

**INDUKSI EMBRIO SOMATIK KACANG TANAH
PADA BERBAGAI MACAM VITAMIN DAN SUKROSA**

***PEANUT EMBRYO SOMATIC INDUCED
ON SEVERAL VITAMINS AND SUCROSE***

Rina Srilestari¹

ABSTRACT

More variable usage of peanut lead to increasing demand of peanut by year to year. At present, peanut national demand can not be met by domestic production. Regeneration of peanut plant through somatic embryogenesis is the most effective way for plant propagation. Somatic embryogenesis is an embryo development not resulted from fusion of gametes but from any somatic cell.

Research on peanut somatic embryogenesis so far is quite limited, so this research aimed to determine what combination of vitamin and sucrose is the most effective in promoting peanut somatic embryogenesis.

A 2 x 3 factorial experiment augmented was initiated in completely randomized design. The first factor, B₅ and MS vitamin. The second one is sucrose concentration which ranged from 20, 30 and 40 g/l. Collected data were subjected to an analysis of variance followed by mean separation based on Duncan's Multiple Range Test.

The result showed that application of B₅ vitamin and 40 g/l sucrose produced somatic embryo at considerable number in relatively short time and there is not any interaction between them.

Key words: Embryogenesis somatic, peanut, B₅ vitamin and sucrose.

INTISARI

Penggunaan kacang tanah yang semakin beragam mengakibatkan permintaan kacang tanah semakin meningkat dari tahun ke tahun. Sampai saat ini kebutuhan kacang tanah secara nasional belum dapat dipenuhi dari produksi dalam negeri. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik merupakan cara yang paling efektif dan efisien dalam perbanyakan tanaman. Embriogenesis somatik merupakan proses terbentuknya embrio tanpa melalui fusi sel gamet tetapi berkembang hanya dari sel somatik.

Penelitian mengenai embriogenesis somatik pada kacang tanah sejauh ini belum banyak dilakukan, sehingga penelitian ini bertujuan untuk menentukan macam vitamin dan konsentrasi sukrosa yang paling baik bagi perkembangan embrio somatik kacang tanah.

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian UPN "Veteran" Yogyakarta pada bulan Desember 2003 sampai Mei 2004 dengan menggunakan rancangan faktorial yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL).

¹ Fakultas Pertanian UPN "Veteran" Yogyakarta

Faktor pertama adalah perlakuan macam vitamin yaitu vitamin B₅ dan MS, sedangkan faktor kedua adalah sukrosa dengan konsentrasi 20 g/l, 30 g/l dan 40 g/l. Parameter yang diamati meliputi persentase eksplan yang mampu membentuk embrio, saat tumbuh embrio dan jumlah embrio. Data dianalisis dengan analisis varian 5 % dan apabila ada beda nyata diuji dengan DMRT 5 % (Duncan Multiple Range Test).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa media dengan vitamin B₅ dan sukrosa 40 g/l mampu menghasilkan embrio terbanyak dalam waktu relatif singkat tetapi antara kedua perlakuan tidak ada interaksi.

Kata kunci: Embriogenesis somatik, kacang tanah, vitamin B₅, dan sukrosa.

PENDAHULUAN

Di Indonesia, kacang tanah (*Arachis hypogaea* (L.) Merr) sebagian besar ditanam oleh petani di tegalan dan lahan tadah hujan (70%) dan sisanya (30%) ditanam di sawah yang berpengairan setelah padi. Komoditas kacang tanah memiliki nilai strategis untuk meningkatkan kesejahteraan petani. Di dalam negeri, kebutuhan kacang tanah terus meningkat baik untuk bahan pangan maupun untuk bahan baku industri (Heriyanto dan Subagio, 1998).

Penggunaan kacang tanah yang semakin beragam mengakibatkan permintaan kacang tanah semakin meningkat dari tahun ke tahun. Produktivitas rata-rata nasional kacang tanah pada kurun waktu 1997-2001 adalah 1,07 ton per hektar yang berasal dari luas panen 648.520 hektar (Anonim, 2001).

