

Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) Secara *In Vitro* Pada Media Murashige & Skoog Dengan Konsentrasi Sukrosa Yang Berbeda

Ertina Novaria Sitorus, Endah Dwi Hastuti dan Nintya Setiari
Laboratorium Biologi dan Struktur Fungsi Tumbuhan FMIPA Undip

Abstract

Binahong (*Basella rubra* L.) is a plant medicine consisting secondary metabolites which have virtue as medicines for several diseases that could also be used as coloring agent. The medicine compounds in secondary metabolites could be extracted from callus. Sucrose is one of the components that build MS (Murashige & Skoog) medium. Sucrose is important in *in vitro* culture, it functions as carbon and energy source for explant to grow. The purposes of this research are to study the effect of sucrose in MS medium towards *B. rubra* L callus formation and growth; to find the optimum sucrose concentration for callus *B. rubra* L formation; and also to find the fastest initiation time to produce callus crumb. This research uses Complete Random Design (CRD) single factor method, *i.e.*, sucrose concentration of 0 g/l, 10g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l with five repetitions. The data is analysed with *Analysis of Varian* (Anova) and if a real difference is found the analysis is continued with *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) with significancy level of 95%. The results show that various sucrose concentrations in MS medium influences callus *B. rubra* L induction. The highest sucrose concentration, *i.e.* 40 g/l, which was added into MS medium, could induce the maximum callus wet-weight of 1,69 g and the fastest callus initiation time of 4,8 day.

Keywords: Binahong (*Basella rubra* L.), sucrose, callus.

Abstrak

Binahong (*Basella rubra* L.) merupakan tanaman obat yang mengandung metabolit sekunder, yang mempunyai khasiat untuk mengobati berbagai macam penyakit dan juga sebagai pewarna. Senyawa obat dalam metabolit sekunder ini dapat diperoleh dari kalus. Sukrosa merupakan salah satu komponen penyusun media MS (Murashige & Skoog) yang penting dalam kultur *in vitro* yang berfungsi sebagai sumber karbon dan sumber energi eksplan untuk dapat tumbuh. Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji pengaruh sukrosa dalam media MS terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus *B. rubra* L., juga untuk mengetahui konsentrasi sukrosa yang optimal untuk pembentukan kalus *B. rubra* L., serta menghasilkan kalus remah dengan waktu inisiasi paling cepat. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal, yaitu konsentrasi sukrosa 0 g/l, 10g/l, 20 g/l, 30 g/l, 40 g/l dengan 5 kali ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan *Analysis of Varian* (Anova) dan apabila terdapat perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf signifikan 95%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, pemberian sukrosa dengan konsentrasi yang berbeda dalam media Murashige & Skoog, dapat mempengaruhi induksi kalus *B. rubra* L. Konsentrasi sukrosa paling tinggi yaitu 40 g/L, yang ditambahkan kedalam media MS, dapat menginduksi berat basah kalus maksimal (1,69 g) dan waktu inisiasi kalus paling cepat (4,8 hari).

Kata kunci: Binahong (*Basella rubra* L.), sukrosa, kalus.

PENDAHULUAN

Binahong (*Basella rubra* L.) mengandung metabolit sekunder yang berkhasiat obat. Tanaman ini dapat digunakan untuk meningkatkan vitalitas pria, menyembuhkan penyakit tipus, maag, radang usus, rematik, luka memar terpukul, asam urat, dan ambeien, menyembuhkan luka dalam dan luar

setelah operasi, mengatasi pembengkakan dan pembekuan darah, memulihkan kondisi lemah setelah sakit, serta mencegah stroke. Semua bagian tanaman binahong seperti umbi, batang dan daun dapat digunakan dalam terapi herbal (Anonim, 2004). Binahong mengandung berbagai senyawa kimia antara lain: anthosianin, glukukan, karoten,

asam organik, mukopolisakarida seperti L-arabinosa, D-galaktosa, L-rhamnosa, asam aldonat, juga mengandung saponin, vitamin A, B, dan C (Ozella *et al.*, 2007).

