

**PENGARUH KOMBINASI 2,4-D DAN BENZIL AMINO PURIN (BAP)  
TERHADAP PEMBENTUKAN KALUS PADA EKSPLAN DAUN  
KENCUR (*Kaemferia galangal* L) SECARA IN VITRO**

**Anis Shofiyani dan Agus Mulyadi Purnawanto**  
Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Purwokerto  
Jl. Raya Dukuwaluh PO Box 202 Purwokerto

**ABSTRACT**

**T***his research aim to learn the influence of combination of concentration plant growth regulator 2,4-D and BAP to callus induction at eksplan of Koempferia galanga leaf, proliferasi callus at eksplan and also know the interaction influence between 2,4-D and BAP to obtaining culture of callus Koempferia galanga which its growth good.*

*This research was conducted from April to September 2010, in Laboratory of Tissue Culture, FKIP, University of Muhammadiyah Purwokerto. The Trial was arranged in Complete Random Design (CRD). Perception variable cover the : time induce the callus, percentage explant growth, callus volume which grow from explants leaf , culture appearance visually and percentage contamination.*

*Result of research indicate that the Combination of concentration of Plant growth regulator 2,4-D at concentration 0 - 2 mg / l of medium and BAP at] concentration 0 - 0,3 mg / l medium still not yet able to induce formed is callus at eksplan of leaf Koempferia galanga during research. Disability Explants form the callus because of fenol high rate enough in tissue explant and also not yet proportional it concentration 2,4 D and Benzil Aminopurin which can depress the sintesis fenol in and death at explant of koempferia galanga leaf.*

**PENDAHULUAN**

Konsep hidup kembali ke alam (back to nature) saat ini semakin digalakkan dengan tujuan menekan penggunaan bahan-bahan sintesis (mengingat efek sampingnya), mengendalikan pola hidup yang konsumtif dan mengoptimalkan potensi alam yang ada. Salah satu realisasinya adalah penggunaan obat tradisional

yang bersumber dari tumbuh-tumbuhan. Berdasarkan hal itu dapat diperkirakan bahwa permintaan obat tradisional baik dalam negeri maupun luar negeri akan meningkat. Peningkatan tersebut akan dipacu oleh semakin tingginya harga obat sintesis dan khususnya di Indonesia harganya naik sampai 400 % akibat krisis

ekonomi (Ruspany, 2000 *cit* Shofiyani, 2003).

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai obat yaitu kencur (*Kaempferia galangal* L) . Kencur banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional (jamu), fitofarmaka, industri kosmetika, penyedap makanan dan minuman, rempah, serta bahan campuran saus rokok pada industri rokok kretek. Secara empirik kencur digunakan sebagai penambah nafsu makan, infeksi bakteri, obat batuk, disentri, tonikum, ekspektoran, masuk angin, sakit perut karena rimpangnya mengandung antara lain saponin, flavonoid, fenol serta minyak atsiri ( Syamsuhidayat dan Johnny, 1991).

Senyawa saponin, flavonoid, fenol serta minyak atsiri yang terkandung di dalam kencur merupakan hasil metabolit sekunder suatu tanaman (Indrayanto, 1987). Tanaman obat dan aromatik dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder bernilai ekonomi tinggi, seperti vinblastina/vinkristina pada tanaman tapak dara (*Vinca rosea*), ajmalisina, digitalis (*Dioscorea* sp), kinina

pada tanaman kina (*Cinchoa* sp.), kodeina, yasmin pada tanaman melati (*Jasminum sambac*), piretrin pada tanaman Piretrum (*Pyrethrum pelargonium*) dan spearmint pada tanaman mentha (*Mentha* sp.), (Harris, 1989).

Dalam kenyataannya, produksi metabolit sekunder dari rimpang kencur untuk kebutuhan pabrik-pabrik industry sangat dipengaruhi oleh keberadaan dan pertumbuhan tanaman di lapang yang ditentukan oleh berbagai factor lingkungan seperti tanah, nutrisi, iklim serta hama dan penyakit. Salah satu upaya untuk menghasilkan metabolit sekunder dengan jumlah yang banyak adalah dengan teknologi kultur jaringan seperti kultur kalus. Kultur *in vitro* tidak hanya dapat digunakan untuk konservasi dan perbanyak tanaman, melainkan dapat juga diterapkan untuk produksi metabolit sekunder. Melalui teknik ini, produksi metabolit sekunder tidak bergantung kepada sumber tanaman di lapang.