Produksi kacang tanah pada tahun 2000 dan 2001 mencapai 736,5 ribu ton dan 709,8 ribu ton biji kering, sedang untuk tahun 2002 sebesar 713 ribu ton. Penurunan produksi ini semakin tidak dapat memenuhi konsumsi kacang tanah yang mengalami peningkatan konsumsi kacang tanah rata-rata 4,2 % per tahun Anonim (2002). Konsumsi kacang tanah pada tahun-tahun mendatang akan semakin meningkat sejalan dengan peningkatan jumlah penduduk, kebutuhan gizi masyarakat, diversifikasi pangan dan peningkatan kapasitas industri (Sukmadinata, 1996).

Rendahnya produksi nasional kacang tanah, disamping karena luas areal pertanaman yang masih terbatas, juga karena produktivitasnya per satuan luas masih rendah. Hal ini antara lain diakibatkan oleh penggunaan benih yang bermutu rendah dan oleh adanya serangan penyakit.

Bioteknologi nampaknya dapat menjadi alternatif untuk menjawab berbagai permasalahan tersebut. Penggunaan teknik tersebut antara lain sangat tergantung pada keberhasilan sistem regenerasi tanaman melalui teknik kultur jaringan. Untuk jangka panjang, perbanyakkan tanaman secara *in vitro* diharapkan dapat membantu mengatasi kesulitan penyediaan bibit kacang tanah secara konvensional.

Perbanyakkan *in vitro* tanaman dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan organogenesis dan embriogenesis somatik. Dibandingkan dengan teknik organogenesis, regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik memiliki beberapa keunggulan karena mampu menghasilkan embrio bipolar dari sel atau jaringan vegetatif (Litz dan Gray, 1995). Embrio somatik dapat diinduksi secara langsung dari jaringan eksplan atau secara tidak langsung melalui fase kalus.

Macam vitamin yang digunakan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan secara *in vitro*. Untuk embriogeneis somatik umumnya digunakan vitamin B₅. Beberapa hasil penelitian penggunaan vitamin B₅ dapat menghasilkan embrio somatik lebih banyak antara lain pada tanaman kopi arabika (Priyono, 1993), rotan (Gunawan dan Wiendi, 1992), kedelai (Ratnadewi *et al.*, 1996) dan lada liar (Husni *et al.*, 1997).

Komponen penting lain yang diketahui dapat mempengaruhi induksi embrio somatis adalah dengan cara memodifikasi konsentrasi sukrosa dalam media (Lazzeri *et al.*, 1988). Menurut Pierik (1987) serta George dan Sherrington (1984), sukrosa dalam media berfungsi sebagai sumber energi dan untuk keseimbangan tekanan osmotik media.

Usaha untuk meningkatkan jumlah embrio melalui teknik kultur jaringan dapat dilakukan dengan cara memanipulasi komposisi media, seperti macam vitamin dan sukrosa.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui macam vitamin dan konsentrasi sukrosa yang terbaik untuk induksi embrio kacang tanah.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Pembangunan Nasional “Veteran” Yogyakarta dari bulan Desember 2003 sampai dengan Mei 2004.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas benih kacang tanah varietas lokal Bantul, media MS (Murashige dan Skoog), agar sebagai bahan pematat (difco agar), sukrosa, zat pengatur tumbuh (2,4-D), desinfektan (agrimycin, benlate, alkohol 70%, bayclin 50%, sublimat 0,1%), akuades steril dan detergent.

Alat-alat yang digunakan terdiri dari peralatan gelas (botol kultur, gelas piala, cawan petri, gelas ukur dan corong gelas), timbangan analitis, pH meter, *autoclave*, *Laminar Air Flow* (LAF) yang dilengkapi dengan lampu UV, ruang inkubasi dengan AC, alat diseksi seperti pinset, pisau dan skalpel, kertas tissue, lampu spiritus, botol sprayer, rak kultur dengan lampu 40 watt, kertas saring dan *aluminium foil*.

