

PENGARUH MEDIA DAN ZAT PENGATUR TUMBUH TERHADAP MULTIPLIKASI TUNAS SELASIH (*Ocimum basilicum*) *IN VITRO*

SITTI FATIMAH SYAHID dan ENDANG HADIPOENTYANTI

Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatika
Jl. Tentara Pelajar No. 3 Bogor 16111

ABSTRAK

Selasih (*Ocimum basilicum*) merupakan salah satu tanaman penghasil minyak atsiri yang berkhasiat obat maupun pestisida nabati. Untuk mendukung pengembangan peningkatan ragam genetik tanaman, maka dilakukan perbanyakan bahan tanaman melalui teknik kultur *in vitro*. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Maret sampai Desember 2004 di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Bogor. Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah mata tunas selasih daun ungu yang berasal dari rumah kaca. Perlakuan yang diuji adalah pengaruh fisik media dan beberapa taraf konsentrasi zat pengatur tumbuh Benzyl Adenin (BA). Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dalam pola faktorial (dua faktor). Faktor pertama adalah fisik media (padat dan cair) dan faktor ke dua adalah konsentrasi BA (0,1 ; 0,3 dan 0,5 mg/l). Setiap perlakuan terdiri dari sepuluh ulangan. Parameter yang diamati adalah jumlah tunas, panjang tunas, jumlah daun dan akar serta penampakan biakan secara visual, umur sembilan minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan media padat yang diperkaya BA 0,3 mg/l menghasilkan jumlah tunas terbanyak yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan media padat + BA 0,1 mg/l ataupun media cair + BA (0,1 – 0,5 mg/l). Panjang tunas hanya dipengaruhi oleh perlakuan konsentrasi BA dan tunas terpanjang diperoleh pada perlakuan BA 0,3 mg/l yang tidak berbeda nyata dengan BA 0,1 mg/l. Untuk parameter jumlah daun dan akar tidak dipengaruhi oleh perlakuan yang diuji baik fisik media maupun konsentrasi BA.

Kata kunci : Selasih, *Ocimum basilicum*, media, pengatur tumbuh, multiplikasi tunas, *in vitro*, Jawa Barat

ABSTRACT

Effect of media and growth regulator on shoot multiplication of ocimum (Ocimum basilicum) in vitro

Ocimum (*Ocimum basilicum*) is one of important essential oil plants in Indonesia which is generally used as medicine or pesticide. For plant development and genetic variants improvement, tissue culture propagation was conducted. The studies was conducted in March to December 2004 at the Tissue Culture Laboratory of the ISMECRI Bogor. Plant materials used were ocimum explants apical shoot taken from a green house. Treatments tested were the effect of physical media and concentration level of Benzyl Adenin (BA). The experiment used a completely randomized design with two factors. First factor was physical media (solid and liquid) and the second factor was BA concentrations (0.1 ; 0.3 and 0.5 mg/l). Each treatment consisted of ten replications. The parameters observed were number of shoots, shoot length, number of leaves and roots and culture performance, nine weeks after culturing. Research result showed that the use of solid media in combination with 0.3 mg/l BA was the best media for shoot multiplication of ocimum *in vitro* and it was not significantly different with liquid medium enriched with BA (0.1 -0.5 mg/l). Shoot length was only affected by BA concentration and the longest shoot was obtained by BA 0.3 mg/l but it was not significantly different with BA 0.1 mg/l. Both treatments had no effect on the number of leaves and roots.

Key words : Ocimum, *Ocimum basilicum*, media, growth regulator, shoot multiplication, *in vitro*, West Java

PENDAHULUAN

Selasih (*Ocimum basilicum*) merupakan salah satu tanaman penghasil minyak atsiri yang juga berkhasiat obat, di samping kegunaan lain sebagai pengharum, bumbu masak dan bahan baku pestisida nabati.

Bagian tanaman yang berkhasiat dari selasih adalah daun dan bijinya. Daun selasih sering digunakan sebagai obat penurun panas, pencegah mual, penambah nafsu makan, antipiretik, demam dan encok. Sedangkan bijinya berkhasiat untuk obat sembelit, sesak nafas, penyegar dan penyejuk (BURKILL, 1939; HEYNE, 1950; HADIPOENTYANTI, 1994). Manfaat lain dari selasih adalah minyak atsirinya yang bersifat anti jamur terhadap *Aspergillus flavus* dan *A. parasiticum* (DUBE *et al.*, 1989).

