

# Penyimpanan *In Vitro* Tanaman Obat Daun Dewa melalui Pertumbuhan Minimal

Endang G. Lestari dan Ragapadmi Purnamaningsih

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

## ABSTRACT

***In Vitro* Preservation of Daun Dewa using the Minimum Growth Preservation Method.** Endang G. Lestari and R. Purnamaningsih. Daun dewa (*Gynura Procumbens*) is a medicinal crop commonly used to remedy cancer, diabetes, and dermatitis. It has a bright prospect for future used. Plant preservations through tissue culture is done to anticipate an urgent need. An experiment was carried out to *in vitro* preservation of Daun Dewa by the minimum growth and regeneration to examine viability of the culture after the preservation. Terminal shoots ( $\pm 1$  cm) were cultured on a  $\frac{1}{2}$  MS basic medium + paclobutrazol (0, 1, 2, 3, and 4 mg/l) or ABA (1, 2, and 5 mg/l). The trial was arranged in a, completely randomized with 10 replications. The results showed a three-month preservation of the culture on a medium containing ABA inhibited proliferation and expansion of the plant shoots. Increasing ABA concentrations up to 5 mg/l, according to the shoot-growth inhibition, resulted in the height of 0.6 cm. After three month preservation, the shoots were able to produce roots. After 12 month preservation, the optimum capacity of growth inhibition was shown on  $\frac{1}{2}$  MS medium + ABA (1, 3, and 5 mg/l). The application of paclobutrazol (1, 2, 3, and 4 mg/l) in the medium produced low multiplication level of shoots, the length of the shoots remains higher than those on  $\frac{1}{2}$  MS medium without paclobutrazol. Seven months after preservation, viability of the plants was still high when cultured on MS medium + 2 mg/l BA combined with paclobutrazol and ABA as previously given. In addition, the rooted culture could be directly acclimatized in the glasshouse. The lowest number of shoot and shortest shoot after 12 month preservation period was found on the medium containing 5 mg/l ABA and 4 mg/l paclobutrazol, this treatment produced two shoots of 4 cm long. The best medium for the explant regeneration after 7 month preservation was MS + 2 mg/l BA. The plant shoots produced roots directly after they were acclimatized in the glasshouse.

**Key words:** *In vitro* preservation; *Gynura procumbens*; minimum growth preservation method.

## PENDAHULUAN

Daun dewa [*Gynura procumbens* Lour. (Merr.)] merupakan tanaman obat yang mempunyai beberapa khasiat penting, sehingga berpotensi untuk dikembangkan. Kandungan tanaman ini antara lain minyak atsiri dan flavonoid (Siswoyo *et al.* 1994). Bagian tanaman yang biasa digunakan untuk bahan baku obat

adalah daun dan umbinya. Manfaat yang penting pada saat ini adalah sebagai obat antikanker, penurun panas, obat penyakit kulit, dan penurun kadar gula dalam darah (Rostiana *et al.* 1991). Tanaman ini dikenal pula dengan nama ngokilo (Jawa) dan beluntas cina (Sumatera).

Mengingat kegunaannya maka daun dewa termasuk dalam kategori tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan sehingga beberapa aspek penting seperti perbanyakan, budi daya, kandungan kimia serta uji farmakologi sampai penyimpanan perlu diteliti. Penyimpanan dan koleksi bahan tanaman di lapang sering mengalami kegagalan, karena gangguan hama dan penyakit, serta tekanan lingkungan lainnya. Di samping itu, risiko hilangnya genotipa tertentu karena deraan lingkungan menjadi tinggi. Bagi tanaman yang berumur pendek diperlukan upaya pembaharuan yang berulang kali sehingga memberikan dampak peningkatan tenaga dan biaya. Untuk mengatasi masalah tersebut kultur *in vitro* dapat digunakan sebagai teknologi pilihan. Dengan berkembangnya teknologi kultur *in vitro* maka teknologi tersebut dapat pula dimanfaatkan untuk menyimpan tumbuhan obat khususnya daun dewa.

