

## APLIKASI TEKNIK KULTUR JARINGAN PADA PERBANYAKAN TANAMAN JERUK NIPIS TANPA BIJI (*Citrus aurantifolia*)

[THE APPLICATION OF PLANT TISSUE CULTURE TECHNIQUE ON THE PROPAGATION OF  
SEEDLESS CITRUS (*Citrus aurantifolia*)]

Nyimas Myrna E.F., Zulkarnain dan Eliyanti<sup>1</sup>

### Abstract

This experiment was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory, Agricultural Faculty Unja, from September until December 1995. Three chemicals tested were Ca-hypochlorite, Na-hypochlorite and HgCl<sub>2</sub> which were applied in 4 concentration levels, ie. 0.1, 0.5, 1.0 and 5.0%, and combined with 3 periods of explant dipping, ie. 10, 20 and 30 minutes. In addition to this, the media composition tested were MS, MS½, WPM, B-5, LS and SH. The result indicated that Ca- and Na-hypochlorite were not effective to be used in the sterilisation of single-node citrus explants taken from *in vivo* culture. Furthermore, even though there was a number of healthy explants, the treatment of HgCl<sub>2</sub> concentration combined with dipping period showed a non-significant effect on the culture growth. In addition, there was also no significant effect resulted in six media composition tested.

Kata-kata kunci: kultur jaringan, jeruk nipis, *Citrus aurantifolia*

### Pendahuluan

'Teknik kultur jaringan' adalah teknik budidaya berbagai bagian tanaman, seperti organ, jaringan, sel, kelompok sel dan protoplas, yang dilakukan secara *in vitro*. Bagian-bagian tanaman tersebut, yang diistilahkan sebagai 'eksplan', dipisahkan dari lingkungan alamiahnya dan dibudidayakan pada medium buatan yang steril agar dapat beregenerasi dan berdiferensiasi menjadi tanaman lengkap (Street, 1973). Istilah yang lebih spesifik, 'per-banyakan mikro', ditujukan terhadap penggunaan teknik kultur jaringan dalam usaha perbanyakan tanaman secara massal di dalam wadah tembus cahaya yang aseptik (Hartmann, Kester dan Davis, 1990). Akan tetapi, di dalam prakteknya sering dijumpai bahwa kedua istilah ini digunakan secara timbal balik terhadap prosedur perbanyakan tanaman yang melibatkan kultur aseptik.

Penerapan teknik kultur jaringan pada tanaman hortikultura telah sejak lama menjadi kajian para ahli perbanyakan tanaman maupun bagian dari usaha komersial. Teknik ini telah terbukti berhasil diterapkan pada *Rosa* sp. (Barve *et al.*, 1984; Burger

*et al.*, 1990), *Bougainvillea* sp. (Steffen, Sachs dan Hackett, 1988), *Rhododendron* sp. (Blazich dan Acedo, 1988; Iapichino, Chen dan Fuchigami, 1991), *Mussaenda erythrophylla* (Panda, Debata dan Das, 1989), *Petunia hybrida* (Dash dan Singhsamant, 1990; Dimasi-Theriou, Economou dan Sfakiotakis, 1992) dan *Gardenia* (Berrios dan Economou, 1991).

Terhadap tanaman jeruk, teknik teknik ini juga telah berhasil diterapkan pada beberapa spesies, seperti *Citrus unshiu* (Kunitake, Kagami dan Mii, 1991), *C. junos* (Oh *et al.*, 1991; Song, Oh dan Park, 1991) dan *C. grandis* (Simoes *et al.*, 1993). Akan tetapi terhadap *C. aurantifolia* teknik ini belum banyak diterapkan, padahal aplikasi teknik kultur jaringan terhadap spesies ini sangat besar manfaatnya mengingat *C. aurantifolia* tidak menghasilkan biji. Tanaman ini umumnya diperbanyak secara vegetatif menggunakan setek batang. Namun perbanyakan menggunakan setek membuka peluang bagi tertularnya penyakit, terutama yang disebabkan oleh virus, dari generasi ke generasi. Di samping itu perbanyakan tanaman melalui setek berjalan lambat karena terbatasnya jumlah bahan tanaman, sehingga jumlah propagula yang dihasilkan pun sangat

<sup>1</sup> Berturut-turut adalah Staf Pengajar pada Program Studi Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jambi.

terbatas. Untuk meng-atasi hal ini perlu dilakukan suatu penelitian guna mempelajari aplikasi teknik kultur jaringan pada perbanyak tanaman jeruk nipis tanpa biji ini.