Selasih dapat diperbanyak secara vegetatif (setek) dan generatif (biji). Walaupun diperbanyak secara generatif, ragam genetik tanaman masih tergolong rendah karena tanaman ini menyerbuk sendiri. Untuk meningkatkan ragam genetik suatu tanaman dapat ditingkatkan melalui mutasi buatan. Mutasi buatan dapat diinduksi secara kimia yakni dengan pemberian senyawa kimia seperti kolkhisin atau EMS. Sedangkan secara fisik dapat dilakukan dengan penyinaran sinar gamma (ISMACHIN, 1988). Respon mutasi secara buatan biasanya akan lebih tinggi bila eksplan yang diperlakukan berupa kalus. Untuk memperoleh kalus selasih *in vitro*, diperlukan kultur selasih steril yang tersedia secara *in vitro*. Untuk mendukung upaya tersebut, penelitian awal yang harus dilakukan adalah perbanyakan bahan tanaman secara *in vitro* yang salah satunya melalui multiplikasi tunas. Bila telah diperoleh multiplikasi tunas dalam jumlah yang banyak, maka tunas-tunas tersebut dapat diperlakukan untuk berbagai tujuan penelitian lanjutan seperti halnya induksi kalus untuk tujuan peningkatan keragaman genetik tanaman.

Keberhasilan perbanyakan melalui kultur *in vitro* ditentukan oleh banyak faktor, diantaranya adalah sumber eksplan, komposisi media kultur yang tepat berupa penggunaan media dasar dan komposisi zat pengatur tumbuh yang digunakan (MANTELL *et al.*, 1985). Sumber eksplan yang berbeda akan memberikan respon tumbuh yang berbeda. Media kultur yang dapat berupa media padat

ataupun cair juga berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur. Zat pengatur tumbuh adalah senyawa organik yang dalam konsentrasi rendah akan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan kultur. Dalam kultur *in vitro* biasanya zat pengatur tumbuh ini berfungsi sebagai pengatur pertumbuhan dan morfogenesis pada jaringan tanaman dan organ (GEORGE dan SHERRINGTON, 1984 ; GEORGE, 1993).

Benzyl Adenin (BA) merupakan salah satu jenis zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin yang sering digunakan dalam perbanyakan *in vitro*. BA paling banyak digunakan karena relatif lebih stabil, tidak mahal dan paling efektif dibandingkan sitokinin lainnya (SRIVASTAVA, 2002; ZAERR dan MAPES, 1982 ; HU dan WANG, 1983).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh fisik medium (padat dan cair) dan beberapa taraf zat pengatur tumbuh BA terhadap multiplikasi tunas selasih secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Maret sampai Desember 2004, di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor.

Bahan tanaman yang digunakan adalah mata tunas selasih (*O. basilicum*) daun ungu, berumur sekitar lima bulan yang berasal dari rumah kaca. Tunas-tunas tersebut lalu dipotong-potong sepanjang kurang lebih 1 cm, dicuci dengan larutan tyopol sebanyak 5 tetes dan ditiriskan di bawah air mengalir selama lima belas menit. Selanjutnya dilakukan sterilisasi permukaan dengan cara merendamnya dalam bahan sterilan antara lain larutan fungisida mankozeb 2 g/l selama 30 menit, lalu dibilas dengan aquades steril. Setelah itu tunas direndam dalam larutan alkohol 70% selama lima menit, dan dibilas aquades steril. Selanjutnya dilakukan perendaman dalam larutan bayclin 20% selama tujuh menit, dibilas dengan aquades steril dan terakhir dibilas aquades steril sebanyak tiga kali.

Tunas-tunas yang telah disterilisasi, kemudian ditanam pada media dasar Murashige dan Skoog (MS) yang terdiri atas hara makro dan mikro, ditambah sumber karbon (sukrosa) sebanyak 30 g/l. Ke dalam media diberikan zat pengatur tumbuh BA pada konsentrasi 0,1 mg/l, untuk mengetahui respon pertumbuhan tunas awal *in vitro*. Rancangan lingkungan yang digunakan adalah acak lengkap dengan pola faktorial (dua faktor). Setiap perlakuan terdiri dari sepuluh ulangan. Perlakuan yang diuji adalah pengaruh fisik media yaitu media padat (dengan penambahan agar sebanyak 8 g/l) dan media cair (tanpa agar) yang dikombinasikan dengan beberapa taraf konsentrasi zat pengatur tumbuh BA yaitu 0,1; 0,3 dan 0,5 mg/l. Kultur disimpan pada rak-rak kultur di dalam ruang inkubasi yang memiliki suhu 22°C-25°C, intensitas cahaya

sebesar 1000 lux dengan lama penyinaran sekitar 16 jam dalam sehari.