Salah satu cara penyimpanan *in vitro* yang banyak digunakan adalah pertumbuhan minimal. Dengan cara tersebut biakan dapat disimpan untuk jangka menengah. Untuk mencapai tujuan tersebut umumnya digunakan senyawa penghambat pertumbuhan seperti paclobutrazol, cycocel, ancymidol, dan inhibitor asam absisat, serta komponen osmotik seperti sorbitol atau manitol (Whithers 1983; Lloyd dan Jackson 1986; Oka dan Niino 1997; Setia *et al.* 1995). Asam absisat merupakan senyawa kimia yang berperan dalam proses fisiologi dan berinteraksi dengan zat tumbuh lainnya, terutama GA (*giberellic acid*) yang biasanya berperan sebagai penghambat pertumbuhan biakan (Wattimena 1988). Selain itu, pertumbuhan minimal dapat pula menggunakan media dasar yang diencerkan antara  $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{4}$  dari formulasi dasar (Bapat dan Rao 1988). Dengan pengenceran media menjadi  $\frac{1}{4}$  atau  $\frac{1}{2}$ -nya menyebabkan berkurangnya unsur makro terutama  $\text{NH}_4^+$  dan  $\text{NO}_3^-$  sehingga N sebagai unsur yang penting untuk pertumbuhan menjadi berkurang.

Beberapa penelitian penyimpanan biakan dengan pertumbuhan minimal yang telah berhasil antara lain pada tumbuhan obat langka pule (*Rauvolfia serpentina*) dengan menggunakan zat penghambat tumbuh paclobutrazol dan ancymidol. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan media simpan terbaik untuk pule adalah media dasar Monier + ancymidol 1,0 mg/l (Purnamaningsih dan Lestari 1997).

Pada tumbuhan obat langka pulasari (*Alyxia ste-lata*) penggunaan media dasar MS  $\frac{1}{2}$  + paclobutrazol 5 mg/l dapat menghambat biakan sampai minggu ke-12 (Lestari *et al.* 1994). Pertumbuhan minimal untuk penyimpanan secara *in vitro* telah berhasil pula diterapkan pada biakan kentang, ubi kayu, ubi jalar, dan yam (Henshaw dan Ohara 1983).

Perbanyakkan daun dewa secara *in vitro* telah dilakukan, dengan menggunakan media dasar MS + BA 2 mg/l dapat dihasilkan tunas sebanyak 20,1 tunas/eksplan (Lestari dan Purnamaningsih 1994). Namun faktor multiplikasi tunasnya sangat tinggi sehingga dalam waktu 1 bulan biakan sudah memenuhi botol kultur. Keadaan tersebut memberikan dampak kebutuhan frekuensi subkultur yang sangat tinggi. Dengan demikian, untuk menyimpan populasi daun dewa perlu dilakukan percobaan penyimpanan untuk menghambat pertumbuhan tunas. Penyimpanan dengan pertumbuhan minimal dapat menghemat tenaga serta biaya karena dengan menghambat pertumbuhan biakan maka frekuensi pembaharuan dapat ditekan serendah mungkin. Bila diperlukan maka biakan dapat diperbanyak secara cepat. Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan media terbaik untuk penyimpanan daun dewa tanpa menurunkan daya tumbuh biakan setelah penyimpanan dan mengetahui daya regenerasi biakan yang disimpan pada media perbanyakkan.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Sel dan Jaringan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.

Penelitian terdiri dari 2 kegiatan yang berurutan, yaitu penyimpanan *in vitro* dan pengujian daya tumbuh dari biakan yang telah disimpan. Eksplan untuk percobaan penyimpanan berupa tunas terminal dari biakan *in vitro* berukuran  $\pm 1$  cm dengan daun sebanyak dua buah.