Penelitian ini bertujuan untuk: 1) mencari metoda yang tepat untuk sterilisasi bahan eksplan jeruk nipis tanpa biji asal lapangan, 2) mencari komposisi medium dasar yang sesuai untuk pertumbuhan eksplan nodus tunggal jeruk nipis tanpa biji.

### Metode penelitian

#### Percobaan-1

Percobaan-1 adalah pengujian terhadap berbagai metoda sterilisasi eksplan. Bahan tanaman yang digunakan adalah eksplan pucuk yang diambil dari lapangan. Untuk memperkecil tingkat kontaminasi, maka tanaman induk terlebih dahulu dipelihara dan diperlakukan dengan 0,5g/L Benlate seminggu sekali selama 2 bulan.

Bahan sterilisasi yang diuji adalah Na-hipoklorit, Ca-hipoklorit dan HgCl<sub>2</sub> dengan tingkat konsentrasi masing-masing 0,1, 0,5, 1,0 dan 5,0% dan lama waktu perendaman 10, 20 dan 30 menit.

Bahan eksplan yang digunakan pada percobaan ini adalah potongan nodus tunggal yang diambil dari pucuk-pucuk muda. Pucuk dengan 2-3 tunas aksilar yang masih dalam keadaan dorman diambil dari tanaman induk, kemudian direndam dan dikocok selama 10 menit di dalam larutan 2 tetes Tween-20<sup>®</sup> per 100mL air steril. Lalu dibilas dengan air steril sampai tidak ada lagi sisa-sisa deterjen pada permukaan pucuk tersebut. Selanjutnya pucuk tadi direndam di dalam tiga macam larutan bahan sterilisasi yang telah disiapkan untuk masing-masing konsentrasi, selama 10, 20 dan 30 menit. Kemudian dibilas dengan air steril sampai bersih.

Di dalam *laminar air flow cabinet*, eksplan dipotong kira-kira 1cm dengan nodus berada di bagian tengah, lalu dikeringkan pada kertas saring steril sebelum ditanamkan pada medium yang sudah disiapkan.

Untuk melihat perkembangan kultur, eksplan yang sudah ditanamkan tadi ditempatkan di dalam ruang kultur pada suhu 25-26°C dan fotoperiodesitas 16 jam/hari selama 30 hari.

Parameter-parameter yang diamati adalah: 1) persentase eksplan yang tidak mengalami

kontaminasi dan tidak mati (sehat) dan 2) lamanya gejala kontaminasi mulai nampak (dalam hari).

#### Percobaan-2

Percobaan-2 adalah pengujian terhadap berbagai komposisi medium dasar. Bahan tanaman yang digunakan adalah sama seperti pada Percobaan-1.

Komposisi media dasar yang dicobakan adalah MS dan MS½ (Murashige dan Skoog, 1962), Woody Plant Medium (Lloyd dan McCown, 1980), B-5 (Gamborg *et al.*, 1968), LS (Linsmaier and Skoog, 1965), dan SH (Schenk and Hildebrandt, 1972). Masing-masing perlakuan diulang 10 kali.

Bahan eksplan yang digunakan pada Percobaan-2 sama seperti pada Percobaan-1, yakni potongan nodus tunggal yang berasal dari pucuk muda.

Untuk membersihkan bahan eksplan dari kontaminasi jamur dan bakteri, dilakukan prosedur sterilisasi terbaik yang diperoleh pada Percobaan-1.