Parameter yang diamati adalah jumlah dan panjang tunas, jumlah daun dan jumlah akar dan penampakan kultur secara visual, umur sembilan minggu.

Analisis data dilakukan dengan prosedur GLM (General Linear Model). Uji lanjut dilakukan dengan uji BNJ dengan tingkat ketelitian 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil analisis statistik, terdapat interaksi antara fisik media dengan beberapa taraf konsentrasi zat pengatur tumbuh BA baik terhadap parameter jumlah tunas.

Jumlah Tunas

Penggunaan media baik padat maupun cair yang dikombinasikan dengan beberapa taraf konsentrasi BA menghasilkan interaksi yang nyata terhadap jumlah tunas selasih *in vitro* pada umur sembilan minggu (Tabel 1).

Interaksi antara penggunaan media padat diperkaya BA pada konsentrasi 0,3 mg/l menghasilkan jumlah tunas yang berbeda nyata dengan BA konsentrasi 0,5 mg/l. Pemberian BA pada konsentrasi 0,3 mg/l baik pada penggunaan media padat maupun cair menghasilkan jumlah tunas yang sama. Untuk tujuan perbanyakan selasih *in vitro* selanjutnya sebaiknya digunakan BA pada konsentrasi 0,3 mg/l karena konsentrasi lebih rendah sudah mampu menghasilkan tunas dalam jumlah banyak. (Gambar 1). Karena penggunaan media cair yang diperkaya BA 0,3 mg/l mampu menghasilkan tunas dalam jumlah banyak,

Tabel 1. Pengaruh interaksi antara fisik media dan beberapa taraf konsentrasi zat pengatur tumbuh BA, terhadap jumlah tunas selasih *in vitro*, umur sembilan minggu.

Table 1. Interaction between media and concentrations of BA on the number of shoots of ocimum, nine weeks after culturing

Media	Perlakuan Treatment (mg/l)		Jumlah tunas Number of shoots
	Konsentrasi BA	Concentration of BA	
Padat	0,1		2,7 ab
Padat	0,3		4,7 a
Padat	0,5		1,4 b
Cair	0,1		2,3 ab
Cair	0,3		3,7 ab
Cair	0,5		4,2 a
KKCV (%)			29,0

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap kolom untuk setiap parameter yang diamati, tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Note : Numbers followed by the same letters in each column for each parameter observed, are not significantly different at 5%



Gambar 1. Tunas-tunas selasih *in vitro* yang diperoleh pada perlakuan media cair + BA 0.3 mg/l.
Figure 1. Shoots of *ocimum* obtained from liquid medium enriched with 0.3 mg/l BA.

maka untuk perbanyakkan selanjutnya, sebaiknya digunakan media cair karena lebih ekonomis dalam biaya. Respon yang sama terhadap multiplikasi tunas berhubungan erat dengan kemampuan jaringan tanaman dalam menyerap nutrisi pada ke dua jenis fisik media yang berbeda. Pada kultur *in vitro* jahe, penggunaan media cair menghasilkan respon tumbuh yang lebih baik dibandingkan dengan media padat (MARISKA dan SYAHID, 1992), begitu juga dengan kultur *in vitro* *Allium sativum* L, multiplikasi tunas terbanyak dengan berat basah kultur tertinggi diperoleh pada penggunaan media cair yang diperkaya sitokinin (2-IP) pada konsentrasi rendah (KIM *et al.*, 2003).

