

Mikropropagasi Tunas Alfalfa (*Medicago sativa* L.) pada Kombinasi Benzil amino purin (BAP) dan Thidiazuron (TDZ)

Alfalfa Shoot's Micropropagation at Combination of Benzil amino purin (BAP) and Thidiazuron (TDZ)

Diah Nurmaningrum¹, Yulita Nurchayati^{2*}, Nintya Setiari²

1)Program Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

2)Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro

Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang

*Email : yulita.yoko@gmail.com

Diterima 3 Maret 2017 / Disetujui 20 Agustus 2017

ABSTRAK

Teknologi kultur jaringan menjadi alternatif teknologi yang mampu menyediakan bibit secara massal, seragam dan relatif cepat. Multiplikasi tunas dari kultur pucuk merupakan tahap untuk mendukung pembentukan planlet dengan penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) sitokinin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji pengaruh ZPT Benzil Aminopurin (BAP) dan thidiazuron (TDZ) terhadap pembentukan tunas alfalfa pada media kultur serta mengetahui konsentrasi kedua ZPT dalam membentuk tunas secara optimal. Kultur pucuk diperoleh dari kecambah aseptik berumur 10 hari, dan ditumbuhkan di dalam medium Murashige&Skoog (MS). Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 kombinasi dari 2 faktor berupa 2 macam sitokinin. Faktor pertama adalah BAP dengan konsentrasi 0; 0,3; 0,6; 0,9 mg/L dan faktor kedua adalah TDZ dengan konsentrasi 0; 0,9; 0,6; 0,3 mg/L. Data yang diperoleh dianalisis dengan ANOVA, dan dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf signifikansi 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu inisiasi tercepat (2,33 hari) terdapat pada perlakuan kombinasi BAP 0,3 mg/L dan TDZ 0,9 mg/L, sedangkan jumlah tunas terbanyak (8,00) diperoleh pada perlakuan kombinasi BAP 0,9 mg/L dan TDZ 0,3 mg/L. Tunas terpanjang terdapat pada media tanpa ZPT (kontrol). Kesimpulannya kombinasi BAP dan TDZ di dalam media MS efektif mempercepat waktu inisiasi dan meningkatkan pertumbuhan tunas alfalfa.

Kata kunci : alfalfa (Medicago sativa), induksi pertunasan, BAP, TDZ

ABSTRACT

Plant tissue culture technique is one of the alternative way in producing seedling in large number with a short period relatively. Shoot multiplication of shoot tip culture is stage to encourage planlet formation by application of cytokinins. The aim of this experiment was to study the effect of both exogeneous cytokinin Benzyl Aminopurin (BAP) combined with Thidiazuron (TDZ), on alfalfa's shoot culture. The shoot culture was initiated from 10-day old axenic seedling and grown in Murashige&Skoog (MS) medium. This experiment has been conducted by Completely Randomized Design (CRD) with 4 combination of 2 factors, i.e. BAP and TDZ concentration : 0; 0,3; 0,6; 0,9 mg/L and 0; 0,9; 0,6; 0,3 mg/L, respectively. The quantity and length of shoot, and also number of leaves bud were analyzed by ANOVA followed by Duncan test at 95% level. The results showed that the highest number of shoots (8.00) was obtained at BAP 0,9 mg/L combined with TDZ 0,3 mg/L. The longest shoot was reached on the MS without cytokinins (control). It was concluded that both cytokinin induce shoot formation effectively *in vitro* so enhanced growth alfalfa

Key words: alfalfa (*Medicago sativa*), shoot culture, BAP, TDZ

PENDAHULUAN

Budidaya alfalfa di Indonesia mengalami kendala dalam penyediaan biji. Biji alfalfa yang

dihasilkan dari tanaman yang ditumbuhkan tidak dapat dikecambahkan karena tidak memiliki embrio (Rahmayati dan Sitanggang, 2008). Upaya

propagasi alfalfa perlu dilakukan untuk mendukung penyediaan bibit.

Mikropropagasi merupakan teknik kultur jaringan untuk memperbanyak tumbuhan dalam medium buatan yang dapat digunakan sebagai alternatif pemecahan masalah tersebut untuk menghasilkan bibit yang banyak dalam waktu relatif singkat (Suryowinoto, 1996).