Di dalam *laminar air flow cabinet*, eksplan dipotong kira-kira 1cm dengan nodus berada di bagian tengah. Setelah dikeringkan pada sehelai kertas saring steril, eksplan tersebut ditanamkan pada 6 media dasar yang akan diuji.

Penempatan unit-unit percobaan pada percobaan-2 juga didasarkan atas Rancangan Acak Lengkap. Analisis keragaman terhadap semua parameter dilakukan dengan bantuan komputer dan dilakukan uji perbandingan berganda Duncan untuk melihat pengaruh antar perlakuan.

Perkembangan kultur diamati selama 90 hari dengan parameter jumlah eksplan yang membentuk kalus, sebagai manifestasi respon eksplan tersebut terhadap berbagai komposisi media.

### Hasil dan pembahasan

#### Hasil

Hasil pada Percobaan-1 memperlihatkan, bahwa Ca- dan Na-hipoklorit ternyata tidak efektif untuk sterilisasi eksplan jeruk nipis asal lapangan. Hal ini terlihat pada kondisi eksplan yang semuanya mengalami kontaminasi jamur dan mati. Sementara itu pada perlakuan HgCl<sub>2</sub> yang dikombinasikan dengan periode perendaman diperoleh hasil yang tidak berbeda nyata, sebagaimana disajikan pada Tabel 1 berikut ini.

Table 1. Pengaruh konsentrasi HgCl<sub>2</sub> pada beberapa periode perendaman terhadap persentase eksplan yang sehat

Metode sterilisasi	% Eksplan sehat
0,1% HgCl <sub>2</sub> + 30 menit perendaman	4,38 a
0,1% HgCl <sub>2</sub> + 10 menit perendaman	3,43 a
1,0% HgCl <sub>2</sub> + 20 menit perendaman	3,43 a
0,1% HgCl <sub>2</sub> + 20 menit perendaman	2,49 a
0,5% HgCl <sub>2</sub> + 20 menit perendaman	2,49 a
5,0% HgCl <sub>2</sub> + 10 menit perendaman	2,49 a
0,5% HgCl <sub>2</sub> + 30 menit perendaman	2,46 a
0,5% HgCl <sub>2</sub> + 10 menit perendaman	1,55 a
1,0% HgCl <sub>2</sub> + 10 menit perendaman	1,55 a
5,0% HgCl <sub>2</sub> + 20 menit perendaman	1,55 a
1,0% HgCl <sub>2</sub> + 30 menit perendaman	0,61 a
5,0% HgCl <sub>2</sub> + 30 menit perendaman	0,61 a

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada  $\alpha = 0,05$  uji Duncan.

Dari eksplan yang mengalami kontaminasi, baik pada perlakuan HgCl<sub>2</sub> maupun perlakuan Ca- dan Na-hipoklorit terungkap, bahwa lama periode sejak penanaman sampai mulai nampak gejala kontaminasi adalah berkisar antara 2 hingga 7 hari.

Sementara itu pada Percobaan-2 didapatkan, bahwa perlakuan komposisi media memperlihatkan respon pertumbuhan yang dicirikan oleh adanya proliferasi kalus pada permukaan luka eksplan. Akan tetapi respon pertumbuhan ini tidak berbeda nyata antar masing-masing komposisi media, sebagaimana disajikan pada Tabel 2.

Table 2. Pengaruh komposisi media dasar terhadap pertumbuhan eksplan

Komposisi media	Pembentukan kalus (%)
Full strength Murashige and Skoog (MS)	8,14 a
Linsmaier and Skoog (LS)	8,14 a
Half strength Murashige and Skoog (MS <sup>1/2</sup> )	7,20 a
Woody Plant Medium (WPM)	7,20 a
B-5 Medium	6,26 a
Schenk and Hildebrandt (SH)	6,26 a

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada  $\alpha = 0,05$  uji Duncan.