Kombinasi zat pengatur tumbuh yang tepat merupakan salah satu faktor yang menentukan

keberhasilan kultur kalus. Ada tiga jenis zat pengatur tumbuh yang dibutuhkan untuk menginduksi pembelahan sel yaitu kelompok auksin yang meliputi IAA, IBA, NAA dan 2,4 D; kelompok sitokinin dan adenin, meliputi BA, BAP, DMAA, Ad-SO<sub>4</sub> dan kinetin serta kelompok giberelin, yaitu GA<sub>3</sub> (George dan Sherrington, 1984). Pembentukan kalus dapat diinduksi dengan cara mengatur pemberian zat pengatur tumbuh dengan jenis dan konsentrasi yang tepat.

Senyawa 2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman (Bhojwani dan Razdan, 1996). Zat pengatur tumbuh ini juga efektif untuk inisiasi kalus (Nagasawa dan Finer 1988). Penggunaan kombinasi antara auksin (2,4-D) dengan sitokinin (Benzyl Adenin ataupun kinetin) akan meningkatkan proses induksi kalus (Litz et al., 1995). Hasil penelitian pada tanaman hias *Alocasia micholitziana*

(Araceae) menunjukkan bahwa induksi kalus dapat diperoleh pada kombinasi auksin (2,4-D) dengan sitokinin (kinetin) dan kalus dapat beregenerasi secara normal pada media yang diperkaya dengan Benzyl Amino Purin (Thao et al., 2003).

Berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa penggunaan 2,4-D dan Benzil Adenin berpengaruh positif terhadap keberhasilan induksi kalus terhadap berbagai eksplan tanaman. Namun demikian sejauh mana peran kedua zat pengatur tumbuh tersebut terhadap keberhasilan induksi kalus eksplan daun kencur perlu dikaji lebih jauh dalam penelitian ini.

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, FKIP Universitas Muhammadiyah Purwokerto, waktu penelitian selama 6 (enam) bulan.

**Alat dan Bahan**

Laminair air flow cabinet (LAF);  
 botol kultur; timbangan analitis; skalpel  
 dan blade; pinset; pH meter; lampu  
 spirtus; gelas ukur; batang pengaduk;  
 otoklaf; lemari es; 2,4-D; BAP; alkohol;  
 alumunium foil; HgCl<sub>2</sub>; aquades; asam  
 sulfat; agar; sukrosa; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O;  
 CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O;  
 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; Glisin; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  
 KI; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O;  
 Myoinositol; Na<sub>2</sub>EDTA;  
 NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; Asam  
 Nikotinat; Piridoksin-HCl; Thiamin-

HCl; Sukrosa; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, Kaporit,  
 Kloroc.

**Rancangan Percobaan**

Perlakuan untuk induksi kalus dan  
 proliferasi kalus terdiri atas dua faktor  
 yaitu konsentrasi 2,4-D dan BAP.  
 Kombinasi perlakuan untuk induksi  
 kalus dan proliferasi kalus masing-  
 masing sebanyak 20 unit perlakuan  
 (tabel 1 dan table 2). Semuanya  
 disusun acak dalam rancangan acak  
 lengkap (RAL) dengan tiga ulangan,  
 dan setiap unit perlakuan menggunakan  
 5 botol kultur.