Peningkatan penggunaan bahan alam sebagai obat menyebabkan kebutuhan bahan untuk obat yang berasal dari tumbuhan semakin bertambah dari waktu ke waktu. Kebutuhan senyawa obat semakin tinggi, sementara lahan dan plasma nutfah semakin menyusut, oleh karena itu diperlukan alternatif pemecahan. Teknik kultur jaringan tumbuhan atau kultur *in vitro* dapat dijadikan sebagai alternatif pemecahan masalah bagi perbanyakan bibit dan perolehan metabolit sekunder dari tanaman ini. Teknik ini dapat menghasilkan metabolit sekunder dalam jaringan tanaman dan juga dalam sel-sel yang dipelihara pada media buatan secara aseptik (Fitriani, 2003).

Metabolit sekunder bisa diperoleh melalui kultur kalus. Metabolit yang dihasilkan dari kalus sering kali kadarnya lebih tinggi dari pada metabolit yang diambil langsung dari tanamannya. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan pertumbuhan kalus adalah dengan menambahkan pra zat ke dalam media. Media kultur jaringan tumbuhan berisi garam-garam mineral, hormon, vitamin, sumber karbon, dan asam amino. Smith (1992) menyatakan pemilihan media kultur jaringan merupakan kunci sukses dalam kultur jaringan. Hal ini menyebabkan banyak diadakan penelitian untuk memodifikasi media-media yang memberikan respon berbeda terhadap berbagai macam tanaman.

Sumber karbon merupakan salah satu faktor yang sangat penting untuk menentukan keberhasilan kultur jaringan selain kombinasi zat tumbuh (ZPT). Sumber karbon berfungsi sebagai sumber energi yang dibutuhkan oleh sel untuk dapat melakukan pertumbuhan (Kimball, 1994). Glukosa dan fruktosa sebagai hasil hidrolisis sukrosa dapat merangsang pertumbuhan beberapa jaringan. Konsentrasi sukrosa berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus (Srilestari, 2005). Induksi kalus embrio somatik kacang tanah pada media MS dengan konsentrasi sukrosa 20 g/L, 30 g/L dan 40 g/L menunjukkan hasil bahwa, pada media yang mengandung sukrosa 40 g/L, embrio tumbuh lebih cepat dibandingkan pada media dengan konsentrasi sukrosa 20 g/L dan 30 g/L,

namun pada induksi kalus rimpang jahe konsentrasi sukrosa diatas 60 g/L dapat menghambat (Marlin, 2005 & Srilestari, 2005). Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dikaji beberapa konsentrasi sukrosa, untuk memperoleh pertumbuhan dan perkembangan kalus *B. rubra.* yang optimal pada media MS.

BAHAN DAN METODE

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: labu Erlenmeyer, gelas ukur, gelas beker, cawan petri, botol kultur, pipet, spatula, skalpel, pinset, aluminium foil, neraca analitik, autoklaf, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, kertas saring, pH meter, *Laminar Air Flow (LAF)*, rak botol kultur, dan lampu bunsen.

Bahan-bahan yang digunakan adalah: media MS yang terdiri dari makro nutrien (NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), mikronutrien (H_3BO_3 , KI , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Vitamin, zat besi (Fe), serbuk agar, sukrosa, BAP, IBA, akuades, larutan bayclin, alkohol, daun Binahong (*B. rubra.*).

