© Anton Sugiri Posted 6 June 2005
Makalah Individu, Semester Genap 2005
Pengantar Falsafah Sains (PPS702)
Program S3
Mei 2005

Dosen Pembina :
Prof. Dr. Ir. Rudy C. Tarumingkeng (Penanggung Jawab)
Prof. Dr. Zahrial Coto
Dr. Ir. Hardjanto, MS

PEMBENTUKAN KALUS EMBRIOID KULTUR OVARY PISANG MELALUI BEBERAPA KOMPOSISI MEDIA KULTUR

Oleh:

Anton Sugiri
A 361040131/AGR
sugirianton@yahoo.com

ABSTRAK

Untuk menentukan apakah media padat dan media cair akan memberikan pengaruh yang berbeda untuk setiap taraf dari konsentrasi hormon 2,4-D, kinetin dan thiamin di dalam kultur ovary pisang dalam menginduksi kalus dan regenerasinya perlu dilakukan suatu percobaan di laboratorium kultur jaringan.

Eksplan diambil dari bagian ovary bunga pisang dengan media dasar Murashige dan Skoog (MS). Percobaan pertama media MS dengan tambahan hormon 2,4-D (0 – 5 mg/l) pada media padat dan cair. Percobaan kedua eksplan asal media padat dan cair disubkulturkan pada media padat MS dengan tambahan 2,4-D (1 dan 5 mg/l) dicampur dengan kinetinb 0,5 mg/l dan thiamin (0 dan 10 mg/l).

Hasil percobaan menunjukan bahwa media padat lebih baik daripada media cair dalam memacu pembengkakan ovary dan induksi kalus embrioid .
Pemberian 2,4-D sampai 5 mg/l masih meningkatkan pembentukan kalus pada media padat tetapi pada media cair 2,4-D tidak berpengaruh.
Penambahan 2,4-D (1 atau 5 mg/l) , kinetin 0,5mg/l dan thiamin 10 mg/l lebih memacu pembentukan kalus embrioid daripada kinetin dan 2,4-D saja.

I. PENDAHULUAN

Pisang *(Musa sp)* merupakan salah satu komoditi buah yang penting di Indonesia. Tanaman pisang meskipun penyeberannya luas dan dapat tumbuh hamper diseluruh bumi Nusantara, akan tetapi pada umumnya tanaman pisang tidak terpelihara secara intensif. Oleh karena itu produksi pisang di Indonesia yang rata-rata lebih rendah (± 6 kg/pohon) dibanding Negara penghasil lainnya yang berkisar (10-13 kg/pohon) , perlu ditingkatkan (Samson, 1980).

Pada umumnya buah pisang yang terdapat dipasaran berkualitas rendah sehingga kurang memenuhi standar ekspor. Mutu buah pisang ditentukan oleh bentuk yang sempurna,

penampakan yang menarik dan adanya perimbangan yang tepat antara asam dan gula sehingga menghasilkan flavor yang tepat (Waspodo dan Pekerti , 1988).

Teknik kultur jaringan menurut Katuuk (1989) dapat diistilahkan lain sebagai mikropropagasi atau *in vitro propagation* atau juga perbanyakan klon yang istilah-istilah itu mempunyai arti yang sama yaitu teknik perbanyakan tanaman dengan menggunakan potongan kecil jaringan atau sel yang dipelihara dalam suatu medium dan dikerjakan seluruhnya dalam kondisi aseptik.

Didalam teknik sterilisasi bahan tanam untuk kultur ovary pisang perlu diketemukan konsentrasi larutan sterilant yang tepat sehingga bahan tanam itu sendiri steril tetapi jaringan eksplan tetap hidup.