Tabel 1. Kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP untuk induksi kalus

BAP (mg/l)	0	0,1	0,2	0,3
2,4-D(mg/l)				
0	D0B0	D0B1	D0B2	D0B3
0,5	D1B0	D1B1	D1B2	D1B3
1	D2B0	D2B1	D2B2	D2B3
1,5	D3B0	D3B1	D3B2	D3B3
2	D4B0	D4B1	D4B2	D4B3

Tabel 2. Kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BA untuk proliferasi kalus

BAP (mg/l)	0	0,1	0,2	0,3
2,4-D(mg/l)				
0	D0B0	D0B1	D0B2	D0B3
1	D1B0	D1B1	D1B2	D1B3
2	D2B0	D2B1	D2B2	D2B3
3	D3B0	D3B1	D3B2	D3B3
4	D4B0	D4B1	D4B2	D4B3

## Tata Laksana Penelitian

### Sumber dan Steriliasi Eksplan

Bahan yang digunakan sebagai eksplan adalah daun kencur. Penyediaan eksplan dilakukan dengan cara mengambil potongan daun dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm dari daun yang sudah terpilih dan disterilisasikan. Sterilisasi dengan menggunakan perendaman dalam alkohol 70 % selama 5 menit, dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan kaporit dengan konsentrasi 1 g/100 ml air selama 5 menit.

### Induksi kalus dan Proliferasi Kalus

Untuk menginduksi pembentukan kalus dari eksplan yang ditanam dilakukan pada medium dasar MS dengan penambahan 2,4-D 0 - 2 mg/l medium dan BAP 0 - 0,3 mg/l medium (Tabel 1), dan medium proliferasi kalus menggunakan medium dasar MS dengan penambahan 2,4-D 0 - 4 mg/l medium dan BAP 0 - 0,3 mg/l medium.

Induksi kalus dilakukan dengan cara menanam eksplan dalam medium induksi tunas. Selanjutnya penentuan

medium yang paling banyak menginduksi pembentukan kalus setelah delapan minggu kultur. Proliferasi kalus dilakukan dalam medium proliferasi (tabel 2) dengan tujuan untuk memperbanyak kalus yang sudah didapatkan dari medium induksi tunas.

### Variabel yang diamati

Variabel yang diamati meliputi waktu induksi kalus, persentase eksplan yang tumbuh, volume kalus yang tumbuh dari eksplan daun, penampilan kultur secara visual dan persentase kontaminasi.

### Analisis lanjutan

Pengaruh 2,4-D dan BAP terhadap induksi kalus di uji dengan analisis of varian (ANOVA) pada tingkat kepercayaan 95%. Jika uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, maka analisis dilanjutkan dengan "Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT)" pada tingkat kepercayaan 95 %. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan program "Statistica for Windows Release 5 Statsoft, Inc. 1995".

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kontaminasi

Secara umum tingkat/persentase kontaminasi pada masing-masing perlakuan masih dibawah 30 % (tabel 3).

Dari tabel 3 diatas terlihat bahwa perlakuan sterilisasi menggunakan alkohol 70% selama 5 menit dilanjutkan Perendaman eksplan kedalam larutan kaporit dengan konsentrasi 1 g/100 ml air menunjukkan rerata tingkat persentase kontaminasi sebesar 22,2 %.

### Sumber Kontaminasi

Pengamatan terhadap sumber kontaminasi menunjukkan bahwa sumber kontaminan pada media disebabkan oleh jamur maupun bakteri baik eksternal maupun internal. Kontaminasi lebih banyak disebabkan oleh bakteri internal yang tumbuh di dalam jaringan tanaman. Sumber kontaminan yang menyerang dapat dilihat pada tabel 3 .

Dari data diatas dapat dilihat bahwa perlakuan sterilisasi dengan menggunakan alkohol 70% selama 5

menit dilanjutkan perendaman eksplan kedalam larutan kaporit dengan konsentrasi 1 g/100 ml air menunjukkan sumber kontaminan yang mendominasi kontaminasi pada penelitian ini adalah bakteri internal, kemudian jamur eksternal yang berasal dari media tanam maupun dari eksplan itu sendiri. Munculnya sumber kontaminan di dalam medium MS yang digunakan berkisar pada 12-20 hari setelah eksplan diinokulasi/ditanam.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode sterilisasi yang digunakan sudah cukup efektif untuk mengurangi bahkan menghilangkan sumber kontaminan dari eksplan khususnya untuk kontaminan berupa jamur dan bakteri eksternal. Tingginya kontaminasi yang disebabkan oleh jamur eksternal bukan dari eksplan yang digunakan namun lebih berasal dari spora jamur yang berasal dari lingkungan tempat inkubasi eksplan yang mungkin kurang steril. Sedangkan tingginya kontaminasi oleh bakteri internal disebabkan karena eksplan/bahan tanam berupa daun

kencur sudah membawa bakteri di dalam jaringan daun tersebut, dimana biasanya bakteri yang berada dibagian dalam jaringan tanaman sulit dikendalikan/dihilangkan dengan menggunakan metode sterilisasi yang digunakan.