Cara membuat media yaitu bahan-bahan dimasukkan ke dalam gelas becker mulai dari makro nutrien, mikro nutrien, besi, vitamin, ZPT berupa 0,5 ppm IBA dan 0,4 ppm BAP serta akuades sebanyak 100 ml, kemudian media diaduk dengan menggunakan stirer di atas hot plate sampai mendidih. Pemberian sukrosa pada media sesuai dengan perlakuan konsentrasi: 0 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l dan 40 g/l. Pengaturan pH dilakukan setelah pemberian sukrosa. Apabila pH kurang dari 5,7-5,8 maka dapat ditambah dengan NaOH, sedangkan bila pH lebih dari kisaran tersebut maka ditambah dengan HCl. Akuades ditambahkan sampai 500 ml, kemudian dimasukkan serbuk agar ke dalam labu Erlenmeyer dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* sampai mendidih. Media selanjutnya dituang ke dalam botol kultur dan ditutup dengan aluminium foil.

Botol-botol eksplan yang sudah berisi media ditutup dengan aluminium foil, kemudian disterilisasi dengan otoklaf. Teknik sterilisasi media sama seperti sterilisasi alat.

Laminar Air Flow (LAF) dan alat yang digunakan disterilkan dengan cara disemprot dengan alkohol 70%. Alat yang akan digunakan diletakkan di dalam LAF, kemudian Fan dan Lampu UV pada LAF dinyalakan selama 30 menit.

Eksplan daun *B. rubra*. dicuci dengan air mengalir kemudian dicuci dengan larutan deterjen selama 15 menit untuk menghilangkan spora jamur dan larva serangga. Eksplan dibilas dan dimasukkan dalam labu Erlenmeyer yang berisi akuades, selanjutnya dimasukkan dalam LAF. Setelah 5 menit, air dibuang dan eksplan dimasukkan dalam alkohol 70%, selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan bayclin 10%. Eksplan digojog dalam larutan ini selama 3 menit, kemudian larutan bayclin dibuang, selanjutnya dibilas tiga kali dengan akuades steril sambil digojog selama 10 menit. Eksplan diambil dengan pinset dan diletakkan dalam cawan petri yang telah diberi kertas saring, kemudian dipotong-potong dengan ukuran 1 cm². Potongan eksplan kemudian dimasukkan ke dalam botol kultur yang telah berisi media tumbuh ditutup kembali dengan aluminium foil dan diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 25⁰C, intensitas cahaya 1000 lux (lampu TL 20 watt).

Pengamatan dilakukan setiap hari selama ± 4 minggu. Parameter pada pengamatan pertumbuhan kalus meliputi:

a. Berat basah kalus

Berat basah kalus diukur dengan cara menimbang kalus yang terbentuk dengan menggunakan neraca analitik.

b. Waktu inisiasi kalus

Waktu inisiasi kalus ditentukan dengan cara mengamati eksplan sejak awal penanaman, sampai muncul kalus pertama kali.

c. Persentase terbentuknya kalus

Cara menghitung persentase terbentuknya kalus yaitu:

$$\frac{\text{Jumlah kalus Yang Tumbuh Tiap Perlakuan}}{\text{Jumlah Ulangan Tiap Perlakuan}} \times$$

100%

d. Morfologi kalus

Morfologi kalus yang diamati meliputi: tekstur kalus yaitu kalus remah atau kalus kompak, dan juga warna kalus.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan faktor tunggal yaitu konsentrasi sukrosa dalam media MS dengan 5 perlakuan yaitu: 0 g/l, 10 g/l, 20 g/l, 30 g/l dan 40 g/l. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan *Analysis of varian* (ANOVA) dan apabila terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) (Trigiono & Gray, 2000). Uji normalitas dan DMRT dilakukan dengan program komputer SPSS versi 12 (Pratisto, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

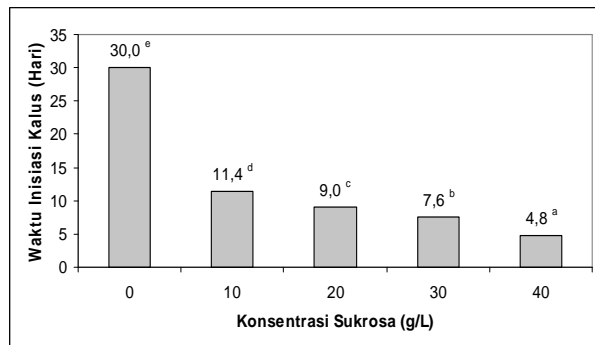
Hasil pengamatan pertumbuhan kalus *B rubra*. pada media MS dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda tersaji pada Tabel 1 berikut ini:

Tabel 1. Rerata waktu inisiasi kalus, persentase terbentuknya kalus dan berat basah kalus, *B rubra* . pada media MS dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda.