Media dasar yang digunakan adalah media dasar MS (Murashige dan Skoog), ke dalam media diberikan pula sukrosa 30 g/l dan vitamin grup B. Untuk menghambat pertumbuhan diberikan paclobutrazol atau asam absisat. Media dibuat padat dengan penambah-

an agar gelrite sebanyak 2,5 g/l, pH dibuat 5,6-5,8 dengan menambahkan NaOH atau HCl.

Botol yang sudah ditanami eksplan kemudian diletakkan dalam ruang kultur dan diberi penyinaran dengan intensitas cahaya sebesar 1000 lux selama 16 jam dalam sehari. Perlakuan yang diuji adalah media dasar  $\frac{1}{2}$  MS dan senyawa retardan paclobutrazol (0, 1, 2, 3, dan 4 mg/l) dan ABA (asam absisat) pada konsentrasi (0, 1, 3, dan 5 mg/l). Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 10 ulangan. Parameter yang diamati adalah jumlah dan panjang tunas, jumlah daun, dan keadaan visual biakan. Pengamatan dilakukan seminggu sekali.

Pengujian daya tumbuh setelah penyimpanan dilakukan pada biakan yang disimpan selama 7 bulan dengan media regenerasi MS + BA 2 mg/l. Di samping itu, sebagian dari planlet yang berakar langsung diaklimatisasi di rumah kaca

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penyimpanan Pertumbuhan Minimal

Analisis statistik terhadap jumlah tunas menunjukkan bahwa eksplan berupa tunas terminal yang ditanam pada media dengan ABA 1 dan 5 mg/l menghasilkan tunas paling sedikit, yaitu 1,3 dan 1,1 buah/eksplan, jumlah tunas ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan paclobutrazol 0 dan 4 mg/l dan ABA 3 mg/l (Tabel 1). Pemberian paclobutrazol (1-4 mg/l) belum dapat menghambat multiplikasi tunas seperti yang diharapkan, tunas paling sedikit sebesar 1,6 buah dihasilkan pada pemberian paclobutrazol 4 mg/l tidak berbeda nyata dengan kontrol. Kemungkinan kandungan sitokinin endogen di dalam jaringan tanaman cukup tinggi sehingga paclobutrazol yang diberikan belum cukup untuk menghambat aktivitas pembelahan sel.

Paclobutrazol yang diberikan sampai 4 mg/l tidak berhasil menghambat pertumbuhan ke arah pemanjangan seperti halnya pada multiplikasi tunas. Sedangkan pemberian ABA cenderung menghambat tinggi tunas, semakin tinggi konsentrasi ABA yang diberikan maka tunas yang dihasilkan semakin pendek, tinggi tunas yang dihasilkan pada pemberian ABA (1, 3, dan 5 mg/l) berturut-turut 1,35 cm; 0,8 cm; dan 0,6 cm (Tabel 1). Tunas paling pendek dihasilkan dari perlakuan MS  $\frac{1}{2}$  + ABA 5 mg/l yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan MS  $\frac{1}{2}$  + ABA (1 dan 3 mg/l) dan MS  $\frac{1}{2}$  + paclobutrazol 4 mg/l.

Untuk peubah jumlah daun pada biakan yang disimpan selama 3 bulan menunjukkan bahwa daun yang dihasilkan pada perlakuan paclobutrazol (1, 2, dan 3 mg/l) lebih banyak daripada pemberian ABA

kecuali pada paclobutrazol 4 mg/l. Jumlah daun paling sedikit diperoleh dari perlakuan ABA 3 dan 5 mg/l yang tidak berbeda nyata satu sama lain, yaitu 6,6 dan 6,1 (Tabel 1).

Masa simpan selama 3 bulan, umumnya biakan mampu membentuk akar. Akar paling banyak diperoleh dari kontrol, yaitu sebanyak 6,3/tunas sedang pada perlakuan paclobutrazol 1, 2, dan 3 mg/l akar yang dihasilkan sebanyak 3,8 berbeda nyata dengan paclobutrazol 4 mg/l. Pada percobaan ini pemakaian ABA menyebabkan penurunan kemampuan biakan membentuk akar. Akar yang dihasilkan hanya 0,1 buah pada media dengan penambahan ABA 1 dan 3 mg/l tidak berbeda nyata dengan perlakuan ABA 5 mg/l, yaitu 1 buah/tunas.