Salah satu teknik mikropropagasi yang dapat dilakukan adalah melalui kultur pucuk. Kultur pucuk umumnya dipacu dengan penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) sitokinin, karena dapat memacu inisiasi dan proliferasi tunas. Sitokinin yang sering digunakan di dalam kultur jaringan adalah Benzil Aminopurin dan Thidiazuron (Huetteman dan Preece, 1993).

Benzil Aminopurin merupakan sitokinin sintetik turunan adenin yang sangat aktif dalam mendorong pertumbuhan kalus tembakau. Bentuk isomer *1-benzil adenine* mempunyai aktivitas kimia yang rendah, sehingga untuk dapat aktif harus diubah menjadi *6-benzil adenine*. Sitokinin BAP berperan penting dalam menginduksi respon fisiologi seperti regulasi pembelahan sel, diferensiasi jaringan dan organ serta biosintesis klorofil (Victor *et al.*, 1999).

Thidiazuron (N-phenyl-N (1,2,3-thidiazol-5-yl) urea), merupakan turunan fenilurea sintetik yang berperan penting dalam meningkatkan biosintesis dan akumulasi sitokinin endogen (Victor *et al.*, 1999). Tefera dan Wannakraioj (2006) menjelaskan bahwa TDZ memiliki peran sebagai inhibitor sitokinin oksidase yang dapat menghilangkan keaktifan sitokinin tipe adenine bebas.

Oleh karena itu TDZ dapat meningkatkan kerja sitokinin lain, baik sitokinin eksogen ataupun endogen (Lu, 1993). Penggunaan TDZ pada konsentrasi kurang dari 1 μM dapat menginduksi tunas pada spesies tanaman berkayu (Huetteman dan Preece, 1993) maupun menginduksi kalus dan embrio somatik (Fiola *et al.* 1990).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh penambahan BAP dan TDZ dalam memacu pembentukan tunas dan mengetahui konsentrasi BAP dan TDZ dalam menghasilkan tunas alfalfa dengan jumlah yang banyak.

METODE PENELITIAN

Bahan tanaman yang digunakan adalah tunas pucuk dari kecambah aseptik berumur 10 hari setelah semai dan berukuran panjang ± 1 cm. Biji alfalfa yang akan dikecambahkan disterilisasi secara kimia menggunakan larutan Natrium hipoklorit 5% selama 30 detik, selanjutnya dibilas dengan akuades steril. Biji dikecambahkan dalam cawan petri beralaskan tisu basah steril dan diinkubasi selama 10 hari. Tunas yang tumbuh digunakan sebagai eksplan sepanjang 1 cm ditanam di dalam medium perlakuan yakni medium MS padat yang mengandung BAP dan TDZ pada konsentrasi yang berbeda (0; 0,3; 0,6; 0,9 mg/L). Kultur pucuk dinkubasi pada kondisi terang di bawah pencahayaan lampu 20 watt pada suhu 25°C.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat kombinasi BAP dan TDZ masing-masing dengan 3 ulangan. Perlakuan-perlakuan tersebut adalah sebagai berikut: B_{0,3}T_{0,9} penambahan BAP 0,3 mg/L dan TDZ 0,9 mg/L; B_{0,6}T_{0,6} penambahan BAP 0,6 mg/L dan TDZ 0,6 mg/L; B_{0,9}T_{0,3} penambahan BAP 0,9 mg/L dan TDZ 0,3 mg/L; B_{0,0}T_{0,0} penambahan BAP 0 mg/L dan TDZ 0 mg/L.