Interaksi antara penggunaan media padat maupun cair pada konsentrasi BA 0,3 mg/l nyata meningkatkan jumlah tunas, namun penggunaannya pada konsentrasi tinggi 0,5 mg/l nyata menurunkan jumlah tunas yang dihasilkan. Dapat dikatakan disini bahwa konsentrasi BA 0,3 mg/l pada media padat maupun cair merupakan konsentrasi yang optimal untuk memacu produksi tunas dan peningkatan konsentrasi sampai BA 0,5 mg/l berdampak menghambat sehingga menurunkan jumlah tunas. Hasil yang sama ditemui pada kultur *in vitro* *Castanea mollissima* Blume, bahwa penggunaan media padat yang dikombinasikan dengan BA pada konsentrasi rendah 0,1 mg/l menghasilkan tunas lebih banyak dari pada konsentrasi tinggi 1,0 mg/l (QI-QUANG *et al.*, 1986), begitu juga pada kultur *in vitro* daun encok (*Plumbago zeylanica* Linn.) yang menghasilkan jumlah tunas terbanyak pada penggunaan zat pengatur tumbuh BA konsentrasi rendah

(0,25 mg/l) dan jumlah tunas menurun sejalan dengan meningkatnya konsentrasi BA dari 0,5 – 1,5 mg/l (ROUT *et al.*, 1999).

Interaksi antara penggunaan kombinasi media cair dengan konsentrasi BA tinggi 0,5 mg/l menghasilkan tunas dalam jumlah cukup banyak, namun perlakuan ini sebaiknya tidak dijadikan rekomendasi untuk perbanyakkan *in vitro* selasih karena konsentrasi BA yang digunakan cukup tinggi.

Panjang Tunas

Perlakuan fisik media tidak berpengaruh nyata terhadap parameter panjang tunas. Dalam penelitian ini panjang tunas dipengaruhi oleh konsentrasi BA yang diuji. Tunas terpanjang diperoleh pada perlakuan diperkaya BA pada konsentrasi 0,3 mg/l, yang tidak berbeda nyata dengan BA 0,1 mg/l (Tabel 2).

Penggunaan zat pengatur tumbuh BA pada konsentrasi rendah 0,1-0,3 mg/l menghasilkan laju pemanjangan paling tinggi dibandingkan dengan penggunaannya pada konsentrasi tinggi. Pada kultur *in vitro* selasih, peningkatan konsentrasi BA sampai 0,5 mg/l pada media padat maupun cair nyata menurunkan laju pemanjangan tunas. Dalam hal ini terlihat bahwa efektivitas zat pengatur tumbuh pada konsentrasi tinggi lebih menghambat ke arah pemanjangan sel. Benzyl Adenine (BA) merupakan sitokinin dengan daya aktif kuat yang dapat membantu pembelahan sel ke arah samping yang efektif memacu pemanjangan sel pada

Tabel 2. Pengaruh beberapa taraf konsentrasi zat pengatur tumbuh BA, terhadap panjang tunas selasih *in vitro*, umur sembilan minggu
 Table 2. Effect of several concentrations of BA on shoots length of ocimum, nine weeks after culturing

Perlakuan Treatment (mg/l)	Panjang tunas Shoot length (cm)
BA 0,1	4,7 ab
BA 0,3	5,4 a
BA 0,5	3,8 b
KK CV (%)	21,0

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap kolom untuk setiap parameter yang diamati, tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Note : Numbers followed by the same letters in each colom for each parameter observed, are not significantly different at 5%

konsentrasi rendah. Hal yang sama ditemui pada multiplikasi tunas *in vitro* tanaman lavender (*Lavandula vera*) dan tapak dara *in vitro* (*Catharanthus rosea* L) bahwa penggunaan media yang diperkaya BA pada konsentrasi rendah menghasilkan laju pemanjangan tunas paling tinggi (ANDRADE *et al.*, 1999; YELNITITIS *et al.*, 2000).

Jumlah Daun dan Akar

Dari hasil analisa secara statistik, tidak terdapat pengaruh perlakuan faktor tunggal jenis media maupun konsentrasi zat pengatur tumbuh terhadap parameter jumlah daun dan akar (Tabel 3 dan 4).

Tabel 3. Pengaruh fisik media terhadap jumlah daun dan akar selasih *in vitro*, umur sembilan minggu
 Table 3. Effect of media on the number of leaves and roots of ocimum nine weeks after culturing

Perlakuan Treatment	Jumlah daun Number of leaves	Jumlah akar Number of roots
Media padat solid	11,00	22,78
Media cair liquid	10,89	23,67
KK CV (%)	16,3	23,0

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap kolom untuk setiap parameter yang diamati, tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Note : Numbers followed by the same letters in each column for each parameter observed, are not significantly different at 5%

