya mendekati stasioner. Hal ini terjadi karena degradasi TDZ didalam medium lebih lambat dibandingkan dengan BAP atau Kinetin (Mok dan Mok, 1985; Wattimena *et al.*, 1991). Penampakan visual secara umum terlihat bahwa media yang diperkaya dengan TDZ memiliki jumlah tunas lebih banyak dibandingkan dengan media yang diperkaya dengan BAP dan kinetin, tetapi berbentuk roset.

Tinggi tunas

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa jenis sitokinin berpengaruh nyata terhadap tinggi tunas, sedangkan konsentrasi tidak memberikan pengaruh yang nyata, umur 4 MST Pada 8 MST, baik jenis maupun konsentrasi sitokinin yang diaplikasikan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap tinggi tunas (Tabel 4). Tunas yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan kinetin lebih tinggi dari pada tunas yang diperkaya dengan TDZ. Rata-rata tinggi tunas yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan kinetin 4,6 cm, sedangkan di dalam media yang diperkaya BAP 4,1 cm, dan media yang diperkaya TDZ 3,7 cm. Menurut Huetteman dan Preece (1992), pada umumnya media yang diperkaya dengan TDZ akan menghasilkan tunas yang berbentuk roset. Hal ini terjadi karena TDZ menginduksi dan mengaktifkan etilen endogen yang memberikan respon terhadap penghambatan pemanjangan batang terutama pada tanaman dikotil (Sallisbury dan Ross, 1995).

Berdasarkan pengamatan visual, batang dari tunas yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya kinetin relatif lebih tinggi, demikian juga dengan batang dari tunas yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya BAP, tetapi vigornya lebih baik. Sedangkan tunas yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya TDZ batangnya tidak beruas (roset) dengan vigor yang baik.



Gambar 1 Laju pertumbuhan tunas anis di dalam media MS yang diperkaya dengan kinetin (a), BAP (b), atau TDZ (c) pada berbagai konsentrasi.

Figure 1 Growth-rate of anise shoot on MS medium supplemented with various concentrations of kinetin (a), BAP (b) and TDZ (c)

Tabel 4. Rata-rata tinggi tunas anis di dalam media MS yang diperkaya dengan kinetin, BAP dan TDZ, umur 4 dan 8 minggu setelah kultur

Table 4. Average length of anise shoot on MS medium supplemented with kinetin, BAP and TDZ, 4 and 8 week after culture

Perlakuan/ Treatments	Tinggi Tunas/ Shoot length			
	4 Minggu/ Weeks		8 Minggu/ Weeks	
Kinetin	4,6	a	6,55	a
BAP	4,1	ab	6,70	a
TDZ	3,7	b	5,79	a
Keterangan	angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama, tidak berbeda nyata menurut 5% DMRT			

Note: Numbers followed by the same letters within each column are not significantly different at 5% DMRT.

Jumlah daun

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa jenis sitokinin, konsentrasi, ataupun interaksinya tidak berpengaruh nyata terhadap jumlah daun anis *in vitro* pada umur 4 MST. Pada umur 8 MST, jenis sitokinin dan konsentrasi-nya berpengaruh nyata terhadap jumlah daun tetapi interaksinya tidak berpengaruh nyata (Tabel 5 dan 6).

Sama seperti halnya jumlah tunas, rata-rata jumlah daun tertinggi diperoleh pada media yang diperkaya TDZ (11,8), diikuti jumlah daun pada media yang diperkaya BAP (9,5) dan berbeda nyata dengan jumlah daun yang diperkaya kinetin (7,3). Jumlah daun optimum diperoleh pada media yang diperkaya TDZ 3 mg/l (Tabel 5

dan 6). Hal ini terjadi karena TDZ merupakan sitokinin yang memiliki aktivitas biologi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kedua jenis sitokinin lainnya (Lu, 1993), TDZ mampu memacu sitokinin endogen tanaman sehingga memberikan respon ganda terhadap pertumbuhan jumlah daun. Penambahan jumlah tunas sebanding dengan penambahan jumlah daun, dimana media yang diperkaya dengan TDZ pada konsentrasi optimum (3 mg/l) menghasilkan jumlah tunas dan daun tertinggi.

Tabel 5. Rata-rata jumlah daun anis di dalam media MS yang diperkaya dengan kinetin, BAP dan TDZ, umur 4 dan 8 minggu setelah kultur

Table 5. Average numbers of anise leaf on MS medium supplemented with kinetin, BAP and TDZ, 4 and 8 weeks after culture

Jenis sitokinin/ Cytokinins types	Jumlah Daun/ Numbers of leaf			
	4 Minggu/ Weeks		8 Minggu/ Weeks	
Kinetin	3,55	a	7,3	b
BAP	3,37	a	9,5	ab
TDZ	3,49	a	11,8	a
Keterangan	angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama, tidak berbeda nyata menurut 5% DMRT			

Note: Numbers followed by the same letters within each column are not significantly different at 5% DMRT

Tabel 6. Rata-rata jumlah daun anis di dalam media MS yang diperkaya dengan kinetin, BAP dan TDZ pada taraf konsentrasi yang berbeda, umur 8 minggu setelah kultur

Table 6. Average numbers of anise leaf on MS medium supplemented with various concentrations of kinetin, BAP and TDZ 8 weeks after culture