### **Eksplan yang tumbuh**

Pengamatan persentase eksplan yang tumbuh dapat dilihat pada tabel 4 dibawah ini. Dalam tabel 4 terlihat bahwa persentase eksplan yang tidak terkontaminasi pada masing-masing perlakuan menunjukkan bahwa perlakuan sterilisasi dengan menggunakan alkohol 70% selama 5 menit dilanjutkan perendaman eksplan kedalam larutan kaporit dengan konsentrasi 1 g/100 ml air menunjukkan tingkat eksplan yang tidak terkontaminasi cukup tinggi yaitu sebesar 77,8 %, namun demikian belum ada eksplan yang dapat tumbuh dan membentuk kallus pada masing-masing kombinasi perlakuan 2,4 D dan BAP yang diberikan pada medium tanam sebagai perlakuan untuk menginduksi kallus.

### **Waktu Induksi Kallus, Volume kallus yang Tumbuh dari Eksplan dan Penampilan Kultur secara Visual**

Hasil pengamatan waktu induksi kallus (hst), volume kallus yang tumbuh dari eksplan serta penampilan kultur secara visual tidak dapat disajikan dalam laporan ini. Ketiga variabel pengamatan tersebut dapat diamati setelah eksplan yang ditanam dalam medium induksi kallus menunjukkan pertumbuhan dan perkembangan yang diindikasikan berupa pembentukan kallus dari eksplan daun kencur. Namun demikian hingga akhir pengamatan 8 minggu setelah tanam, eksplan belum menunjukkan tanda-tanda membentuk kallus.

Pertumbuhan dan perkembangan eksplan pada medium dasar MS dengan penambahan 2,4-D 0 - 2 mg/l medium dan BAP 0 - 0,3 mg/l medium belum mampu mengarah pada pembentukan kallus sesuai dengan yang diharapkan. Eksplan yang ditanam dalam medium induksi tunas pada umur 2 minggu setelah tanam sebagian besar masih menunjukkan kondisi eksplan yang cukup baik. Eksplan daun

kencur yang digunakan masih berwarna hijau dan penampilan eksplan masih segar. Namun demikian pada minggu ke 3 pada tepi eksplan mulai terjadi pencoklatan (browning), yang berjalan terus menerus hingga semua eksplan menunjukkan warna pucat (coklat muda).

Proses pencoklatan pada eksplan dalam penelitian ini diduga karena daun kencur yang digunakan sebagai eksplan memiliki kandungan senyawa fenol yang cukup tinggi. Seperti dikemukakan di atas bahwa di dalam tanaman kencur mengandung



a. Eksplan umur 14 HST



b. Eksplan umur 20 hst

Gambar 1. Kondisi esplan dalam medium MS induksi kalus dengan modifikasi 2,4 D dan BAP umur 14 hst – 20 hst.



Gambar 2. Proses pencoklatan pada eksplan daun kencur yang ditanam dalam medium MS induksi kalus dengan modifikasi 2,4 D dan BAP selama penelitian.

senyawa saponin, flavonoid, fenol serta minyak atsiri sebagai hasil metabolit sekunder . Hal ini sesuai dengan pendapat Suskendriyati, et.al (2004) yang menyatakan bahwa akumulasi dan oksidasi senyawa fenol didalam suatu jaringan atau sel merupakan salah satu penyebab terjadinya proses pencoklatan yang berakibat kematian pada eksplan yang digunakan dalam kegiatan kultur in vitro.