Tabel 4. Pengaruh beberapa taraf konsentrasi BA terhadap jumlah daun dan akar selasih *in vitro*, umur sembilan minggu.
 Table 4. Effect of BA concentration on the number of leaves and roots of ocimum, nine weeks after culturing

Perlakuan Treatment (mg/l)	Jumlah daun Number of leaves	Jumlah akar Number of roots
BA 0,1	11,00	26,83
0,3	11,83	24,00
0,5	10,00	18,83
KK CV (%)	16,3	23,0

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap kolom untuk setiap parameter yang diamati, tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Note : Numbers followed by the same letters in each column for each parameter observed, are not significantly different at 5%

Penggunaan media padat maupun cair dengan penambahan konsentrasi BA (0,1 - 0,3 mg/l) menghasilkan jumlah daun maupun akar yang sama jumlahnya dalam waktu sembilan minggu. Dalam hal ini dapat dikatakan bahwa proses pembentukan daun dapat terjadi baik pada penggunaan media padat maupun media cair serta pemberian konsentrasi BA mulai dari konsentrasi rendah 0,1 mg/l sampai konsentrasi 0,5 mg/l. Penambahan zat pengatur tumbuh BA mulai dari konsentrasi rendah 0,1 mg/l sampai 0,5 mg/l tidak mempengaruhi jumlah daun yang diperoleh berarti kisaran konsentrasi tersebut memberikan respon yang sama. Hal lain yang memungkinkan ini terjadi adalah karena jumlah daun yang diperoleh cukup banyak pada umur sembilan minggu, penghitungan jumlahnya saat pengamatan hampir sama banyaknya sehingga menghasilkan rata-rata yang tidak berbeda nyata.

Begitu juga dengan parameter jumlah akar, terlihat bahwa penggunaan media padat maupun cair yang diperkaya BA 0,1 - 0,3 mg/l menghasilkan jumlah akar yang sama banyaknya dalam waktu sembilan minggu. Berarti penggunaan media, baik cair maupun padat yang diperkaya BA pada konsentrasi 0,1 - 0,3 mg/l mampu menghasilkan jumlah akar yang banyak pada kultur selasih *in vitro*. Akar dapat terbentuk secara spontan pada media padat maupun cair yang diperkaya sitokinin (Benzyl Adenin) walaupun tanpa diberikannya sumber auksin secara eksogen ke dalam media perlakuan, yang biasanya berfungsi untuk menginduksi perakaran kultur. Hal ini dapat diterangkan bahwa dalam jaringan tanaman terdapat sumber auksin endogen yang cukup tinggi sehingga proses pembentukan akar dapat langsung terjadi tanpa diperlukannya pasokan auksin secara eksogen. Hal yang sama juga ditemui pada kultur *in vitro* kumis kucing, jahe dan kunyit (SYAHID *et al.*, 2000; MARISKA dan SYAHID, 1992). Hal ini merupakan suatu keuntungan dalam perbanyakan kultur *in vitro* karena akar dapat terbentuk hanya dalam satu media. Secara umum banyaknya akar yang dihasilkan berhubungan erat dengan jumlah tunas. Auksin diproduksi di pucuk dan ditranslokasikan secara basipetal sehingga akan memacu pembentukan akar (PIERIK, 1987).

Dari hasil penelitian ini terlihat bahwa penggunaan baik media padat maupun cair memberikan respon yang sama. Namun berpengaruh terhadap tingkat sterilitas kultur. Pada media padat tidak ditemui populasi bakteri yang berwarna orange sedangkan pada media cair seiring dengan meningkatnya umur kultur dan BA tinggi, memperlihatkan adanya populasi di beberapa botol kultur.

Dengan diperolehnya kultur *in vitro* selasih, maka tujuan penelitian selanjutnya dalam upaya peningkatan keragaman genetik tanaman akan lebih mudah dilakukan karena kultur steril yang tersedia dapat digunakan untuk berbagai macam kegiatan diantaranya keragaman somaklonal melalui kultur kalus, baik secara tunggal maupun kombinasi dengan perlakuan mutagen baik secara fisik dengan radiasi sinar gamma ataupun secara kimiawi dengan

cara memberikan mutagen kimia ke dalam media tumbuh seperti colchisin ataupun EMS (Ethyl Methano Sulfat). Di samping itu lamanya periode kultur biasanya juga berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur yang juga dapat menginduksi mutasi.