Media kultur jaringan dibedakan menjadi media dasar *basal/basic medium* dan media tambahan. Komposisi media dasar mengandung hara essensial baik makro maupun mikro, sumber energi dan vitamin yang jumlah dan macamnya tergantung dari penemunya. Komposisi media perlakuan merupakan komposisi media tambahan yang dapat berupa vitamin, senyawa organik komplek atau zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh khususnya auksin dan sitokinin adalah suatu zat organik utama yang mengendalikan proses morfogenesis didalam teknik kultur jaringan. Kepekaan jaringan terhadap zat yang ditambahkan pada media perlakuan khususnya zat pengatur tumbuh ditentukan oleh konsentrasi zat pengatur tumbuh yang sudah ada didalam jaringan tersebut (Starling, Newburry dan Callow, 1986). Semakin rendah kadar zat endogen, semakin besar zat eksogen yang harus ditambahkan. Kesukaran yang dihadapi dalam induksi organogenesis ada hubungannya dengan kepekaan yang berbeda pada setiap bagian jaringan suatu spesies maupun antar spesisies terhadap zat pengatur tumbuh eksogen yang diberikan.

Masukan lain yang berupa vitamin seperti thiamin yang merupakan vitamin B1 kedalam media perlakuan juga akan berperan aktif dalam pembelahan sel (George dan Sherington, 1984).

Oleh sebab itu perlu dicari konsentrasi zat pengatur tumbuh serta vitamin yang harus ditambahkan kedalam media dalam menginduksi pertumbuhan kalus embrioid pada kultur ovary pisang.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Peranan dan Perkembangan Teknik Kultur Ovary.

Melalui teknik kultur jaringan dapat dihasilkan penyediaan bibit yang bebas penyakit dan dalam jumlah banyak sebagai contoh di Taiwan pada tahun 1983 terjadi penurunan produksi pisang karena serangan penyakit panama *(Fusarium wilt)*. Hal ini sama juga terjadi di Amerika Selatan yang menyebabkan kerusakan tanaman pisang lebih dari 40.000 ha selama periode 50 tahun (Hwang dan Ke, 1987). Kemudian pada tahun 1984, Negara Taiwan mengembangkan tanaman pisang yang bebas penyakit Panama melalui teknik kultur jaringan. Program ini sangat penting bukan hanya menyediakan bibit yang bebas bibit penyakit saja tetapi juga sebagai jalan keluar untuk mengatasi kontinuitas / kesinambungan produksi sehingga tidak terjadi suatu saat produksi rendah atau sebaliknya saat yang lain produksi melimpah. Demikian halnya dalam hal penyediaan bibit perkebunan pisang , Vuyesteke dan Delanghe (1985) melaporkan bahwa untuk mendapatkan bibit dari anakan yang tiap anakan pisang hanya memberikan (5-10) anakan per tahun, belum bisa menutupi kebutuhan bibit untuk perkebunan pisang yang besar, belum lagi dituntut keseragaman dan kualitas bibit. Dengan melalui teknik kultur jarigan, bila setiap 2 bulan didapatkan enam tunas per eksplan maka akan didapatkan lebih dari empat puluh lima ribu bibit tanaman per tahun.

Adanya kemajuan teknik kultur jaringan telah merangsang peneliti untuk mengembangkan metode kultur ovary atau kultur ovul untuk mendapatkan varietas baru darisuatu spesies. Organ untuk perkembangbiakan pada tanaman baik itu pollen maupun ovul mempunyai 1 N kromosom yang apabila ditumbuhkan melalui teknik kultur jaringan akan mendapatkan suatu tanaman yang haploid, dan apabila dilanjutkan melalui metode penggandaan kromosom akan mendapatkan tanaman varietas baru bersifat homozigot. Gunawan (1988) menyatakan bahwa ada beberapa hasil penelitian tentang kultur ovul muda yang belum dibuahi , sebagai contoh pada *Solanum melongena, Zea mays, Gossypium hirsutum,* terjadi pada masa tahun 1970-an, kemudian pada tahun 1980-an terdapat beberapa penelitian lagi kultur ovul dari dari *Gerbera jamesonii, Nicotiana tabacum* dan *Hellianthus annus.* Zhou *et al. cit* Gunawan (1988) telah melakukan penelitian mengenai kultur ovul padi selama 4 tahun . Chen *et al.* (1985) telah mampu mendapatkan planlet tanaman haploid karet melalui kultur uvary *unpollinated* tanaman karet. Wu (1990) melakukan penelitian pada tahun 1990-an , memperlihatkan pengaruh beberapa komposisi media tumbuh yang berbeda untuk pembentukan kalus embrioid dan defferensiasi kalus kultur ovary poplar yang juga merupakan teknik untuk mendapatkan tanaman poplar haploid.