Selain kondisi eksplan dimana diduga kandungan senyawa fenol yang cukup tinggi didalam jaringan eksplan , konsentrasi zat pengatur tumbuh khususnya 2,4 D dan Benzil Aminopurin (BAP) yang digunakan dalam penelitian ini memiliki peran terhadap keberhasilan pembentukan kalus pada eksplan daun kencur. Keseimbangan konsentrasi zat pengatur tumbuh jenis auksin dan sitokinin yang digunakan akan mengantarkan sel pada pembentukan kalus.

Seperti yang diungkapkan oleh Widiastoety (1985) bahwa pembentukan kalus terjadi jika perbandingan auksin dan sitokinin

dalam keadaan yang seimbang. Pendapat lain juga diungkapkan Santoso (2004), membuat kalus berarti menginduksi dari bagian tanaman tertentu, yang dirangsang secara hormonal. Kesesuaian dan ketepatan pemilihan jenis dan perimbangan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan akan mempengaruhi keberhasilan pembentukan kalus pada eksplan yang digunakan. Ketidakmampuan eksplan membentuk kalus lebih disebabkan oleh karena kurang tepatnya menggunakan zat pengatur tumbuh yang digunakan khususnya perimbangan konsentrasi 2,4 D dan NAA yang digunakan.

Selain perimbangan zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk induksi kalus, penggunaan sumber eksplan juga berpengaruh terhadap keberhasilan induksi kalus. Dalam penelitian ini eksplan yang digunakan berupa daun kencur yang sudah membuka sempurna (dewasa). Menurut Santoso (2004), penggunaan bagian tanaman yang masih juvenil (muda/meristematik) akan lebih

memudahkan induksi kalus dibandingkan jaringan yang sudah mengalami pendewasaan seperti organ daun. Hal ini berkaitan dengan kondisi totipotensi bahan tanam, dimana pada umumnya sifat totipotensi lebih banyak dimiliki oleh bagian tanaman yang masih juvenil, muda dan banyak dijumpai pada daerah-daerah meristematis tanaman seperti bagian tunas aksilar.

Konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4 D pada kisaran 0-2 mg/l medium dan Benzil Aminopurin (BAP) pada kisaran 0-0,3 mg/l medium, diduga masih sangat rendah (kurang) untuk dapat merangsang sel eksplan daun kecur untuk membentuk kalus.

Pendapat lain yang diungkapkan oleh George and Sherrington (1984) ; Zaid (1995) ; dan Satria (1995) bahwa kombinasi konsentrasi auksin (2,4-D) dan Sitokinin (BAP) yang tinggi dapat menunda sintesa senyawa polyfenol dan mengurangi pencoklatan pada eksplan. Berdasarkan pernyataan diatas diduga konsentrasi auksin jenis 2,4 D pada

kisaran konsentrasi 0-2 mg/l medium yang dikombinasikan dengan senyawa Sitokinin jenis Benzil Aminopurin (BAP) pada kisaran konsentrasi 0-0,3 mg/l masih belum mampu mengurangi sintesa senyawa fenol dan menghilangkan pengaruh fenol yang ada di dalam eksplan terhadap proses pencoklatan pada eksplan.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan di muka dapat disimpulkan bahwa :

1. Kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D pada kisaran konsentrasi 0 – 2 mg/l medium dan BAP pada kisaran konsentrasi 0 – 0,3 mg/l medium masih belum mampu menginduksi terbentuknya kalus pada eksplan daun kecur selama penelitian.
2. Ketidakmampuan eksplan membentuk kalus disebabkan oleh kadungan fenol yang cukup tinggi di dalam jaringan eksplan serta belum berimbangannya konsentrasi

2,4 D dan Benzil Aminopurin yang dapat menekan sintesis fenol di dalam jaringan penyebab poses pencoklatan dan kematian pada eksplan daun kencur.