Penelitian dilaksanakan dengan menggunakan Rancangan Faktorial 2 x 3 yang disusun dalam rancangan acak lengkap.

Faktor pertama adalah macam vitamin yang terdiri atas dua aras yaitu :

V1 = Vitamin B₅

V2 = Vitamin MS

Faktor kedua adalah konsentrasi sukrosa yang terdiri atas tiga aras yaitu:

S2 = 20 g/l sukrosa

S3 = 30 g/l sukrosa

S4 = 40 g/l sukrosa

Dari kedua faktor tersebut didapatkan 6 kombinasi perlakuan. Tiap perlakuan diulang sebanyak 10 kali dan setiap ulangan terdiri dari satu botol kultur dengan 3 eksplan. Tanaman sampel diambil dari 4 botol.

Data hasil pengamatan dianalisis dengan Anova pada jenjang nyata 5%. Apabila ada beda nyata antar perlakuan maka pengujian dilakukan dengan Duncan Multiple Range Test (DMRT) pada taraf 5%.

Benih kacang tanah dipanen pada umur 50 hari setelah tanam. Polong dicuci di bawah air mengalir sebelum disterilkan permukaannya. Polong yang sudah dicuci direndam dalam larutan yang mengandung 2 g detergent, 2 g agrymicin dan 2 g benlate selama 1 jam. Polong dibilas sampai bersih disterilkan dengan bayclin 50% dan digojok dengan shaker selama 30 menit dengan kecepatan 400 rpm dilanjutkan dengan HgCl₂ (sublimat) 0,1% dan digojok selama 15 menit. Sebagai penutup polong dibilas 4-5 kali dengan akuades steril di dalam *Laminar Air Flow*. Polong dikupas di cawan petridish dan diambil kotiledonnya. Kotiledon kemudian ditanam pada media sesuai perlakuan. Parameter yang diamati meliputi persentase eksplan yang tumbuh menjadi embrio, saat muncul embrio dan jumlah embrio per eksplan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis dengan sidik ragam pada jenjang nyata 5 % pada parameter saat munculnya embrio dan jumlah embrio tidak menunjukkan adanya interaksi.

Pada parameter persentase eksplan yang mampu membentuk embrio (tabel 1) dapat dilihat bahwa pada semua kombinasi perlakuan macam vitamin dan sukrosa, semua eksplan dapat menghasilkan embrio. Sukrosa pada konsentrasi antara 20 – 40 g/l mampu berfungsi sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan embrio. Menurut Winata (1988) konsentrasi optimum sukrosa yang dapat memacu perkembangan embrio dan kultur pucuk antara 2% - 4%, namun dalam embriogenesis somatik kacang tanah konsentrasi gula dapat mencapai 6% (Eapen dan George, 1993).

Tabel 1. Persentase Eksplan yang Mampu Membentuk Embrio

Perlakuan	Persentase Eksplan yang Mampu Membentuk Embrio
Vitamin B ₅ + 20 g/l Sukrosa	100
Vitamin B ₅ + 30 g/l Sukrosa	100
Vitamin B ₅ + 40 g/l Sukrosa	100
Vitamin MS + 20 g/l Sukrosa	100
Vitamin MS + 30 g/l Sukrosa	100
Vitamin MS + 40 g/l Sukrosa	100

Karbohidrat terutama sukrosa merupakan komponen yang selalu ada dalam media tumbuh. Dari penelitian Eapen dan George (1993) pada embriogenesis somatik kacang tanah diperoleh hasil bahwa sukrosa adalah yang paling baik kemudian diikuti oleh fruktosa, glukosa dan maltosa. Glukosa dan fruktosa sebagai hasil hidrolisis sukrosa dapat merangsang pertumbuhan beberapa jaringan.