### Pembahasan

Percobaan-1 mengungkapkan, bahwa penggunaan Ca- dan Na-hipoklorit ternyata tidak efektif untuk

sterilisasi permukaan terhadap eksplan jeruk nipis asal kultur *in vivo*. Hal ini terlihat pada kondisi kultur yang semuanya mengalami kontaminasi, baik oleh cendawan maupun oleh bakteri, yang mulai terlihat pada umur 3 hari setelah penanaman. Sementara itu penggunaan HgCl<sub>2</sub> walaupun secara kuantitas memberikan hasil yang lebih baik dari pada Ca- dan Na-hipoklorit, namun antar perlakuan yang dicobakan tidak memperlihatkan adanya pengaruh yang nyata. Dari perhitungan secara tabulasi terlihat, bahwa kombinasi perlakuan HgCl<sub>2</sub> 0,1% + perendaman 30 menit memberikan persentase eksplan sehat tertinggi, yaitu rata-rata 4,38% (Tabel 1).

Adanya perbedaan pengaruh yang ditunjukkan oleh Ca- dan Na-hipoklorit serta HgCl<sub>2</sub> disebabkan oleh adanya resistensi mikroorganisme yang mengkontaminasi bahan tanaman terhadap bahan kimia yang diberikan. Percobaan ini mengungkapkan, bahwa mikroorganisme yang mengkontaminasi eksplan jeruk nipis resisten terhadap Ca- dan Na-hipoklorit, namun peka terhadap HgCl<sub>2</sub>. Di antara perlakuan HgCl<sub>2</sub> yang memberikan persentase eksplan sehat yang cukup baik adalah HgCl<sub>2</sub> 0,1% + perendaman 30 menit. Sementara itu Pierik (1987) mengemukakan, bahwa pada umumnya HgCl<sub>2</sub> digunakan pada konsentrasi 0,01 hingga 0,05% dengan waktu perendaman yang relatif singkat, yakni antara 2 hingga 12 menit. Walaupun demikian, tingkat konsentrasi dan lama waktu perendaman eksplan dapat bervariasi cukup luas, tergantung pada tingkat kontaminasi yang terjadi. Pada umumnya kontaminasi yang parah menghendaki konsentrasi bahan sterilisasi yang lebih pekat dan/atau waktu perendaman yang lebih lama dari pada kontaminasi yang kurang parah. Terlepas dari parah atau tidaknya tingkat kontaminasi, karena tidak mudah untuk mendeteksinya, Gunawan (1987) menganjurkan untuk menggunakan bahan sterilisasi dengan konsentrasi yang rendah dan periode perendaman yang lebih lama. Hal ini dimaksudkan agar pengaruh bahan tersebut dapat lebih efektif membunuh mikroorganisme tanpa mematikan sel-sel pada jaringan yang dikulturkan.

Pada percobaan-2, data yang diperoleh tidak memperlihatkan adanya perbedaan yang nyata pada perlakuan media dasar. Namun demikian, secara tabulasi didapatkan bahwa komposisi media dasar MS dan LS memberikan persentase pembentukan kalus tertinggi, yakni rata-rata 8,14%.

Dari hasil yang diperoleh pada Percobaan-2 ini terungkap, bahwa keenam komposisi media yang dicobakan, terutama MS dan LS, memiliki prospek yang baik untuk digunakan pada kultur jaringan jeruk nipis. Sebagai media buatan yang diformulasikan khusus untuk kultur *in vitro*, keenam media tersebut memiliki komposisi yang serupa, yaitu terdiri atas unsur-unsur hara makro dan mikro, air, gula dan sejumlah vitamin sebagai pelengkap. Perbedaannya adalah terletak pada jenis senyawa sumber ion-ion esensial yang mungkin tidak sama, serta konsentrasi dari ion-ion tersebut yang juga berbeda. Sebagai contoh, sumber N pada medium MS berupa  $\text{NO}_3$  dengan konsentrasi 39,4mM/L dan  $\text{NH}_4$  dengan konsentrasi 20,6mM/L, sedangkan sumber N pada medium SH berupa  $\text{NO}_3$  dengan konsentrasi 25,0mM/L dan  $\text{NH}_4$  dengan konsentrasi 2,5mM/L. Sementara itu sumber N pada medium B-5 berupa  $\text{NO}_3$  dengan konsentrasi 25,0mM/L dan  $\text{NH}_4$  dengan konsentrasi 2,0mM/L.