3. Belum ditemukan pengaruh interaksi antara 2,4-D dan BAP terhadap perolehan kultur kalus kencur yang pertumbuhannya baik dikarenakan belum diperolehnya perimbangan konsentrasi 2,4 D dan BAP yang tepat untuk induksi kalus pada eksplan daun kencur.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bajaj, Y.P.S, 1983. *Production of Normal Seeda from Plants Regenerated from the Meristem of Arachis hypogaea and Cicer arietinum Cryopreserved for 20 Months*. Euphica. 32 : 425-430
- Chiek, L.Y., 1992. *Perbanyakkan Tanaman Nangka (Artocarpus heterophyllus Lank) Melalui Kultur Jaringan*. Karya Ilmiah. Jurusan Budidaya Pertanian Fak. Pertanian IPB. Bogor.
- Davied, A. 1982. *In Vitro Propagation of Gymnospermae in Tissue Culture in Forestry* Bonga J.M. dan Durzan, D.J.,(Ed) M Nijhoff & W. Junk Publ. The Hague, The Netherland.p : 73-108.
- Davies, P.J., 1987. *The Plant Hormone: Their Nature, occurrence and Fuction in Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Develompment*. Davies, P.J. (Ed) M. Nijhoff Publ. Dordrecht, Boston, Lancaster. p : 1-11.
- Ditejabun.2000. Statistik Perkebunan Indonesia 1998-2000. *Panili*. Jakarta.
- George, E.F. dan Sherrington, P.D. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exergetic Limited. England. p. 39-71; 331-382.
- Gunawan, L.W., 1988. *Teknik Kultur Jaringan* . Lab. Kultur Jaringan Tanaman Depdikbud Dirjen Dikti, PAU Bioteknologi, IPB Bogor.
- Hadipoenyanti,E. D. Seswita dan N. Ajijjah. 2001. Multiplikasi Tunas Panili Hasil Regenerasi Kalus Secara *In Vitro*. Dalam Prosiding Kongres IV dan Simposium Nasional PERIPI. Yogyakarta. Hal. 283-286.
- Suskendriyati, H. Solichatun dan Ahmad DW, 2004. Pertumbuhan dan produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* dengan Variasi Pemberian Sumber Karbon. *Bio Smart*, vol. 6. no. 1. April 2004.

- Kartha, K.K. 1981. *Meristem Culture and Cryopreservation Method and Application in : Plant Tissue Culture Method and Application in Agriculture*. T.A. Thorpe (ed). Academic Press, Inc, San Diego, California. Pp :181-209.
- Krikorian, A.D., K. Kelly dan D.L. Smith, 1987. *Hormones in Tissue Culture and Micropropagation in Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Davies, P.J. (Ed) M. Nijhoff Publ. Dordrecht, Boston, Lancaster. p : 593-613
- Mulyaningsih T dan A. Nikmatullah, 2008. *Kultur Jaringan Tanaman*, Fakultas Pertanian UNRAM
- Murashige, T. 1974. *Plant Propagation through Tissue Culture*. Annual Review. Plant Physiology 25 : 135-166.
- Oti R, Rosita SMDM, M. Rahardjo dan Taryono, 2005. *Budidaya Tanaman Kencur*, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatika, Bogor
- Priyono, 2000. *Perbanyakan Abaca (Musa textilis Nee) Melalui Kultur Mata Tunas Secara In vitro*. Pelita Perkebunan ( ) 129-133.
- Purseglove, J.W., E.G. Brown, G.L. Green dan S.R.J. Robins. 1988. *Species*. Vol.2. John Wiley and Sons Inc. New York. 813p.
- Rufledge, C.B dan G.C. Douglas, 1988. *Tips and Micropropagation of 12 Commercial Clones of Polar In-vitro*. *Physiol. Plant* 72 ; 367-373.
- Santoso, U. 1995. *Induksi Kalus Artemisia vulgaris L dari Sumber Eksplan yang Berbeda*. Pusbitan UMM. Malang.
- Santoso, U. Dan Fatimah N, 2004. *Kultur Jaringan Tanaman*. Ed. 2. UMM Press. Malang
- Satria, B. 1996. *Perbanyakan manggis (Garcinia mangostana L.) dengan menggunakan eksplan hipokotil pada kombinasi dosis arang aktif dengan komposisi konsentrasi BAP dan NAA secara in-vitro*. Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang. 105 hal.
- Seswita. D., Hadipoenyanti, E. dan N. Ajijah. 2001. *Multiplikasi Tunas Panili Hasil Regenerasi Kalus Secara In Vitro*. Dalam Prosiding Kongres IV dan Simposium Nasional PERIPI. Yogyakarta. Hal. 283-286.