Konsentrasi Sukrosa (g/L)	Waktu Inisiasi Kalus (hari)	Persentase Terbentuknya Kalus (%)	Berat Basah Kalus (g)
0	Tidak terbentuk kalus (30) ^e	0	0
10	11,4 ^d	100	0,35 ^{cd}
20	9,0 ^c	100	0,65 ^{bc}
30	7,6 ^b	100	1,08 ^b
40	4,8 ^a	100	1,69 ^a

1. Waktu Inisiasi Kalus

Hasil analisis of varian (Anova) pada taraf kepercayaan 95% menunjukkan bahwa perlakuan sukrosa dengan konsentrasi yang berbeda pada media MS berpengaruh nyata terhadap rata-rata waktu inisiasi terbentuknya kalus. Hasil uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* pada parameter waktu inisiasi kalus *B rubra* . menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa 40 g/l, 30 g/l, 20 g/l, 10 g/l dan 0 g/l berbeda nyata antar perlakuan (Gambar 1.).



Gambar 1. Histogram rerata waktu inisiasi kalus (hari) *B. rubra.* pada media MS dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda

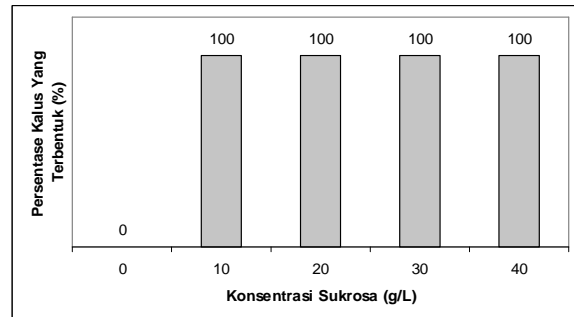
Gambar 1 menunjukkan bahwa kalus *B. rubra.* paling cepat tumbuh pada media MS dengan perlakuan konsentrasi sukrosa 40 g/l yaitu kalus sudah terbentuk rata-rata pada hari ke 4,8. Sukrosa konsentrasi 30 g/l yang ditambahkan pada media MS dapat membentuk kalus dalam waktu yang lebih singkat yaitu pada hari ke 7,6; diikuti sukrosa 20 g/l pada hari ke 9 dan sukrosa 10 g/L pada hari ke 11,4. Media tanpa penambahan sukrosa (0 g/l) sampai akhir pengamatan tidak mampu menginisiasi terbentuknya kalus.

Pemberian sukrosa dalam media akan menjadi sumber energi dan sumber karbon bagi sel-sel eksplan untuk dapat tumbuh. Peningkatan konsentrasi sukrosa yang diberikan akan menyebabkan eksplan memperoleh sumber energi dan sumber karbon yang lebih banyak, sehingga akan dapat mempercepat pertumbuhan eksplan. Sumber energi yang semakin banyak mengakibatkan pembelahan sel yang lebih cepat sehingga pertumbuhan kalus akan lebih cepat.

Sukrosa juga dapat menjaga tekanan osmotik media. Pada media yang mengandung sukrosa lebih banyak akan mengakibatkan gradien konsentrasi yang lebih tinggi antara media dengan sel eksplan. Media dengan gradien konsentrasi yang lebih tinggi ini akan mengakibatkan gerakan difusi lebih cepat ke dalam sel yang mempunyai konsentrasi yang lebih rendah (Salisbury & Ross, 1995). Keadaan ini menyebabkan sel-sel eksplan pada konsentrasi sukrosa 40 g/l dapat lebih cepat menyerap nutrisi dalam media untuk pertumbuhannya.