Penambahan vitamin pada medium dapat mempercepat pertumbuhan dan diferensiasi embrio. Vitamin yang banyak digunakan adalah vitamin B₁ (tiamin), vitamin B₃ (asam nikotinat) dan vitamin B₆ (piridoksin). Pada kedua macam vitamin yang digunakan (vitamin B₅ dan vitamin MS) ternyata semua eksplan respon dalam pembentukan embrio, karena pada masing-masing vitamin tersebut mengandung tiamin, asam nikotinat dan piridoksin. Diantara ketiga golongan vitamin tersebut ternyata hanya

tiamin (vitamin B₁) yang secara umum digunakan. Dalam banyak kasus piridoksin, asam nikotinat atau glisin hanya diperlukan dalam jumlah yang kecil (Murashige dan Skoog, 1984). Hal ini sejalan pula dengan Wattimena (1992) yang mengatakan bahwa tiamin merupakan komponen penting dalam metabolisme sel yang dibutuhkan hampir semua kultur.

Tabel 2. Rerata Saat Munculnya Embrio pada Berbagai Macam Vitamin dan Sukrosa (Hari)

Perlakuan	Sukrosa			Rata-rata
	20 g/l	30 g/l	40 g/l	
Vitamin B ₅	14,50	14,20	5,70	11,46 p
Vitamin MS	17,90	17,40	8,80	14,70 q
Rata-rata	16,20 b	15,80 b	7,25 a	(-)

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata
(-) Tidak ada interaksi

Dari hasil dan analisis hasil dapat diketahui bahwa perlakuan macam vitamin dan sukrosa menunjukkan pengaruh yang nyata pada saat munculnya embrio dan jumlah embrio tetapi antara keduanya tidak ada interaksi. Konsentrasi sukrosa 20 g/l sampai dengan 40 g/l mampu menumbuhkan embrio pada semua eksplan. Hal ini disebabkan sukrosa merupakan sumber karbon yang terbaik, yang berperan sebagai bahan baku yang menghasilkan energi dalam proses respirasi (Katuuk, 1984).

Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa pada media yang mengandung 40 g/l sukrosa, embrio muncul lebih cepat dibandingkan pada media dengan 20 g/l dan 30 g/l sukrosa. Keberhasilan dalam kultur jaringan tanaman sangat tergantung pada media yang digunakan. Media kultur jaringan tanaman tidak hanya menyediakan unsur hara makro dan mikro tetapi juga karbohidrat yang pada umumnya berupa gula. Gula ini merupakan sumber karbon sebagai pengganti karbon yang biasanya didapat tanaman dari atmosfer dalam bentuk CO₂ yang menjadi komponen untuk fotosintesis (Winata, 1988). Menurut George dan Sherrington (1984), sukrosa merupakan sumber karbon penting yang digunakan sebagai penyusun sel. Dengan adanya sukrosa yang cukup, maka pembelahan sel, pembesaran sel dan diferensiasi sel selanjutnya dapat berlangsung dengan baik.

Tabel 3. Jumlah Embrio

Perlakuan	Sukrosa			Rata-rata
	20 g/l	30 g/l	40 g/l	
Vitamin B ₅	12,20	12,80	20,50	15,16 q
Vitamin MS	10,20	10,80	16,10	12,36 p
Rata-rata	11,20 a	11,80 a	18,3 b	(-)

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom dan baris yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata
(-) Tidak ada interaksi

Pada media yang banyak mengandung sukrosa akan lebih pekat dari pada yang sedikit mengandung sukrosa. Media dengan konsentrasi pekat berarti banyak terdapat molekul-molekul, sehingga arah gerakan difusi adalah ke tempat yang kekurangan molekul atau yang berkonsentrasi rendah. Keadaan demikian menyebabkan sel-sel pada jaringan eksplan yang ditumbuhkan pada media dengan penambahan sukrosa 40 g/l dapat lebih cepat menerima unsur-unsur hara yang diperlukan bagi perkembangannya. Disamping itu, sukrosa bila disterilisasi pada suhu yang sesuai akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa. Glukosa merupakan sumber kekuatan bagi sel untuk tumbuh dan berkembang membentuk sel-sel baru, sehingga tumbuh embrio. Oleh karena itu konsentrasi sukrosa 40 g/l menyebabkan embrio dapat muncul lebih cepat (7,25 hari) dan jumlahnya lebih banyak (18,3) dibandingkan dengan kadar 20 g/l dan 30 g/l.