- Shofiyani, A. dan A. Suyadi, 2003. Pemberian Variasi NAA & BAP Terhadap Pertumbuhan Kencur Secara In Vitro, AGRITECH. Vol.V no.2 , DES 2003. 50 – 56 h.
- Sisunandar dan Julia, D. 2000. *Perbanyakan Pisang Abaka (Musa textilis Nee.) cv. Tangongon secara In vitro*. Laporan Penelitian. FKIP Univ. Muhammadiyah Purwokerto.
- Stapper, R.E. and C.W. Heuser. 1986. *Rapid Multiplikation of Heuchera senguaina Engelm "Rosamundi" Propagation in vitro*. Hort. Sci. 21(4):1043-1044.
- Syamsuhidayat, SS dan Johny, R.H. 1991. Inventaris Tanaman Obat, Balai Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 616 p.
- Tisserat, B. 1987. *Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration in Plant Cell Culture a Practical Approach*. Dixon, R.A; I.R L(Ed.). Press Limited Oxford.
- Tombe, M. dan D. Sitepu. 1987. *Penyakit Panili di Indonesia*. Edisi Khusus Littro. III(92): 103-108.
- Udarno. L., dan E. Hadipoenyanti. 2001. *Perbanyakan Panili Hibrida Secara In Vitro*. Dalam Prosiding Kongres IV dan Simposium Nasional PERIPI. Yogyakarta. Hal. 283-286
- Zearr, J.B dan M.O. Mapes, 1985. *Action of Growth Regulator in Tissue in Tissue Culture in Forestry*. Bonga J.M. dan Durzan, D.J. (Ed), M Nijhoff & W. Junk Publ. The Hague, The Netherland, p :231-251

Tabel 3. Persentase eksplan yang terkontaminasi (%) dari berbagai sumber Kontaminan

Perlakuan	%Kontaminasi	Sumber Kontaminan (%)			
		Eksternal		Internal	
		Jamur	Bakteri	Jamur	Bakteri
D0B0	22,2	11,1			11,1
D0B1	33,3	22,1			11,1
D0B2	11,1				11,1
D0B3	22,2	11,1			11,1
D1B0	11,1	11,1			
D1B1	33,3	11,1		11,1	11,1
D1B2	11,1				11,1
D1B3	11,1				11,1
D2B0	22,2			11,1	11,1
D2B1	33,3	22,1			11,1
D2B2	11,1	11,1			
D2B3	22,2				22,2
D3B0	22,2				22,2
D3B1	44,4	11,1			33,3
D3B2	33,3	22,2			11,1
D3B3	22,2	11,1			11,1
D4B0	33,3	11,1			22,2
D4B1	11,1	11,1			
D4B2	11,1	11,1			
D4B3	22,2	22,2			
<b>Rerata</b>	<b>22,2</b>	<b>9,44</b>		<b>1,11</b>	<b>11,1</b>

Tabel 4. Persentase eksplan yang tidak terkontaminasi dan persentase eksplan yang tumbuh

Perlakuan	Persentase eksplan tidak terkontaminasi	Persentase eksplan tumbuh
D0B0	77,8	0
D0B1	66,7	0
D0B2	88,9	0
D0B3	77,8	0
D1B0	88,9	0
D1B1	66,7	0
D1B2	88,9	0
D1B3	88,9	0
D2B0	77,8	0
D2B1	66,7	0
D2B2	88,9	0
D2B3	77,8	0
D3B0	77,8	0
D3B1	55,6	0
D3B2	66,7	0
D3B3	77,8	0
D4B0	66,7	0
D4B1	88,9	0
D4B2	88,9	0
D4B3	77,8	0
<b>Rerata</b>	<b>77,8</b>	<b>0</b>