B. Teknik Sterilisasi

Seperti telah diutarakan dalam pendahuluan bahwa faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan dalam teknik kultur jaringan antara lain 1) Teknik sterilisasi / teknik aseptik , 2) Perlakuan dala, mendapatkan eksplan, 3) Komposisi media.

Teknik sterilisasi ada bermacam-macam , Dodds *cit* Katuuk (1989) mengemukakan 5 macam bentuk sterilisasi yaitu 1) Panas basah, 2) Panas kering, 3) Kimiawi, 4) Filtrasi, dan 5) Penyinaran cahaya dengan menggunakan sinar ultra violet.

Jalan yang paling baik untuk mengatasi kehadiran mikrobia penyebab kontaminasi misalnya jamur atau bakteri dengan diciptakanya kondisi aseptik yaitu kondisi bebas mikrobia , mulai dari persiapan material / bahan tanam , perlengkapan sampai pada cara kerja yang menyangkut ketelitian , ketrampilan , ketekunan serta kemampuan mengorganisir urutan kerja. Sterilisasi permukaan membuat kondisi aseptik suatu bahan tanaman , peralatan, serta ruang transfer. Bahan kimiawi yang diperlukam antara lain alkohol, kalsium hypoclorida(Ca(OCl)2), natrium hypoclorida (NaOCl) yang dipasaran dalm bentuk chlorox, bayclean, hidrogen peroksida(H2O2), sublimat (HgCl2) dan bahan antibiotika. Khusus untuk sterilisasi bahan tanam yang mempergunakan bahan kimiawi perlu dicari konsentrasi dan lamanya sterilisasi yang tepat agar tidak sampai mengakibatkan rusaknya jaringan tanaman tetapi eksplan tetap mampu tumbuh dan berkembang.

C. Permasalahan Pencoklatan dalam Isolasi Eksplan

Langkah dalam isolasi eksplan kultur ovary pisang sangat menentukan dalam perkembangan atau keberhasilan kultur . Khususnya dalam mengatasi masalah pencoklatan atau *browning* kultur ovary pisang. Menurut Eskin, Henderson dan Townsend (1971) bahwa reaksi pencoklatan terjadi karena bahantersebut diproses termasuk karena adanya luka mekanik. Teknik kultur jaringan dalam mendapatkan bahan tanam atau eksplan dengan melakukan pemotongan / pengirisan yang menimbulkan pelukaan atau pecahnya vacuola yang akhirnya mnyebabkan terjadinya penolase. Dalam teknik kultur jaringan produk metabolit sekunder khususnya senyawa fenol menjadikan masalah tersendiri dengan terjadinya reaksi pencoklatan atau *browning* pada eksplan yang mengakibatkan matinya jaringan tersebut. Terjadinya reaksi pencoklatan menurut Winarno (1984) diperkirakan melibatkan perubahan senyawa dalam jaringan dari bentuk kuinol menjadi kuinon melalui oksidasi. Asam kuinon adalah merupakan racun jaringan yang dapat mematikan jaringan

eksplan sehingga mengakibatkan tujuan suatu kultur tidak tercapai . Menurut Sheeler dan Bianchi (1987) , bagian sel tanaman yaitu vacuola sebagai tempat untuk penyimpanan air dan produk – produk sel khususnya metabolit sekunder termasuk fenol. Didalam pemotongan jaringan , vacuola terpotong dan mengeluarkan fenol yang akan bereaksi dengan ensim fenol oksidase didalam sitosol sehingga terbentuk kuinon yang menyebabkan warna coklat dan beracun . Oleh sebab itu didalam media kadang – kadang ditambahkan anti oksidan antara lain vitamin C untuk mengurangi terjadinya oksidasi polyfenol.