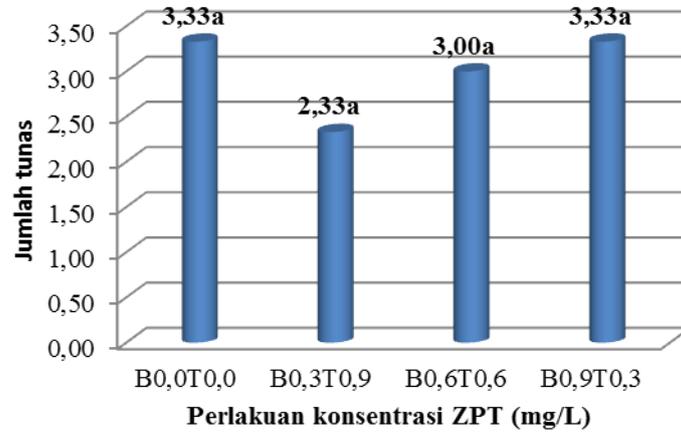
HASIL DAN PEMBAHASAN

Waktu Inisiasi

Waktu inisiasi merupakan salah satu faktor penting di dalam memperbanyak tanaman dengan metode kultur jaringan. Semakin cepat waktu inisiasi maka semakin cepat dihasilkan bahan untuk memperbanyak tanaman. Gambar 1. menunjukkan bahwa pemberian kombinasi BAP dan TDZ ke dalam media tidak berpengaruh terhadap waktu inisiasi tunas. Perlakuan B_{0,3}T_{0,9} menunjukkan waktu inisiasi yang relatif cepat (2,33 hari). Waktu inisiasi yang relatif lambat dihasilkan oleh perlakuan B_{0,0}T_{0,0} dan B_{0,9}T_{0,3}. Pemberian BAP dan TDZ tidak berpengaruh terhadap waktu inisiasi diduga karena pembelahan awal tunas belum dipengaruhi oleh sitokinin eksogen. Sitokinin endogen yang terkandung dalam eksplan diduga sudah dapat memacu

pembentukan tunas. George dan Sherrington (1984) mengungkapkan bahwa sitokinin alami yang terkandung di dalam eksplan dapat memacu eksplan tersebut untuk membentuk tunas. Hal ini

diduga sitokinin eksogen yang ditambahkan dalam media pada awal penanaman belum berinteraksi dengan eksplan, sehingga sitokinin endogen dalam eksplan yang memacu inisiasi tunas.

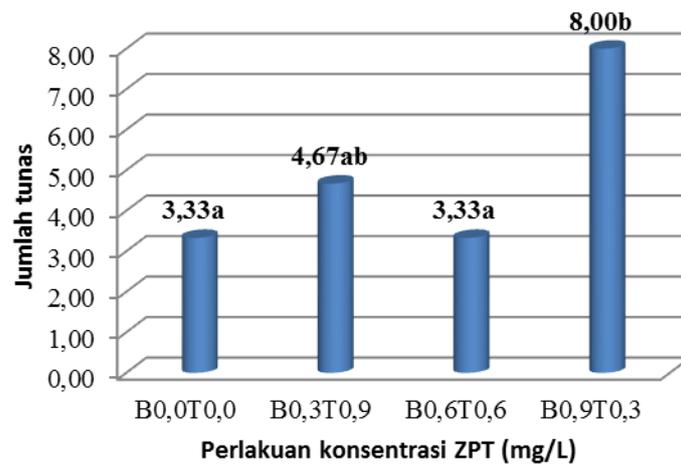


Gambar 1. Rata-rata waktu inisiasi tunas (hari) pada berbagai perlakuan konsentrasi BAP dan TDZ

Jumlah Tunas

Jumlah tunas diamati pada akhir penelitian yaitu 20 hari setelah tanam (hst). Jumlah tunas yang dihasilkan dalam kultur jaringan dapat diindikasikan sebagai keberhasilan dalam multiplikasi. Berdasarkan hasil ANOVA, tampak bahwa pemberian BAP dan TDZ pada berbagai konsentrasi dalam media MS menghasilkan jumlah tunas yang lebih banyak dibandingkan pada media MS tanpa penambahan BAP dan TDZ (Gambar 2.). Hal ini menunjukkan bahwa BAP dan TDZ yang ditambahkan ke dalam media mampu

memacu pembentukan tunas dari pucuk alfalfa. Sadik dkk (2006), mengungkapkan bahwa BAP berperan dalam menstimulasi pembelahan sel dan diferensiasi sel, serta TDZ berperan dalam menstimulasi produksi dan akumulasi sitokinin pada sel-sel meristematik. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa perlakuan B_{0,9}T_{0,3} menghasilkan rata-rata jumlah tunas yang relatif lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan lainnya yaitu sebanyak 8,00 buah. Jumlah tunas yang relatif sedikit dihasilkan pada perlakuan B_{0,0}T_{0,0} dan B_{0,6}T_{0,6} yaitu sebanyak 3,33 buah.