2. Persentase Terbentuknya Kalus

Persentase kalus yang terbentuk pada semua perlakuan, tidak menunjukkan adanya perbedaan (Gambar 2).



Gambar 2. Histogram persentase (%) terbentuknya kalus *B. rubra* pada media MS dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda

Masing-masing konsentrasi sukrosa yang diberikan pada media MS dapat menginduksi terbentuknya kalus *B. rubra.*, sebesar 100%. Media tanpa penambahan sukrosa (0 g/l) tidak mampu untuk menginduksi terbentuknya kalus (0%) karena tidak terdapat sumber energi dan sumber karbon yang dibutuhkan oleh sel-sel untuk dapat tumbuh. Konsentrasi sukrosa 10% - 40% mampu untuk menginduksi terbentuknya kalus *B. rubra* L. karena sukrosa merupakan sumber karbon yang terbaik sebagai bahan baku dalam proses respirasi (Srilestari, 2005).

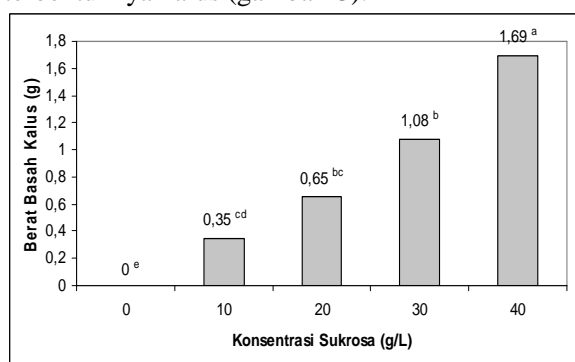
Pembentukan kalus terjadi karena adanya luka yang diberikan pada eksplan, sehingga sel-sel pada eksplan akan memperbaiki sel-sel yang rusak tersebut. Pada awalnya terjadi pembentangan dinding sel dan penyerapan air, sehingga sel akan membengkak selanjutnya terjadi pembelahan sel. Sel dapat melakukan aktivitas metabolik tersebut membutuhkan energi. Sukrosa yang ditambahkan dalam media, akan menjadi sumber energi sel-sel eksplan, sehingga sel dapat mengalami pembentangan dan pembelahan selanjutnya akan membentuk kalus.

Kultur kalus merupakan budidaya secara heterotrof. Sel tidak dapat melakukan fotosintesis untuk menghasilkan karbon seperti halnya tanaman autotrof, sehingga sumber karbon harus diperoleh dalam bentuk karbohidrat yang ditambahkan dari luar. Gula merupakan sumber karbon sebagai pengganti karbon yang biasanya

diperoleh tanaman dari atmosfer dalam bentuk CO₂ untuk bahan fotosintesis. Jika tidak ada sukrosa, maka aktivitas dan pertumbuhan kalus tidak dapat berlangsung dan pada akhirnya sel-sel tersebut akan mati, karena tidak ada sumber energi. Hal tersebut membuktikan bahwa sukrosa merupakan komponen penting yang harus tersedia dalam media kultur jaringan tumbuhan.

3. Berat Basah Kalus

Rata-rata berat basah kalus *B. rubra* paling tinggi dihasilkan pada konsentrasi sukrosa 40 g/l selanjutnya 30 g/l, 20 g/l, dan 10 g/l berturut-turut dengan berat basah kalus yaitu 1,69 g; 1,08 g; 0,65 g dan 0,35 g, sementara hasil terendah terdapat pada konsentrasi sukrosa 0 g/l karena tidak mampu untuk menginduksi terbentuknya kalus (gambar 3).