D. Penentuan Komposisi Media Perlakuan

Dalam menentukan komposisi media perlakuan yang dikehendaki dalam teknik kultur ovary pisang perlu dicobakan secara *bio essay* yang ditentukan berdasarkan teori ataupun contoh-contoh hasil penelitian kultur ovary atau ovul pada spesies yang sama atau berbeda.

Media kultur jaringan tanaman disamping menyediakan unsur hara makro dan hara mikro juga diberi karbohidrat yang pada umumnya berupa gula untuk menggantikan karbon. Hasil yang lebih baik akan dapat diperoleh bila kedalam media tersebut ditambahkan vitamin-vitamin, asam amino, atau zat pengatur tumbuh. Perkembangan pemilihan karbohidrat yang ditambahkan dimulai oleh Gauthered yaitu dengan membandingkan pengaruh berbagai jenis gula pada kultur jaringan wortel . Ia mendapatkan bahwa sukrose adalah gula yang paling baik , lalu diikuti oleh glukose, maltose dan rafinose sebagai sumber energi. Pada umumnya urutan yang demikian berlaku hampir untuk semua tanaman hanya ada beberapa pengecualian (George dan Sherington, 1984).

1. Media untuk Kultur Jaringan Ovary

Gunawan (1988) mengemukakan bahwa pada umumnya media kultur jaringan dibedakan menjadi media dasar dan media perlakuan . resep media dasar adalah resep kombinasi zat yang mengandung hara essensial (makro dan mikro) , sumber energi dan vitamin .

Dilihat dari bentuk atau kekentalan media ada media padat dan media cair. Bentuk media cair mempunyai keuntungan bahwa kontak eksplan dengan media adalah maksimum, hanya aerasi perlu diperbaiki dengan penggojokan media dan pemakaian botol kultur yang bentuknya dapat mempertinggi aerasi sebagai tempat media kultur. Pengaruh lain dari media bentuk cair adalah peningkatan unsur hara dan zat pengatur tumbuh dalam metabolisme zat - zat yang beracun akan berdifusi lebih efektif. Untuk membuat media dalam bentuk padat diperlukan bahan pemadat / bahan pengental , bahan yang sering dipakai dan berhasil baik adalah agar, phytagel dan gelatin. Arrilaga *et al* . (1992) melaporkan bahwa terjadi beda nyata pada perlakuan kekentalan media (antara media padat dan media cair) dan komposisinya , khususnya formulasi garam atau unsur hara . Disamping itu interaksi dari rata-rata jumlah tunas yang terbentuk pada setiap eksplan baik asal apikal maupun nodal.

Dalam perkembangan komposisi media perlakuan , vitamin juga sering ditambahkan untuk membentuk komposisi media perlakuan berbagai macam vitamin sedangkan yang sering digunakan dalam kultur jaringajn adalah nthiamin (Vitamin B1). Thiamin merupakan vitamin yang essential dalam keberhasilan suatu kultur jaringan tanaman . Menurut George dan Sherington (1984) kemungkinan peranan thiamin adalah melalui keikutsertaannya dalam lintasan-lintasan asam D-galakturonat yang menghasilkan vitamin C dan pectin. Juga dilaporkan ada kemungkinan peranannya dalam inkorporasinya fosfoinasitida dan fosfatidil inositol yang berperan dalam pembelahan sel selama eksplan melakukan pertumbuhan dalam kultur jaringan.