Pada masa simpan selama 12 bulan, biakan yang disimpan pada media dengan zat penghambat tumbuh paclobutrazol dan ABA tersebut tetap hidup dan tampak segar, sedangkan pada media kontrol sebagian besar daunnya sudah berubah warna menjadi kuning dan layu. Melihat respon biakan terhadap zat penghambat tumbuh ABA yang digunakan menunjukkan adanya penghambatan yang nyata. Pada penyimpanan selama 12 bulan, biakan tetap tumbuh tetapi sangat lambat. Reed (1989) menyatakan bahwa salah satu cara penyimpanan dalam kondisi suboptimal menggunakan zat penghambat tumbuh mempunyai banyak keuntungan antara lain biakan yang disimpan tetap hidup tetapi sangat lambat sehingga dapat menghemat tenaga kerja untuk subkultur dan menghemat biaya untuk pembuatan media. Dengan diperolehnya biakan yang pertumbuhannya sangat lambat maka tidak perlu melakukan subkultur sesegera mungkin.

Setelah disimpan selama 12 bulan, umumnya biakan tetap hidup dan segar. Pada perlakuan paclobutrazol, daun berwarna hijau tua, dan ukurannya lebih besar. Hasil yang sama didapatkan pada penelitian Husni *et al.* (1994) pada penyimpanan inggu dan penyimpanan pulasari oleh Lestari *et al.* (1994). Menurut Cathey *dalam* Mattjik *et al.* (1994) retardan merupakan

zat pengatur tumbuh yang telah dibuktikan dapat mempengaruhi ketegaran planlet dan menambah butir-butir klorofil. Berbeda dengan perlakuan ABA umumnya biakan mempunyai daun yang kecil dan warnanya lebih muda. Pemberian paclobutrazol menghasilkan daun dan batang lebih hijau karena zat penghambat tersebut dapat meningkatkan kandungan klorofil pada daun (Wang *et al.* 1986; Pinhero dan Fletcher 1996).

Zat penghambat tumbuh paclobutrazol merupakan senyawa organik sintetik yang mempunyai pengaruh fisiologis antara lain menghambat perpanjangan sel pada meristem subapikal, memperpendek ruas tanaman, mempertebal batang, dan memperpanjang masa simpan (Dicks 1979). Zat penghambat tersebut berperan dalam menurunkan metabolisme jaringan dan menghambat pertumbuhan vegetatif serta menghambat sintesis giberelin. Paclobutrazol berperan dalam menghambat urutan reaksi oksidasi dari ent kaurene menjadi asam ent kaurenoid dalam pembentukan giberelat (Wattimena 1988).

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa penyimpanan biakan daun dewa selama 12 bulan dalam media dengan penambahan paclobutrazol dapat menghambat pertumbuhan ke arah multiplikasi tunas daripada pertumbuhan kearah pemanjangan. Penghambatan pemanjangan sel akan efektif apabila konsentrasi zat penghambat tumbuh yang diberikan sudah tepat, pada penelitian ini paclobutrazol yang diberikan sebesar 4 mg/l ternyata kurang tinggi sehingga penghambatan yang dihasilkan tidak optimal. Pada pemberian paclobutrazol 4 mg/l menghasilkan tunas paling sedikit, yaitu 2 buah namun tinggi tunasnya tidak berbeda nyata dengan Paclo 1, 2, dan 3 mg/l. Hal yang sama terjadi pada penyimpanan pule pandak (*Rauvolfia serpentina*) yang dilakukan oleh Purnamaningsih dan Lestari (1997) pada percobaan tersebut tunas terpanjang 17,72 cm diperoleh pada perlakuan Monier ½ + paclobutrazol 1 mg/l. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Mattjik *et al.* (1994) pada jahe bahwa paclobutrazol