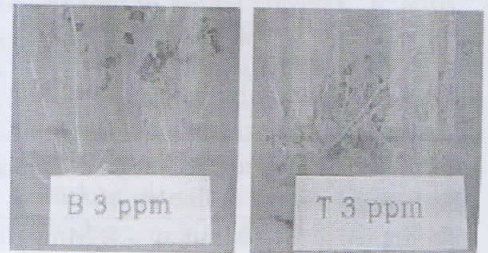
Perlakuan/ Treatments	Jumlah daun/ Numbers of leaf
Kinetin 1 mg/l	6,6 b
Kinetin 1,5 mg/l	6,1 b
Kinetin 2 mg/l	7,0 ab
Kinetin 2,5 mg/l	7,7 ab
Kinetin 3 mg/l	9,2 a
BAP 1 mg/l	8,4 b
BAP 1,5 mg/l	8,3 b
BAP 2 mg/l	7,3 b
BAP 2,5 mg/l	10,3 ab
BAP 3 mg/l	13,4 a
TDZ 1 mg/l	10,5 ab
TDZ 1,5 mg/l	8,1 b
TDZ 2 mg/l	8,3 b
TDZ 2,5 mg/l	13,0 ab
TDZ 3 mg/l	19,2 a

Keterangan angka yang diikuti huruf yang sama, tidak berbeda nyata menurut 5% DMRT

Note Numbers followed by the same letters are not significantly different at 5% DMRT

Secara umum penampakan visual tunas yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya BAP warna daunnya lebih hijau dibandingkan dengan tunas yang dikulturkan di dalam media yang diperkaya dengan kinetin atau TDZ. Setelah delapan minggu di dalam media kultur yang sama, daun anis dari media yang diperkaya dengan TDZ

mulai memperlihatkan gejala vitrifikasi yang ditandai dengan pucuk yang berwarna hijau muda, daun dan batang agak transparan serta rapuh akibat kurangnya lignin (Gambar 2).



Gambar 2. Pertumbuhan tunas anis di dalam media MS + BAP 3 mg/l (kiri) dan MS + TDZ 3 mg/l (kanan) yang menunjukkan gejala vitrifikasi

Figure 2. The growth of anise shoots on MS media + 3 mg/l BAP (left) and vitrified-shoots of anise on MS media + 3 mg/l TDZ (right).

KESIMPULAN

Aktivitas ketiga zat pengatur tumbuh yaitu kinetin, BAP dan TDZ dalam menginduksi tunas anis *in vitro* bergantung kepada konsentrasi yang diaplikasikan, umumnya semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi jumlah tunas dan daun yang diperoleh. Thidiazuron merupakan sitokinin yang mampu menginduksi dan memacu pertumbuhan tunas serta daun anis lebih tinggi dibandingkan dengan BAP atau kinetin. Konsentrasi optimum untuk menginduksi tunas dan daun anis secara *in vitro* adalah 3 mg/l.

Sampai minggu kedelapan, tunas dari seluruh perlakuan memperlihatkan pertumbuhan yang baik tetapi

mulai nampak gejala vitrifikasi. Untuk itu perlu disubkultur kembali atau segera diaklimatisasi. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk memacu perakaran sehingga diperoleh tunas dengan vigor yang baik untuk meningkatkan keberhasilan aklimisasinya di lapangan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Saudara Esty Rahmianti serta semua pihak yang telah berpartisipasi dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan naskah.

DAFTAR PUSTAKA

- Devlin, R.M., 1975. Plant Physiology. 3rd Edition. D. Van Nostrand Company. New York Cincinnati Toronto London Melbourne. 495 - 503.
- Gati, E., I. Mariska dan D. Sukmadjaja. 1990. Pelestarian Tanaman Obat Langka Purwoceng Secara *In vitro*. Dalam: Prosiding Simposium I Hasil Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri. Bogor. 957 - 961.
- Guenther, E., 1990. Minyak Atsiri. Penerjemah: S. Ketaren dan R. Mulyono J. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta. 635 - 717
- Hornok, L., 1992. Cultivation and Processing of Medicinal Plants. University of Horticultural Sciences, Budapest. John Wiley and Sons. Chichester. New York. Brisbane. Toronto. Singapore. 143 - 147
- Huetteman, C.A. and J.E. Preece, 1992. Thidiazuron: A Potent Cytokinin For Woody Plant Tissue Culture. In: Plant Cell. Tissue and Organ Culture. Kluwer Academic Publishers. Printed in Netherlands. 105 - 109.
- Lu, C.J., 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In vitro* Cell. Dev. Biol 29 92 - 96.
- Mok M.C., D.W Mok, E.T Janet, and C.M. Cesar. 1987 Biological and Biochemical Effects of Cytokinin Active Phenylurea Derivatives in *Tissue Culture Systems*. Department of Horticulture, Oregon State University, Corvallis. 1194 - 1196.
- Mok MC and D.W Mok., 1985. The metabolism of [¹⁴C]-thidiazuron in callus cultures of *Phaseolus lunatus*. *Physiol Plants* 65 427 - 432
- Salisbury B.F. and C.W Ross., 1995. Fisiologi Tumbuhan Jilid 3. Terjemahan: DR. Lukman dan Sumaryono. Penerbit ITB Bandung. 238 - 255.
- Stephens, J. M., 1994. Anis *Pimpinella anisum* L. http://medis.ifas.ufl.edu/body_mv008.
- Sukmadjaja, D., dan I. Mariska, 1989. Perkembangan Penelitian Bioteknologi Kultur Jaringan Tanaman Rempah dan Obat. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Bogor. 4 hal.
- Thomas, J.C., and F.R.Katterman, 1986. Cytokinin Activity Induced by Thidiazuron, *Plant Physiol.* 81 681 - 683.

Wattimena, G.A., L.V Gunawan, dan N.M. Wiendi, 1991. Perbanyakan Tanaman. Bioteknologi Tanaman I. PAU IPB. 120 hal.

Winarsih, S., Priyono, dan Zainudin, 1998. Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap perbanyakan Lili secara *in vitro*. Jurnal Hortikultura Vol. 8 (3): 110 - 116.