Gambar 2. Rata-rata jumlah tunas pada berbagai perlakuan konsentrasi BAP dan TDZ

Hasil percobaan menunjukkan bahwa konsentrasi TDZ yang rendah lebih memacu pembentukan tunas dibandingkan pada konsentrasi yang tinggi. Penggunaan konsentrasi TDZ yang tinggi dapat mengakibatkan pertumbuhan tunas terhambat, vitrifikasi eksplan, serta malformasi tunas dan daun yang dihasilkan (Shan dkk., 2000). Konsentrasi TDZ yang dibutuhkan lebih rendah dikarenakan sitokinin tersebut menstimulasi sintesis sitokinin endogen atau menghambat degradasi sitokinin karena TDZ resisten terhadap enzim sitokinin oksidase (Thomas dan Katterman, 1986).

Perlakuan $B_{0,9}T_{0,3}$ menghasilkan rata-rata jumlah tunas terbanyak (8,00) dan meskipun tidak berbeda signifikan dengan perlakuan $B_{0,9}T_{0,3}$. Hal ini menunjukkan adanya sinergisme antara kedua jenis ZPT yang diaplikasikan sehingga mampu memacu multiplikasi tunas ke arah yang lebih banyak. Thidiazuron merupakan kelompok sitokinin yang berfungsi dalam menginduksi pembelahan sel dan proliferasi tunas aksiler (Lu, 1993). Media dengan dua jenis sitokinin yang berbeda dapat meningkatkan jumlah tunas yang dihasilkan dibandingkan dengan penggunaan satu jenis sitokinin saja (Nielsen et al., 1995).

Penggunaan kombinasi TDZ (0,1 mg/L) dengan BAP (0,5 mg/L) pada kultur *in vitro* tapak dara (*Catharanthus roseus*), dapat meningkatkan multiplikasi tunas (Yelnititis et al., 2000). Hasil yang sama didapatkan pada kultur *in vitro* tanaman daun encok (Yelnititis et al., 1996).

Perlakuan $B_{0,6}T_{0,6}$ menghasilkan rata-rata jumlah tunas yang relatif sedikit. Hal ini diduga karena konsentrasi TDZ yang tinggi dalam media dapat menurunkan jumlah tunas yang terbentuk karena terikat dengan *Cytokinin Binding Protein* (CBP). Hal ini menyebabkan konformasi tempat pengikatan sitokinin tipe adenin sehingga BAP tidak dapat berikatan dengan CBP dan efek sitokinin tertekan yang menyebabkan pembentukan tunas terhambat. Nielsen dkk. (1995) menyatakan bahwa kandungan TDZ yang cukup tinggi akan menyebabkan gugus adenin sitokinin berubah menjadi tipe adenin yang tidak berikatan pada gugusnya, sehingga peningkatan pemberian TDZ tidak efektif dalam meningkatkan jumlah tunas. Wattimena et al. (1992) menambahkan konsentrasi sitokinin eksogen yang tinggi dalam media akan menyebabkan eksplan jenuh, sehingga cenderung tidak memiliki respon lagi



Gambar 3. Tunas alfalfa yang tumbuh pada berbagai media dengan berbagai konsentrasi ZPT; a. daun; b. tunas; c: kotiledon

Berdasarkan Gambar 3. secara umum terlihat bahwa perlakuan $B_{0,9}T_{0,3}$ memiliki jumlah tunas yang lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan yang lain, dan berbentuk roset. Huetteman dan Preece (1993) menyatakan pada

umumnya media yang mengandung TDZ akan menghasilkan tunas yang berbentuk roset. Hal ini karena TDZ menginduksi dan mengaktifkan etilen endogen yang memberikan respon terhadap penghambatan pemanjangan batang terutama pada