**Tabel 1.** Pertumbuhan biakan pada media dengan zat penghambat tumbuh paclobutrazol dan asam absisat, umur 3 bulan.

Perlakuan (mg/l)	Rataan jumlah tunas	Rataan tinggi tunas (cm)	Rataan jumlah daun/planlet	Rataan jumlah akar/planlet
Paclobutrazol 0	2 abc	9 bc	14 abc	6,3 a
1	3 ab	2,18 ab	19 ab	3,8 b
2	3,5 a	2,5 ab	22 a	3,6 b
3	2,0 abc	3,33 a	21 a	3,8 b
4	1,6 bc	1,35 bcd	9,8 bc	2,3 bc
ABA 1	1,3 c	1,35 bcd	9,3 bc	1,0 c
3	1,6 bc	0,8 cd	6,6 c	0,1 c
5	1,1 c	0,6 d	6,1 c	0,1 c

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji DMRT.

memberikan penghambatan yang nyata terhadap pertumbuhan kearah tinggi tunas, pada percobaan tersebut peningkatan konsentrasi paclobutrazol tunas yang dihasilkan semakin pendek.

Perbedaan respon dari masing-masing tanaman terhadap zat penghambat tumbuh yang diberikan tergantung dari kandungan sitokinin dan zat pengatur tumbuh seperti GA yang ada di dalam jaringan tanaman dan kondisi fisiologi jaringan. Dalam penelitian ini tunas yang dihasilkan pada perlakuan paclobutrazol 1-4 mg/l lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (Tabel 2). Pada media kontrol menghasilkan tunas dengan tinggi 9 cm sedangkan pada media dengan paclobutrazol 1-4 mg/l tunas yang dihasilkan 15-17 cm, hal ini membuktikan bahwa efek penghambatan pembelahan sel tergantung dari mekanisme fisiologi dan berhubungan dengan sinergisme zat penghambat dari luar dengan zat penghambat dan zat pengatur tumbuh yang ada di dalam jaringan tanaman. Untuk memberikan efek penghambatan yang optimal sebaiknya paclobutrazol yang diberikan di atas 5 mg/l.

Efek penghambatan dari paclobutrazol dan ABA terhadap biakan daun dewa ternyata berbeda. Penyimpanan biakan selama 12 bulan pada media dengan penambahan ABA 5 mg/l, menghasilkan tunas sebanyak 2 buah/eksplan berbeda nyata dengan perlakuan paclobutrazol 1-3 mg/l dan ABA 1 dan 3 mg/l (Tabel 2) walaupun tinggi tunas yang diperoleh tidak berbeda nyata dengan perlakuan ABA 1 dan 3 mg/l, yaitu 4 cm, namun penggunaan ABA 5 mg/l dianggap efektif untuk menghambat pertumbuhan biakan.

Keuntungan penyimpanan menggunakan pertumbuhan minimal menggunakan inhibitor ABA antara lain (1) multiplikasi tunas dapat dihambat, (2) tunas yang dihasilkan tidak tinggi, (3) biakan tidak mengalami penurunan kemampuan daya tumbuh setelah disimpan, (4) biakan yang disimpan dapat berakar sehingga dapat langsung diaklimatisasi tanpa subkultur pada media perakaran. Mengingat faktor multiplikasi

biakan daun dewa sangat tinggi walaupun dalam media tanpa zat pengatur tumbuh sehingga penggunaan ABA dan pengenceran media menjadi  $\frac{1}{2}$  untuk penyimpanan biakan dianggap efektif karena pemindahan pada media baru dapat diperjarang.

Dengan meminimalkan pertumbuhan tunas dan mengusahakan agar viabilitas biakan tidak menurun serta stabilitas genetik tetap terjaga maka perubahan genetik atau terjadinya variasi somaklonal dapat dihindarkan. Variasi somaklonal dapat terjadi apabila biakan disubkultur berulang-ulang dan penggunaan konsentrasi zat pengatur tumbuh terlalu tinggi.