### Kesimpulan

1. Sterilisasi eksplan jeruk nipis tanpa biji asal lapangan lebih baik pada perlakuan  $\text{HgCl}_2$  dari pada Ca- ataupun Na-hipoklorit, di mana perlakuan  $\text{HgCl}_2$  pada konsentrasi 0,1% dengan lama perendaman 30 menit memberikan hasil yang cukup memuaskan.
2. Komposisi media dasar MS,  $\text{MS}\frac{1}{2}$ , WPM, B-5, LS dan SH dapat digunakan pada kultur jaringan jeruk nipis tanpa biji, di mana media MS dan LS memberikan hasil yang lebih baik dari pada empat media lainnya.

### Daftar pustaka

Abou El Dahab, A., G. Stino and O. El Shiaty. 1991. Surface sterilisation for different parts of the shoot tips of *Pritchardia* ornamental palms propagated *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 300:85-88.

Bach, A. 1988. Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of *Iris x hollandica*. *Bulletin of Polish Academy of Sciences, Biological Sciences*, 36:107-111.

Barve, D.M., R.S. Iyer, S. Kendurkar and A.F. Mascarenhas. 1984. An effective method for rapid propagation of some budded rose varieties. *Indian Journal of Horticulture*, 41:1-7.

Berrios, J.G. and A.S. Economou. 1991. Study of the efficiency of *Gardenia* shoot formation *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 300:51-57.

Bhojwani, S.S. 1980. *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. *Scientia Horticulturae*, 13:47-52.

Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. 1983. *Plant tissue culture: theory and practice*. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam.

Blazich, F.A. and J.R. Acedo. 1988. Micro-propagation of flame azalea. *Journal of Environmental Horticulture*, 6:45-47.

Bliss, C.I. 1967. *Statistics in biology: statistical methods for research in natural science*. McGraw-Hill Book Company, New York.

Burger, D.W., Liu, L., K.W. Zary and Lee, C.I. Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21:147-152.

Dash, S.N. and P.K. Singhsamant. 1990 Induction of plantlets and callus from shoot-tips of *Petunia hybrida* cultured *in vitro*. *Orissa Journal of Horticulture*, 18:65-69.

Devlin, R.M. and F.H. Witham. 1983. *Plant physiology* (4<sup>th</sup> edition). Wadsworth Publishing Company, Belmont, California.

Dimasi-Theriou, K., A.S. Economou and E.M. Sfakiotakis. 1992. Promotion of *Petunia (Petunia hybrida* L.) regeneration *in vitro* by ethylene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32:219-225.

Dixon, A.R. 1985. *Plant cell culture: a practical approach*. IRL Press Ltd., Oxford.

Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1985. *Experiments in plant tissue culture* (2<sup>nd</sup> edition). Cambridge University Press, New York.

Ebert, A. and H.F. Taylor. 1990. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

- concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 20:165-172.
- Gamborg, L.O. and J.P. Shyluk. 1981. Nutrition, media and characteristic of plant cell and tissue culture, pp. 21-44. *Dalam* Plant Tissue Culture: Method and Application in Agri-culture. Thorpe, A.T. (Ed.). Academic Press, Inc., New York.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Limited, England.
- Gunawan, W.L. 1987. Teknik kultur jaringan. Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester and F.T. Davis Jr. 1990. Plant propagation: principles and practices. Prentice-Hall International, Inc., Englewood Clifts, New Jersey.
- Iapichino, G., Chen, T.H.H. and L.H. Fuchigami. 1991. Adventitious shoot production from a Vireya hybrid of *Rhododendron*. *HortScience*, 26:94-596.
- Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Zeitschrift für Pflanzen-physiologie*, 96:135-141.
- Kartha, K.K. 1984. Cassava tissue culture, pp. 50-59. *Dalam* Proceedings FAO/NORWAY Symposium on Plant Tissue Culture, Technology and Utilisation. State Seed Testing Station, As, Norway, 3-4 July 1984.
- Kunitake, H., H. Kagami and M. Mii. 1991. Plant regeneration from protoplasts of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) via somatic embryogenesis *Japan Agricultural Research Quarterly*, 24: 287-291.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 18:100-127.
- Lloyd, G.B. and B. McCown. 1980. Commercially feasible propagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Combined Proceeding of International Plant Propagator Society, 30:421-427.
- Lozoya-Saldana, H., L.M. Oicata, M.M. Borbor-Ponce and J.H. Calderon-Diaz. 1993. Biotic contamination of *in vitro* coffee (*Coffea arabica* L.) collections. *Horticultural Abstract* (Abstract 8043).
- Microsoft Corporation. 1992. Microsoft Excel Version 4.0: User Guide 2. Microsoft Corporation, U.S.A.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Oh, S.D., Song, W.S., Kim, J.S. and Park, E.H. 1991. *In vitro* micropropagation of yooza (*Citrus junos* Sieb. et Tanaka). I. Plant regeneration from callus induced from shoot tips *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 32: 87-96.
- Ott, L. 1988. An introduction to statistical methods and data analysis. PWS-KENT Publishing Company, Boston.
- Panda, N., B.K. Debata and P. Das. 1989. *In vitro* regeneration of *Mussaenda erythrophylla* cvs. 'Queen Sirikit' and 'Rosea' from callus cultures. *Orissa Journal of Horticulture* 17:18-22.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ponchia, G. and M. Gardiman. 1993. The micropropagation and post-acclimation growth of *Prunus laurocerasus* L. cv. Otto Luyken; additional findings. *Advances in Horticultural Science*, 7:11-14.
- Quak, F. 1977. Meristem culture and virus free plants, pp. 598-615. *Dalam* Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue Organ Culture. J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (Eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1992. Plant physiology (4<sup>th</sup> edition). Wadsworth Publishing Company, Belmont, California.

- Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50:199-204.
- Simoes, M.O.M., E.A.M. da Silva, S.L. Teixeira and P.R. Cecon. 1993. Regeneration of adventitious buds of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck isolated from internodes at different development stages. *Horticultural Abstracts*, 63: 916.
- Song, W.S., Oh, S.D. and Park, E.H. 1991. *In vitro* propagation of yooza (*Citrus junos* Sieb. et Tanaka). II. Callus induction, somatic embryogenesis, and plant regeneration from shoot tip and immature ovule. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 32:206-215.
- Steffen, J.D., R.M. Sachs and W.P. Hackett. 1988. *Bougainvillea* inflorescence meristem development: comparative action of GA3 *in vivo* and *in vitro*. *American Journal of Botany*, 75:1225-1227.
- Street, H.E. 1973. *Plant tissue and cell culture*. Blackwell Science, Oxford, London.
- Taji, A.M., W.A. Dodd and R.R. Williams. 1993. *Plant tissue culture practice*. The University of New England Printery, Armidale.
- Vasil, I.K. and V. Vasil. 1991. Embryogenic callus, cell suspension and protoplast cultures of cereals, pp. B1-B16. *Dalam Plant Tissue Culture Manual*. Lindsey, K. (Ed.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Winata, L. 1987. Kultur jaringan dan perkembangannya di Jurusan Budi Daya Pertanian IPB. *Buletin Agronomi IPB*, 25:10-26.
- Zulkarnain. 1994. Trials on disinfection technique and medium composition on micropropagation of *Guichenotia macrantha* Turcz. *Report on Special Project* at Postgraduate Diploma Program, School of Agriculture and Forestry, Melbourne University, Australia. 26p.