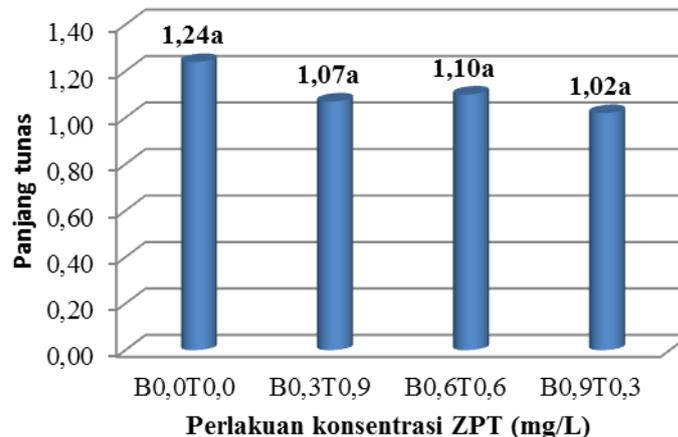
tanaman dikotil (Salisbury dan Ross, 1995). Thidiazuron yang terdapat di dalam media menyebabkan sel aktif untuk membelah, sehingga jumlah tunas yang dihasilkan banyak namun menghambat pemanjangan tunasnya. Lu (1993) menambahkan umumnya eksplan yang dikultur dalam media yang mengandung TDZ dapat menimbulkan gejala keabnormalan pada tanaman. Hal yang sama ditemui pada penelitian *in vitro* tapak dara, yaitu penggunaan TDZ konsentrasi tinggi menimbulkan penampilan roset pada kultur (Kristina *et al.*, 2004).

Panjang Tunas

Pemberian kombinasi BAP dan TDZ tidak mempengaruhi rata-rata panjang tunas (Gambar 4). Hal ini dikarenakan proses pemanjangan tunas alfalfa tidak memerlukan penambahan sitokinin eksogen, diduga sitokinin endogen yang terkandung dalam eksplan sudah cukup dalam pemanjangan tunas. Salisbury dan Ross (1995)

menambahkan bahwa tunas yang sedang memanjang tidak memerlukan penambahan sitokinin eksogen dalam konsentrasi tinggi, dikarenakan kandungan sitokinin endogen dalam jaringan sudah mencukupi untuk pemanjangan jaringan tersebut. Gambar 4. Juga menunjukkan bahwa perlakuan tanpa ZPT menghasilkan tunas yang relatif lebih panjang daripada perlakuan lainnya.

Tunas yang dihasilkan memiliki panjang yang berbanding terbalik dengan jumlah tunas. Jumlah tunas yang banyak akan menghasilkan tunas yang pendek dan jumlah tunas yang sedikit akan menghasilkan tunas yang panjang. Hal ini diduga karena adanya persaingan antar tunas dalam memperoleh nutrisi dan ruang tumbuh. Peningkatan kompetisi antar tunas dalam memperoleh nutrisi dan ruang tumbuh sebanding dengan dengan peningkatan jumlah tunas. Sitompul dan Guritno (1995) menyatakan kompetisi dapat terjadi diantara bagian-bagian tanaman pada tanaman yang sama.



Gambar 4. Rata-rata panjang tunas (cm) pada berbagai kombinasi konsentrasi BAP dan TDZ

Jumlah Daun

Daun yang dihitung merupakan daun yang telah terbuka penuh dan yang masih menempel pada tunas. Pertumbuhan daun terjadi sejak minggu pertama (6 HST), namun demikian tidak semua tunas tumbuh daun.

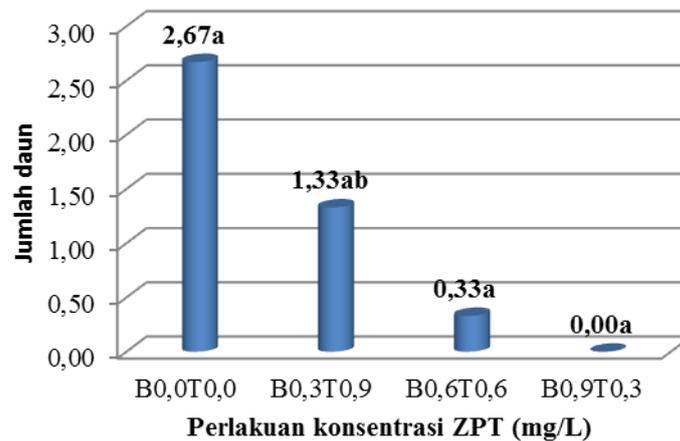
Hasil pengamatan terhadap jumlah daun yang terbanyak diperoleh pada perlakuan B_{0,0}T_{0,0},