### Pengujian Daya Tumbuh Biakan setelah Penyimpanan

Untuk menguji daya tumbuh biakan setelah penyimpanan maka dilakukan subkultur pada media untuk regenerasi, yaitu media dasar MS + BA 2 mg/l. Media regenerasi tersebut merupakan formulasi media terbaik untuk multiplikasi tunas tanaman daun dewa yang telah ditemukan oleh Lestari dan Purnamaningsih (1994).

Kemampuan regenerasi pada biakan yang telah disimpan selama 7 bulan ternyata tetap tinggi hal ini menunjukkan bahwa zat penghambat tumbuh yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan tunas tidak menurunkan daya tumbuh. Bahkan biakan yang berasal dari ABA yang merupakan inhibitor kuat dalam menekan pertumbuhan (Tabel 2), setelah ditumbuhkan kembali pada media untuk regenerasi, daya tumbuhnya tetap tinggi, pada media tersebut tunas yang dihasilkan sebanyak 25/eksplan, dihasilkan dari tunas yang disimpan menggunakan ABA 5 mg/l (Tabel 3).

Di samping dikulturkan pada media untuk regenerasi sebagian dari biakan yang berakar (planlet) langsung diaklimatisasi untuk mengetahui daya tumbuh tanaman pada media aklimatisasi. Hasil aklimatisasi menunjukkan tingkat keberhasilan yang tinggi, yaitu sebesar 100%. Dengan demikian biakan yang

**Tabel 2.** Pertumbuhan biakan pada media dengan pemberian paclobutrazol dan ABA, umur 12 bulan.

Perlakuan (mg/l)	Rataan jumlah tunas	Rataan tinggi tunas (cm)	Penampakan daun	
Kontrol	10,125 a	9,250 c	Daun hijau, ukuran sedang	
Paclobutrazol	1	4,250 b	17,125 a	Lebar, tebal, hijau tua
	2	4,125 b	15,375 b	Lebar, tebal, hijau tua
	3	4,125 b	15,375 b	Lebar, tebal, hijau tua
	4	2,250 c	15,375 b	Lebar, tebal, hijau tua
+ ABA	1	4,125 b	5,250 d	Kecil-kecil, hijau muda
	3	4,125 b	4,125 d	Kecil-kecil, hijau muda
	5	2,000 c	4,125 d	Kecil-kecil, hijau muda

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji DMRT.

**Tabel 3.** Pertumbuhan biakan pada media regenerasi MS + BA 2 mg/l, setelah biakan disimpan selama 7 bulan.

Asal biakan	Rataan jumlah tunas
Paclbutrazol	1 27,12 a
	2 20,87 d
	3 17,12 e
	4 23,12 cd
ABA	1 28,25 a
	3 22,12 d
	5 25,12 bc

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji DMRT.

mampu berakar selama masa simpan dapat langsung diaklimatisasi tanpa harus dipindah ke media perbanyak.

### KESIMPULAN

Pengenceran media dasar MS menjadi setengahnya dikombinasikan dengan paclbutrazol 4 mg/l belum dapat menghambat multiplikasi dan pemanjangan tunas yang optimal.