Gambar 3. Histogram rerata berat basah kalus (g) *B. rubra* pada media MS dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda

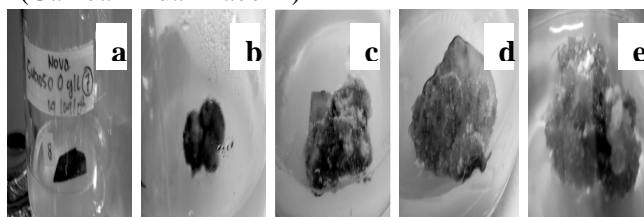
Pemberian sukrosa 40 g/L mampu menghasilkan berat basah kalus paling tinggi karena semakin banyak sukrosa, maka sumber karbon dan energi yang diperoleh oleh sel eksplan semakin banyak sehingga pembelahan sel, pembesaran sel, serta diferensiasi sel akan semakin baik. Sukrosa yang ditambahkan dalam media akan berfungsi sebagai bahan baku dalam proses respirasi oleh sel-sel eksplan untuk dapat melakukan aktivitas sel (Kimbal, 1994 & Wirahadikusumah, 1985). Sukrosa dalam media akan dihidrolis menjadi glukosa dan fruktosa. Glukosa akan mengalami penguraian melalui respirasi sel yang akan menghasilkan karbon dan energi. Energi ini akan digunakan oleh sel-sel eksplan untuk menutupi luka yang terjadi dengan

cara membentuk kalus. Pemberian sukrosa dengan konsentrasi yang semakin meningkat akan menjamin ketersediaan sumber energi bagi sel untuk dapat tumbuh. Pada media dengan sukrosa yang konsentrasinya lebih kecil, sumber energinya akan lebih cepat habis seiring dengan pertumbuhan sel, sehingga sel tidak dapat melakukan pertumbuhan lagi.

Karbon merupakan komponen penting bagi senyawa-senyawa penyusun sel seperti karbohidrat, lipid, protein dan asam nukleat (Campbell *et al.*, 2003). Jika sumber karbon mencukupi maka komponen-komponen sel ini akan terbentuk cepat, waktu inisiasi kalus akan lebih cepat sehingga sel akan mempunyai kesempatan untuk membelah lebih optimal. Pembelahan sel yang optimal akan menyebabkan pertumbuhan kalus yang optimal dan akan meningkatkan berat basah kalus. Pada penelitian ini konsentrasi sukrosa 40 g/l mampu menginisiasi kalus paling cepat dan juga menghasilkan berat basah kalus paling tinggi. Hal ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kaul & Shabarwal (1971) bahwa konsentrasi sukrosa 40 g/l sampai 60 g/l merupakan konsentrasi paling optimum dalam menginduksi kalus tembakau, sementara konsentrasi sukrosa diatas 60 g/l dapat menghambat pertumbuhan kalus.

4. Morfologi Kalus

Morfologi kalus *B. rubra* L. yang dihasilkan pada tiap konsentrasi sukrosa menunjukkan bentuk, warna dan tekstur kalus yang berbeda (Gambar 4 dan Tabel 2)



Gambar 4. Morfologi kalus *B. rubra*. Pada perlakuan sukrosa yang berbeda

Keterangan :

- a : Eksplan pada perlakuan 0 g/l
- b : Kalus pada perlakuan 10 g/l
- c : Kalus pada perlakuan 20 g/l
- d : Kalus pada perlakuan 30 g/l
- e : Kalus pada perlakuan 40 g/l

Tabel 2. Tekstur kalus *B. rubra* pada media MS dengan pemberian sukrosa dengan konsentrasi yang berbeda

Konsentrasi Sukrosa (g/L)	Tekstur
0	-
10	Remah
20	Remah
30	Remah
40	Remah

Kalus yang dihasilkan pada perlakuan konsentrasi sukrosa 10 g/L sampai 40 g/L mempunyai tekstur kalus remah (tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa untuk inisiasi kalus *B. rubra* L. konsentrasi sukrosa 10 g/L sudah mampu untuk membentuk tekstur kalus yang remah. Kalus remah merupakan kalus yang paling baik. Kalus remah ialah kalus yang tumbuh terpisah-pisah menjadi bagian-bagian yang kecil, mudah lepas dan mengandung banyak air (Zakiah dkk, 2003 & Anonim, 2007).