2. Zat Pengatur Tumbuh dalam Media untuk Suatu Kultur

Pertumbuhan dan perkembangan tanaman dikendalikan oleh substansi kimia yang konsentrasinya sangat rendah, yang disebut substansi pertumbuhan tanaman , hormon

tumbuhan , fitohormon atau zat pengatur tumbuh. Istilah zat pengatur tumbuh oleh Wareing dan Phillips, *cit* Gardner, Perce dan Mitchell (1985) yaitu substansi /bahan organic (selain vitamin dan unsur mikro) yang dalam jumlah sedikit akan merangsang , menghambat atau sebaliknya mengubah proses fisiologis . Zat pengatur tumbuh endogen (yang diproduksi dibagian dalam) diartikan sebagai hormon tanaman atau fitohormon.

Irvine *cit* George dan Sherington (1984) melaporkan telah mencoba 79 macam campuran media untuk pembuatan kalus dimana terdapat 96 % komposisi yang efektif karena adanya hubungan aktifitas hormon auksin. Auksin yang paling sering digunakan untuk menginisiasi pembentukan kalus adalah jenis 2,4-D (2,4 – Dichloro Phenoxy acetic acid dengan berat molekul 221,04), George dan Sherington (1984) mengatakan bahwa untuk proses caulogenesis , rizhogenesis dalam morfogenesis akar dan tunas dari kultur kalus biasanya dibutuhkan suatu imbangan taraf auksin dan sitokinin dalam media.

George dan Sherington (1984) mengatakan bahwa untuk proses caulogenesis atau rhizogenesis dan morfogenesis akar dan tunas dari kultur kalus biasanya dibutuhkan imbangan taraf zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin.

3. Konsentrasi dan Imbangan Zat pengatur Tumbuh sebagai bahan Pemicu Suatu Kultur.

Dalam perkembangan teknik kultur jaringan dengan adanya zat pengatur tumbuh perlu dicari konsentrasi dan imbangan atau interaksi antara dua zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media perlakuan dan yang diproduksi moleh sel / jaringan secara endogen akan menentukan perkembangan dari suatu kultur . Penambahan auksin atau sitokinin eksogen mengubah level / taraf zat pengatur tumbuh endogen sel, level / taraf zat pengatur tumbuh ini kemudian merupakan factor pemicu atau penggerak untuk proses – proses yang tumbuh bdan morfogenesisnya.

Wu (1990) melaporkan pembentukan kalus dari eksplan yang berasal dari ovary poplar melalui media MS dengan tambahan 9,3 µM Kinetin + 0,54 µM NAA dan 0,1 M Sukrosa mengahasilkan 21,4 % kalus dari ovary poplar yang dikulturkan, sedang dengan media BN (Baugin dan Nist) dengan tambahan 9 µM 2,4-D + 4,6 µM Kinetin dan 0,3 M sukrosa membentuk kalus 37,11 % dari ovary poplar yang dikulturkan.

Tingginya garam anorganik pada komposisi media , ditambah dengan kinetin menyebvabkan tingginya frekuensi kultur ovary membentuk kalus (Wu, 1990).

III. PELAKSANAAN PERCOBAAN

Percobaan dilaksanakan secara bertahap, dari percobaan pertama ke percobaan berikutnya melalui cara sub kultur.

1. Percobaan pertama

a. Media Padat

Komposisi media Padat ada 5 aras yaitu :

1) Media dasar MS + 0 ppm 2,4-D
2) Media dasar MS + 0,1 ppm 2,4-D
3) Media dasar MS + 0,5 ppm 2,4-D
4) Media dasar MS + 1 ppm 2,4-D
5) Media dasar MS + 5 ppm 2,4-D

b. Media Cair

Komposisi media Padat ada 5 aras yaitu :

1) Media dasar MS + 0 ppm 2,4-D
2) Media dasar MS + 0,1 ppm 2,4-D
3) Media dasar MS + 0,5 ppm 2,4-D
4) Media dasar MS + 1 ppm 2,4-D