Media terbaik untuk penyimpanan biakan daun dewa adalah MS ½ + ABA 5 mg/l, biakan yang telah disimpan selama 7 bulan tetap mempunyai daya tumbuh yang tinggi setelah dikulturkan pada media regenerasi. Di samping itu, tunas yang berakar selama masa simpan dapat langsung diaklimatisasi di rumah kaca.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bapat, V.A and P.S. Rao. 1988.** Sandalwood plantlet from syntetic seeds. *Plant Cell Rep.* 7:434-436.
- Dick, J.W. 1979.** Modes of action of growth retardant. *In* Clifford, D.R. and J.R. Loenton (*Eds.*). Recent Development in the Use of Plant Growth Retardant. Proceeding of Symposium by the Society of Chemical Industry and British Plant Growth Regulator. London.
- Henshaw, G.G. and J.F. Ohara. 1983.** *In vitro* approach to the conservation and utilisation of global plant genetic resources. *In* Mantell, S.H. and H. Smith (*Eds.*). *Plant Biotechnology*. Cambridge University Press. London. p. 219-240.
- Husni, A., E.G. Lestari, dan I. Mariska. 1994.** Perbanyak klonal tanaman obat langka inggu melalui kultur jaringan. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II*. LIPI. Cibinong, 6-7 September 1994.
- Lestari, E.G., I. Mariska, dan Yelnititis. 1994.** Konservasi *in vitro* tanaman obat langka pulasari melalui cara pertumbuhan minimal. *Prosiding Simposium Penelitian Bahan Obat Alam*. Balitro. Bogor, 24-25 Nopember 1994.
- Lestari, E.G. dan R. Purnamaningsih. 1994.** Mikropropagasi daun dewa melalui kultur *in vitro*. *Prosiding Simposium Penelitian Bahan Obat Alam*. Balitro. Bogor, 24-25 Nopember 1994.
- Lloyd, B.F. and M. Jackson. 1986.** *Plant genetic resources. An Introduction to their Conservation and use*. Dep Plant Biology Univ. Birmingham. Edward Arnold. 146 p.
- Mattjik, N.A., E. Prasetyo, dan J. Wiroatmodjo. 1994.** Penggunaan retardan pada media kultur *in vitro* *Zingiber officinale* Rose. untuk memperoleh ketegaran plantlet. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II*. Cibinong, 6-7 September 1994.
- Oka, S. and T. Niino. 1997.** Long term storage of Pear (*Pyrus* spp.) shoot cultures *in vitro* by minimal growth method. *Japan Agricultural Research Quarterly* 31:1-7.
- Pinhero, R.G. and R.A. Fletcher. 1954.** Paclbutrazol and ancymidol protect corn seedling from high and low temperature stress. *Plant Growth Reg.* 15:44-33.
- Purnamaningsih, R. dan E.G. Lestari. 1997.** Penyimpanan dan regenerasi pule pandak melalui kultur *in vitro*. *Dalam* Konggres I dan Seminar PBPI Universitas Tujuh Belas Agustus Surabaya. 12-14 Maret 1997.
- Reed, S.M. 1989.** *In vitro* conservation of germplasm. *In* Stalker, H.T. and C. Chapman (*Eds.*). *Scientific Management of Germplasm: Characterization, Evaluation, and Enhancement*. IPBGR. Nort Caroline State Univ.
- Rostiana, O., M. Januwati, S.M. Rosita, dan D. Sitepu. 1991.** Konservasi tanaman obat. Makalah dalam Pertemuan Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia. Depkes. Jakarta 9 Januari 1991.
- Setia, R.C., G. Bathal, and N. Setia. 1995.** Influence of paclbutrazol on growth and yield of *Brassica carinata*. *Plant Growth Reg.* 16:121-127.
- Siswoyo, E.A.M. Zuhud, dan D. Sitepu. 1994.** Perkembangan dan program penelitian tumbuhan obat Indonesia. *Dalam* Zuhud, E.A.M. dan Haryanto (*Eds.*). *Pelestarian Pemanfaatan Keanekaragaman Tumbuhan Obat Hutan Tropis Indonesia*. Jurusan Konservasi Sumberdaya Hutan. Fak. Hutan IPB dan LATIN.
- Wang, C.Y., G.L. Steffens, and M. Fraust. 1986.** Effect of paclbutrazol on accumulation carbohydrates in aple wood. *Hort. Sci.* 21(6):1414-1421.
- Wattimena, G.A. 1988.** Zat pengatur tumbuh tanaman. PAU Institut Pertanian Bogor. 145 hlm.
- Withers, L.A. 1983.** Germplasm preservation throught tissue culture on overview. *In* Proceeding Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. International Rice Research Institute Philipines.