Pada Gambar 4 terlihat bahwa pada media yang ditambah sukrosa 10 g/L dan 20 g/L, kalus terbentuk hanya pada bagian eksplan yang luka saja, tidak semua permukaan eksplan membentuk kalus. Hal ini diduga karena pada media dengan konsentrasi sukrosa 10 g/L dan 20 g/L sumber karbon dan energi yang tersedia terbatas sehingga proses pembelahan sel-sel eksplan dan pembentukan kalus tidak optimal. Pada sukrosa 30 g/L dan 40 g/L kalus yang terbentuk merata pada semua permukaan eksplan. Hal ini diduga karena pada media dengan sukrosa 30 g/L dan 40 g/L sumber karbon dan energi yang terdapat lebih banyak sehingga proses pembelahan sel-sel eksplan dan pembentukan kalus optimal. Pada konsentrasi sukrosa 0 g/L eksplan tidak dapat tumbuh dan eksplan berwarna coklat serta mulai membusuk. Hal ini karena tidak ada sukrosa, sehingga sel-sel pada eksplan tidak mendapat sumber energi dan karbon untuk dapat tumbuh dan membentuk komponen-komponen sel, sehingga sel-sel pada eksplan menjadi mati atau membusuk.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah Media MS (Murashige & Skoog) dengan konsentrasi sukrosa

paling tinggi yaitu 40 g/L dapat menghasilkan berat basah kalus *Basella rubra* L. maksimal dan waktu inisiasi kalus paling cepat

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1985. **Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh**. Angkasa. Bandung
- Anonim. 2004. **Kultur Jaringan Alternatif Pengadaan Bibit Unggul**. http://www.dephut.go.id/INFORMASI/SETJEN/PUSSTAN/info_5_1_0604/misi_11.htm. 20 September 2006.
- _____. 2007. **Budidaya Tanaman Semusim**. http://www.ditjenbun.Deptan.go.id/web/semusim/index2.php?option=content&do_pdf=1&id=39. 25 september 2006.
- _____. 2008. **Metabolisme karbohidrat**. http://www.Rumahmadu.com/uploaded_images/fruktosa-794720.png. 18 agustus 2008.
- Campbell. N.A, Reece. J.B, and Mitchell. L.W. 2003. **Biologi. Alih Bahasa: Wasmen Manalu..** Erlangga. Jakarta.
- Dixon, R & Gonzales, R.A.1994. **Plant Cell Culture A practical Approach second edition**. Oxford University Press. New York.
- Endress, R. 1994. **Plant Cell Biotechnology**. Berlin Heidelberg. New York.
- Fitriani, A. 2003. **Kandungan Ajmalisin Pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Setelah dielisitasi Homogenat Jamur *Pythium aphanidermatum* Edson Fitzp. Makalah Pengantar Falsafah Sains PS702**.
- Hanafi. 2006. **Grafting Tanaman Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) Pada Berbagai Varietas Entris Dan Tinggi Batang Bawah**. *Jurnal Sinergis Ilmu Pengetahuan dan Teknologi* february 2006 Vol.1.No 1 Seri Agropolitan 10-17
- Hendaryono, D.P & Ari, W.1994. **Teknik Kultur Jaringan : Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman Secara Vegetativ Modern**. Kanisius. Yogyakarta.
- Kaul, K & Shabarwal, P. 1971. **Effect of Sukrosa and Kinetin on Growth and chlorophyll**