KESIMPULAN

Untuk multiplikasi tunas selasih *in vitro*, sebaiknya digunakan media cair + BA 0,3 mg/l karena lebih efisien dalam biaya. Perlakuan zat pengatur tumbuh BA (0,1-0,3 mg/l) menghasilkan tunas terpanjang. Perlakuan fisik media maupun konsentrasi BA tidak berpengaruh terhadap parameter jumlah daun dan akar. Perakaran *in vitro* selasih dapat diperoleh pada media yang hanya diperkaya sitokinin (BA), tanpa diperlukannya pasokan sumber auksin secara eksogen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr Elna Karmawati, Dr Zainal Mahmud dan Dr Supriadi atas saran dan perhatiannya dalam analisa statistik, serta Dedi Surachman atas bantuannya dalam pembuatan media selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- ANDRADE, L.B., S.ECHEVERRIGARAY., F. FRACARO., G.F. PAULETTI and L. ROTA. 1999. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 56 : 79-83.
- BURKILL, I.H. 1939. A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula. Government of the Straits Settlement and Federal Malay States. Vol. II: 2042p.
- DUBE, S., P.D. UPADHYAY and S.C. TRIPATHI. 1989. Anti fungalphysicochemical and insect-repelling activity of the essential oil of *Ocimum basilicum*. Canadian J. Botany. 67(7) : 2085-2087.
- GEORGE, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. Edington, Wilts, Exegetics Ltd, BA 134QG, England. 574p.
- GEORGE, E.F and P.D. SHERRINGTON, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics, Ltd, Everleys, Basingstoke, England. 709p.
- HADIPOENTYANTI, E. 1994. Keragaman genetik tanaman kemangi (*Ocimum* spp.). Makalah Temu Kerja Plasma Nutfah di LPRI Bogor, 30 Maret 1994. 15p.
- HEYNE, K. 1950. De Nuttige Planten Van Indonesie (Tumbuhan Berguna Indonesia). Terjemahan Bahasa Indonesia 1987. Badan Litbang Kehutanan Jakarta. p.608-610.
- HU, C.Y and P.J. WANG, 1983. Meristem shoot tip and bud culture. p.177-227. In: D.A. Evans., W.R. Sharp., P.V. Amirato and Y. Yamada (eds.). Handbook of Plant Cell Culture. Vol I. Techniques for propagation and breeding. Mc Millan Publ.Co, London.
- ISMACHIN, M. 1988. Pemuliaan Tanaman dengan Mutasi Buatan. Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, BATAN, Jakarta. 30p.
- KIM, E.K., E.J. HAHN., H.N. MURTHY and K.Y. PAEK, 2003. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73 : 231-236.
- MARISKA, I dan S. F. SYAHID, 1992. Perbanyakan vegetatif melalui kultur jaringan pada tanaman jahe. Buletin Littri (4) : 1-5.
- MANTELL, S.H., J.A. MATTHEWS and R.A. MCKEE, 1985. Principle of Plant Biotechnology. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 269p.
- PIERIK, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publ., Lancaster. 344p.
- QI-QUANG, Y., P.E. READ., C.D. FELLMAN and M.S. HOSIER. 1986. Effect of Cytokinin, IBA, and rooting regime on Chinese Chestnut cultured *in vitro*. Hort Science : 21(1): 133-134.
- ROUT, G.R., C. SAXENA., S. SAMANTARAY and P. DAS, 1999. Rapid clonal propagation of *Plumbago zeylanica* Linn. Plant Growth Regulation. 28 : 1-4.
- SRIVASTAVA, L.M. 2002. Plant Growth and Development. Hormones and Environment. Academic Press. An imprint of Elsevier Science. California, USA. 772p.
- SYAHID, S. F., AMALIA., C. SYUKUR dan N. BERMAWIE, 2000. Pengaruh fisik media dan konsentrasi Benzyl Adenin terhadap pertumbuhan kunyit (*Curcuma domestica*) *in vitro*. Jurnal Ilmiah Pertanian Gakuryoku. VI (1) : 13-15.
- YELNITIS., N. BERMAWIE dan D. SURACHMAN, 2000. Pengaruh BA dan Thidiazuron terhadap inisiasi dan multiplikasi tunas tapak dara. Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. XI (2) : 11-18.
- ZAERR, J.B and M.O. MAPES, 1982. Action of growth regulator, p. 231-249. In: J.M. Bonga and D.J. Durzan (Eds.). Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff. Publ. Amsterdam.