Hal ini sejalan dengan penelitian embrio somatik kedele oleh Komatsuda, *et al.* (1992) yang menyatakan bahwa untuk perkembangan lebih lanjut embrio somatik dalam media kultur diperlukan sukrosa 4%. Demikian pula oleh Lazzeri *et al.* (1988) mengatakan bahwa sukrosa 5% dapat menginduksi embrio somatik paling cepat dan paling banyak pada kacang tanah.

Komposisi vitamin B₅ dan vitamin MS terdapat perbedaan yang cukup besar (10 kali lipat) pada jumlah tiamin (vitamin B₁). Pada vitamin B₅ jumlah tiamin sebesar 10 mg/l sedangkan pada vitamin MS jumlah tiamin hanya sebesar 1 mg/l. Sedangkan jumlah asam nikotinat dan piridoksin pada vitamin B₅ sebesar dua kali lipat dari vitamin MS.

Dari tabel 2 dan 3 dapat dilihat bahwa media yang mengandung vitamin B₅ menghasilkan embrio lebih banyak (15,16) dalam waktu yang lebih singkat (11,46 hari) dibandingkan vitamin MS. Kandungan tiamin pada vitamin B₅ yang lebih besar dibandingkan pada vitamin MS inilah yang menyebabkan jumlah embrio yang terbentuk lebih banyak dalam waktu yang singkat.

Tiamin merupakan vitamin yang esensial untuk hampir semua kultur jaringan tumbuhan untuk mempercepat pembelahan sel. Tiamin berfungsi sebagai koenzim dalam metabolisme karbohidrat. Menurut Suseno *cit.* Widiastoety dan Syafril (1992) tiamin berfungsi sebagai koenzim yang merangsang aktivitas hormon yang terdapat dalam jaringan tanaman. Selanjutnya hormon tersebut akan mendorong pembelahan sel-sel baru. Peranan tiamin sebagai koenzim dapat meningkatkan proses metabolisme sehingga pertumbuhan organ-organ dapat ditingkatkan.

Menurut Wattimena (1992) tiamin merupakan komponen penting dalam metabolisme sel yang dibutuhkan pada hampir semua kultur. Pemberian tiamin akan dapat memacu embriogenesis somatik jaringan yang dikulturkan. (Wetzstein dan Baker, 1993).

Hal ini sejalan dengan penelitian Komatsuda *et al.* (1992) pada tanaman kedelai bahwa dengan penggunaan vitamin B₅ pada media dapat meningkatkan jumlah embrio dan berat segar embrio somatik.

Demikian pula pada penelitian Dewi *et al.* (1997) didapatkan jumlah embrio yang banyak dalam waktu yang relatif singkat pada tanaman kacang tanah dengan menggunakan vitamin B₅.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan :

1. Media MS dengan vitamin B₅ dapat menghasilkan embrio terbanyak (15,16) dan dalam waktu yang singkat (11,46 hari).
2. Media MS dengan konsentrasi sukrosa 40 g/l dapat menghasilkan embrio terbanyak (18,3) dan dalam waktu yang singkat (7,25 hari).
3. Tidak terdapat interaksi antara perlakuan macam vitamin dan sukrosa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat UPN “Veteran” Yogyakarta yang telah memberikan bantuan dana penelitian sehingga penelitian ini dapat berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2001. *Statistik Indonesia*. Biro Pusat Statistik. Jakarta.
- Anonim. 2002. *Indikator Ekonomi*. Buletin Statistik Bulanan. Biro Pusat Statistik. Jakarta.
- Dewi, I., S.J. Harjosudarmo, dan R. G. Birch. 1997. The Effect of 2,4-D, NAA and Picloram on Somatic Embryo Genesis and Plant Regeneration From Immature Peanut Seed. *J. Biotek Pertanian* 2 (1) : 23 – 30.
- Eapen , S. dan L. George. 1993. Somatic Embryogenesis in Peanut : Influence of Growth Regulators and Sugars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 35: 151-156.
- George, E.F. dan T.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Handbook and Directionary of Commercial Laboratories. England.
- Gunawan, L.W. 1987 dan N.M.A. Wiendi. 1992. Pengaruh Sub Kultur Beruntun dan Media Tumbuh In Vitro Terhadap Keberhasilan Aklimatisasi Bibit Rotan. Hasil Perbanyak In Vitro. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. Vol 2 (2).
- Heriyanto dan H. Subagio. 1998. Prospek Usaha tani Kacang Tanah di Indonesia. Dalam A. Harsono, N. Nugrahaeni, A. Taufiq, dan A. Winarto (Eds.). *Teknologi untuk Peningkatan Produksi dan Nilai Tambah Kacang Tanah*. Edisi Khusus Balitkabi. Malang. 12 : 1-13.
- Husni, A., S. Hutami, dan M. Kosmiatin. 1999. Regenerasi Tanaman Kacang Tanah Melalui Jalur Embriogenesis Somatik dan Organogenesis. *Prosiding Temu Ilmiah Bioteknologi Pertanian*. 33-40.
- Katuuk, J.R.P. 1984. *Teknik Kultur Jaringan Dalam Mikropropagasi Tanaman*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Jakarta.
- Komatsuda, T., W. Lee dan S. Oka. Maturation and Germination of Somatic Embryos as Affected by Sucrose and Plant Growth Regulators in Soybean *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28 : 103 – 113.
- Lazzeri, P.A. , D.F. Hildebrand, J. Sunega, E.G. Williams, dan G.B. Collins. 1988. Soybean Somatic Embryogenesis : Interactions Between Sucrose and Auxin. *Plant Cell Rep.* 7 : 517-520.

- Litz, R.E. dan D.J. Gray. 1995. Somatic Embryogenesis for Agricultural Improvement. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 11:416-425.
- Murashige dan Skoog. 1984. A Revised Medium For Rapid Growth dan Bioassay With Tobacco Tissue Cultures. *Physiology Plant*. 15 : 473 – 479.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publiser Kluwer Academic Publisher Group.
- Priyono. 1993. Embriogenesis Somatik Langsung pada Kultur In Vitro Eksplan Daun Kopi Arabika. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. Vol. 3 (1).
- Ratnadewi, D, Wydia, A., dan Isnaini, N., 1996. Studi Embriogenesis Somatik pada Glycine max dan Glycine tamuntella. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. Vol. 6. (1).
- Sukmadinata, T. 1996. Kiat Pengembangan Agribisnis Kacang Tanah di Indonesia. Dalam N. Saleh, K. Hartojo H., Heriyanto, A. Kasno. A.G. Manshuri, Sudaryono, A. Winarto (Eds.). *Risalah Seminar Nasional. Prospek Pengembangan Agribisnis Kacang Tanah di Indonesia*. Edisi Khusus Balitkabi. Malang. 7: 41-48.
- Wattimena, 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor. 309 hal.
- Wetzstein, H.Y dan C.M Baker. 1993. The Relationship Between Somatic Embryo Morphology and Conversion in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Sci*. 92 : 81 - 89.
- Widiastoety, D dan Syafril. 1992. Pengaruh Tiamin pada Tanaman Anggrek (*Dendrobium Yaepa Deewan*). *Buletin Penelitian Horticultura* Vol. XXII. No. 2.
- Winata L. 1988. *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*. Lab. Kultur Jaringan Tumbuhan. Pusat Antar Universitas. Bioteknologi. IPB. Bogor.