- Synthesisin Tobacco Tissue Culture.** Department of Botany. University of Kentucky. Lexington. *Plant Physiol.* 691-695
- Kimball, J.W. 1994. **Biologi.** Erlangga. Bogor
- Krishnamoorthy, H.N.1981. **Plant Growth Substances.** Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. New Delhi.
- Mariska, I & Purnamaningsih, R. 2001. **Perbanyakan Vegetatif Tanaman Tahunan Melalui Kultur Invitro.** *Jurnal Litbang Pertanian* No 21 (1)
- Marlin. 2005. **Pembentukan Rimpang Mikro Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) Secara invitro dengan pemberian Benzyl Amino Purin dan Sukrosa.** *Jurnal Akta Agrosia* Vol. 8. No 2. Hlm. 70-73
- Narayanaswamy, S. 1994. **Plant Cell and Tissue Culture.** Tata Mc Graw-Hill Publishing Company Limited. New Delhi.
- Nisa, C dan Rodinah. 2005. **Kultur Jaringan Beberapa Kultivar Buah Pisang (*Musa Paradisiaca* L) Dengan Pemberian Campuran Kinetin Dan NAA.** *Bioscientiae* Vol 2. No 2. Hal 23-36.
- Ozella, E.F., Stringheta, P.C.& Chauca.M.C. 2007. **Stability of Anthocyanin of Spinach vine (*Basella rubra*) Fruits.** *Cienciae Investigacion Agraria.*
- Pierik, R.L.M.1987. **In Vitro Culture of Higher Plants.** Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands.
- Pratisto, A. 2005. **Cara Mudah Mengatasi Masalah Statistik dan Rancangan Percobaan dengan SPSS 12.** PT. Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia, Jakarta.
- Purbadi & Widiastoety, D, 2003. **Pengaruh ubi kayu dan Ubi Jalar Terhadap Pertumbuhan Planlet Anggrek *Dendrobium*.** Balai Penelitian Tanaman Hias Cianjur. *Jurnal Hortikultura* 13(1): 1-6
- Roostika, Mariska, Wattimena, Sunarlim & Kosmiatin. 2003. **Kriopreservasi Ubi Jalar Secara Enkapsulasi-Vitrifikasi.** Balai penelitian bioteknologi dan sumber daya Genetik. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* Vol 22. No. 3
- Salisbury, F.B & Ross, C.W. 1995. **Fisiologi Tumbuhan.** *Alih Bahasa:* Lukman, D.R & Sumaryono. Penerbit ITB. Bandung.
- Sitorus, E.N. 2007. **Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra*) Pada Medium MS (Murashige & Skoog) dengan kombinasi ZPT IBA dan BAP.** *Laporan kerja praktek.* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. UNDIP .Semarang.
- Smith, R.S. 1992. **Plant Tissue Culture Techniques and Experiments.** Academic Press. USA.
- Srilestari, R. 2005. **Induksi Embrio Somatik Kacang tanah Pada Berbagai Macam Vitamin dan Sukrosa.** *Ilmu pertanian* Vol 12. No. 1. Hal 43-51.
- Steenis, K.R. 2003. **Flora Alih bahasa:** Moeso S; Soenarno H; Soerjo S. A; Wibisono; Margono P dan Soemantri W. Pradya Paramita, Jakarta
- Suryowinoto, M. 1989. **Totipotency of The Pollenrads *Dendrobium* Tommy White.** Asean Orchid Conference. Manila.
- Trigiono, R & Gray, J.D. 2000. **Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercise** CRC. Press. Amerika.
- Winata. L. 1988. **Tehnik Kultur Jaringan Tumbuhan.** Pusat Antar Universitas. Biotehnologi. IPB. Bogor.
- Wirahadikusumah, M. 1985. **Biokimia: Metabolisme Energi, Karbohidrat dan Lipid.** Penerbit ITB. Bandung.
- Zakiah. Z, Marwani. E, Siregar. A. 2003. **Peningkatan Produksi Azadirachtin dalam kultur suspensi sel *Azadiractha indica* A. juss melalui penambahan Skualen.** *Jurnal matematika dan sains* Vol 8. No. 4. Hal 141-146.