yang tidak signifikan dengan perlakuan B_{0,3}T_{0,9} namun berbeda signifikan dengan perlakuan B_{0,6}T_{0,6}. Perlakuan pemberian kombinasi BAP dan TDZ yang menghasilkan jumlah daun terbanyak terdapat pada perlakuan B_{0,3}T_{0,9} (1,33 helai). Diduga B_{0,3}T_{0,9} merupakan konsentrasi yang optimum dalam pembentukan daun. Pada perlakuan lainnya menghasilkan jumlah daun yang

relatif sedikit dan tunas pada perlakuan B_{0,3}T_{0,9} belum tampak tumbuh daun.

Jumlah daun terbanyak dihasilkan pada perlakuan B_{0,0}T_{0,0} yaitu 2,67 helai. Hal ini dikarenakan medium tanpa ZPT telah menghasilkan tunas yang panjang dan menjadi tempat sintesis sitokinin endogen. Tunas yang

tumbuh dalam medium MS sudah cukup mendukung pembentukan daun. Selain itu, unsur magnesium yang terkandung dalam media MS diduga mendukung untuk pembentukan daun. Magnesium (Mg) berperan penting karena berkaitan dengan proses fotosintesis (Salisbury dan Ross, 1992).



Gambar 5. Jumlah daun pada berbagai perlakuan konsentrasi BAP dan TDZ

Kombinasi BAP dan TDZ yang menghasilkan jumlah daun relatif banyak diperoleh pada perlakuan B_{0,3}T_{0,9}. Hal ini karena konsentrasi TDZ pada media lebih tinggi. Thidiazuron merupakan sitokinin yang memiliki aktivitas biologi yang lebih tinggi dibandingkan BAP. Lu (1993) dan Yelnititis *et al.* (1999), mengemukakan bahwa TDZ dapat meningkatkan akumulasi sitokinin endogen sehingga memberikan respon ganda terhadap pertumbuhan jumlah daun. Medium MS yang mengandung TDZ 0,9 mg/L menghasilkan jumlah daun terbanyak dan tunas yang relatif tinggi.

Perlakuan B_{0,6}T_{0,6} menghasilkan jumlah daun yang relatif sedikit. Penambahan BAP yang lebih tinggi (< 0,3 mg/l) tidak mampu meningkatkan jumlah daun. Harminingsih (2007) mengemukakan bahwa peningkatan konsentrasi BAP pada media akan menghasilkan jumlah daun yang sedikit. Arniputri *et al.* (2003) berpendapat bahwa tingginya konsentrasi BAP dapat menghambat pemanjangan tunas, karena BAP yang tinggi akan menghasilkan jumlah tunas yang banyak sehingga pemanjangan tunas dihambat

oleh tunas baru. Pemanjangan tunas yang terhambat akan menyebabkan pertumbuhan daun juga terhambat. Strabala *et al.* (1996) menyatakan bahwa auksin dan sitokinin berperan dalam perkembangan primordia daun, sedangkan posisi inisiasi primordia daun dipengaruhi oleh transport auksin.

KESIMPULAN

Pemberian kombinasi BAP dan TDZ dalam media MS dapat menginduksi pembentukan dan perbanyak tunas alfalfa. Jumlah tunas terbanyak diperoleh pada kombinasi 0,9 mg/L BAP dengan 0,3 mg/L TDZ.