5) Media dasar MS + 5 ppm 2,4-D

2. Percobaan Kedua

a. Media dasar MS + Kin. 0,5 ppm + 0 ppm 2,4-D + Thiamin 10 ppm
b. Media dasar MS + Kin. 0,5 ppm + 1 ppm 2,4-D + Thiamin 10 ppm
c. Media dasar MS + Kin. 0,5 ppm + 5 ppm 2,4-D + Thiamin 10 ppm
d. Media dasar MS + Kin. 0,5 ppm + 0 ppm 2,4-D
e. Media dasar MS + Kin. 0,5 ppm + 1 ppm 2,4-D
f. Media dasar MS + Kin. 0,5 ppm + 5 ppm 2,4-D

Keterangan : Kin. = Kinetin

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan yang dibiakkan pada media padat dengan semakin tingginya konsentrasi (ppm) zat pengatur tumbuh 2,4-D yang ditambahkan pada media akan memperlihatkan semakin besar pembengkakan ovarynya, tidak sedemikian halnya pada eksplan yang dibiakan pada media cair .

Hasil dari percobaan kedua melalui subkultur menghasilkan kalus embrioid. Secara visual dapat dilihat pada gambar dibawah ini :

(a)

(b)

(a) Perkembangan kalus embrioid yang muncul pada bagian tengah dari eksplan
(b) Perkembangan kalus embrioid dengan warna hijau kekuningan.

B. Pembahasan

Sterilisasi eksplan ovary dengan menggunakan larutan sterilan bayclean 25 % ditambah 1 tetes Tween 40 per 200 ml dengan waktu perendaman 5 menit dan dicuci dengan aquadest steril 3 kali menghasilkan bahan dalam kondisi steril. Hal ini terlihat pada hasil prosentase yang hidup pada kultur ovary media padat dan sub kultur eksplan ovary asal media padat yang tinggi. Akan tetapi pada subkultur eksplan ovary asal media cair prosentase kultur yang hidup lebih rendah daripada subkultur eksplan ovary asal media padat. Hal ini disebabkan karena eksplan yang pengkulturannya melalui media cair dilakukan penggoyangan atau penggojogan , sehingga eksplan yang terletak disebelah dalam yang keadaanya kurang steril terbuka dan akan mengkotaminasi medianya. Apabila eksplan ini di subkulturkan maka eksplan yang sudah terkontaminasi memberikan prosentase eksplan yang hidup akan lebih rendah daripada eksplan yang berasal dari media padat.

Perlakuan dalam mendapatkan bahan tanam ovary untuk mmenghindari kemungkinan terjadinya reaksi pencoklatan dilakukan ndengan penambahan 10 ppm asam askorbat pada

setiap komposisi media perlakuan dan dalam pemotongan untuk mendapatkan eksplan dilakukan pemotongan dalam perendaman asam askorbat 5 ppm, sehingga seperti yang dikatakan oleh Eskin *et al* (1971) bahwa asam askorbat menghambat kerja enzim fenolase yang berperan pada reaksi pencoklatan.

Pembengkakan atau perpanjangan ovary pada media padat ada beda nyata antar perlakuan , begitu pula pada media cair, sedangkan kecenderungan peningkatan pembengkakan ovary karena perlakuan media terlihat semakin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi 2,4-D.

Pembentukan kalus embrioid dari eksplan melalui subkultur ternyata komposisi media perlakuan dengan imbangan zat pengatur tumbuh kinetin 0,5 ppm dengan 2,4-D 1 ppm atau 2,4-D 5 ppm dan terjadi juga pada media perlakuan kinetin 0,5 ppm tanpa imbangan 2,4-D hanya saja kalus yang terbentuk kecil dan prosentasenya sedikit. Sedangkan fungsi dari thiamin terlihat pengaruhnya pada subkultur pada waktu inisiasi kalus atau saat mulai munculnya kalus sehingga thiamin ikut berperan dalam mempercepat pembelahan nsel pada kultur jaringan.

V. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Media padat dan media cair memberikan pengaruh yang berbeda terhadap pembengkakan ovary yang dikulturkan. Media padat menyebabkan pembengkakan ovary semakin besar dengan meningkatnya konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan mulai dari 0,1 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm samapi dengan 5 ppm, sedangkan media cair tidak dipengaruhi dengan kadar 2,4-D. Media padat lebih baik dalam menghasilkan eksplan untuk meninduksi kalus embrioid ovary daripada media cair.

2. Kalus yang terbentuk lebih cepat dan lebih banyak apabila dalam konposisi media subkultur mengandung imbangan 2,4-D sebanyak 1 ppm atau 5 ppm dengan kinetin 0,5 ppm dan thiamin 10 ppm pada setiap media perlakuan.

3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mencari komposisi media kultur untuk regenerasi kalus embrioid kultur ovary pisang.

DAFTAR PUSTAKA

Arrilaga , I. , V. Lerma, dan J. Segura, 1992. Micropropagation of Juvenile and Adult Flowering Ash. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117 (4) : 663-667.

Bailey, L.H. 1973. Menual of cultivated plants . The Macmilian Company Ney Yorks . USA

Chen, Z., X. Xu, X. Liao, R. Pan, dan K. Wu, 1985. Production of haploid planlets from unpollinated ovule in *Hevea brasiliensis* . Muell, Arg. Annu, Rep, Inst, Genet. Acod. Sin (1984). 27 p.

Chen, Z. 1990. Haploid Induction in perennial crops. Hand book culture, 6 : 62 – 75.

Chen, Z., X. Xu, R. Pan, 1990, Rubber tree : Anther and ovule culture . hand book of Plant Cell culture .

Doreswamy, R., Sriniyasarao, N.K. and E.K. Chacko, 1983. Tissue Culture Propagation of Banana . Scientia. Hortic. 18 : 247 – 252.

Eskin, N.A.M., H, M. Henderson, dan R.J. Townsend, 1971, Biochemistry of Food Academic press inc. USA . p .240.

Gardner, F.P., R.B., Pearce dan R.J. Mitchell, 1985, Phsyology of Crop plant, Iowa University Press. Inc. Ames Iowa.

George, E.F., and P.D. Sherington, 1984 Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd. Eversley Basingstoke, Hants. England.

Green , C. E., R. L., Philips ,1974, Potential Selection system for mutant with increased lysine, threonine and methioninein cereal crops. Crop Sci. 14 827 – 830.

Gunawan , L.W. 1988., Teknik kultur jaringan tumbuhan. Lab. Kultur jaringan PAU . BIOTEK. Bogor P. 304

Hwang, S. C., W. H. Ke , 1987. *In Vitro* Somaclonal variation in banana and its application for screening for resistance to Fusarial Wilt. The breeding of horticultural crops. Agriculture Building, Taiwan.

Katuuk, J.R.P. 1989. Teknik Kultur Jaringan dalam mikropropagasi tanaman. DEPDIKBUD. DIRJEN. DIKTI. PPLPTK., Jakarta. P. 188

Linesmaier, E.M. and F. Skoog. 1965, Organic Growth Factor Requirement of Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum, 18 : 100 – 127.

Marcotrigano, M. dan S.P. McGlew, 1991, A Two Stage Micropropagation System for Cranberries, J. Amer. Soc. Hort., Sci. 118(5) : 911 – 916.

Starling, R.J., H.J. Newburry, dan J.A . Callow, 1986. Putative Auxin Receptors in Tobacco Callus. University of Birmingham. UK.

Vuyesteke, D., E., Delanghe, E. 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. Trop. Agric. (Trinidad) 62 : 323 – 327.

Wetherell, D. F., 1982. Pengantar propagasi tanaman secara *In vitro* (diterjemahkan oleh Koensoemardiyah). Avery Publishing Group Inue. Wayne New yersey, P. 110.

Winarno, F.G. 1984. Kimia Pangan dan Gizi. PT. Gramedia. Jakarta., P. 251.

Wu, K. 1990. Poplar ; Ovary Culture. Hand Book of plant cell culture 6 : 182 - 189.