DAFTAR PUSTAKA

- Arniputri, R. B., Praswanto dan D. Purnomo. 2003. Pengaruh Konsentrasi IAA dan BAP terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman Kunir Putih (*Kaempferia rotunda* L.) Secara In vitro. *Agrosains*. 5 (2) : 48-51
- Fiola, J. A., Hanssan M A., Swartz H. J., Bors R. H., and R. McNicole. 1990. Effect of

- Thidiazuron, Light Influence Rate and Canamycin on In Vitro Shoot Organogenesis from Excised Rubus Cotyledons and Leave. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20: 223–228.
- George, E. F. dan P. D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Ltd., Everslay. Basingtoke. England. 709 p.
- Harminingsih, I. 2007. Pengaruh Konsentrasi BAP Terhadap Multiplikasi Tunas Anthurium (*Anthurium andraeanum* Linden) Pada Beberapa Media Dasar Secara In Vitro. Skripsi S1 Fakultas Pertanian UNS.
- Huetteman dan Preece, IA. 1993. Thidiazuron : A Potent Cytokinin For Woody Plant Tissue Culture. *Plant Cell Tissue And Organ Culture* 33: 105-119.
- Kristina, N.N., N. Bermawie, Amalia dan Nursalam, 2004. Konservasi in vitro tanaman rempah dan obat. Laporan teknis Balitro (tidak dipublikasi). hal. 20-85.
- Lu, C. Y. 1993. The Use of Thidiazuron in Tissue Culture . *In vitro Cell. Dev. Biol.* 29: 92-96.
- Nielsen J. M., Hansen J., Brandt K. (1995). Synergism of Thidiazuron and Benzyladenine in Axillary Shoot Formation Depends on Sequence of Application in *Miscanthus* and *Ogiformis* 'Giganteus'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 41 : 65-70.
- Rahmayanti, E dan Sitanggang, S. 2008. Taklukan Penyakit dengan Klorofil Alfalfa. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Sadik, K., P. R. Rubaihayo, M. J. S. Magambo dan M. Pillay. 2006. Generation of cell suspensions of East African highland bananas through scalps. *African Journal of Biotechnology* 6(11) : 1352-1357.
- Salisbury, F. B dan Ross, C. W. 1995. Fisiologi Tumbuhan.(Diterjemahkan oleh Diah R. L. dan Sumaryono). Penerbit ITB, Bandung.
- Shan, X., D.Li, dan R.Qu. 2000. Thidiazuron promotes In vitro Regeneration of Wheat and Barley In vitro Cellular Developmental Biology. *Plant.* 36:207-210
- Sitompul, S. M. dan B. Guritno.1995. Analisis Pertumbuhan Tanaman. UGM Press, Yogyakarta.
- Strabala TJ, Yan HW and Yi L. 1996. Combined Effect of Auxin Transport Inhibitor and Cytokinin : Alterations of Organ Development in Tobacco. *Plant Cell Physiol.* 37(8): 1177-1182.
- Suryowinoto, M. 1996. Pemuliaan Tanaman Secara in vitro. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Tefera, W dan S. Wannakrairoj. 2006. Synergistic Effects of Some Plant Growth Regulators In Vitro Shoot Proliferation of Korarima (*Aframomum corrorima* (Braun Jansen). *Afrika Journal of biotechnology* 5 (10): 1984-1901
- Victor, J.M.R., S.J. Murch, S. Krishna Raj, and P.K. Saxena. 1999. Somatic Embryogenesis and Organogenesis in Peanut: The Role of Thidiazuron and N6-Benzylaminopurine in The Induction of Plant Morphogenesis. *Plant Growth Regulation* 28: 9–15.
- _____. 1992. Kultur Jaringan Tanaman, Bioteknologi Tanaman, Pusat Antar Universitas. IPB, Bogor.
- Yelnititis. 1996. Pengaruh BA, Thidiazuron dan Auksin (IAA dan IBA) terhadap multiplikasi tunas dan perakaran in vitro encok. Prosiding Simposium Nasional Tumbuhan Obat dan romatik. APINMAP. Bogor. Hal 278-283.
- _____, N., Bermawie, dan Syafaruddin, 1999. Perbanyak klon Lada Varietas Panniyur secara In Vitro. *Jurnal penelitian Tanaman Industri.* 5 (3) : 109-114.
- _____, dan D. Surachman. 2000. Pengaruh BAP dan Thidiazuron terhadap inisiasi dan multiplikasi tunas tapak dara. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat.* XI (2) : hal. 11 – 18.