

Uji berbagai konsentrasi ekstrak mahkota dewa dan meniran serta penambahan pupuk organik cair pada pertumbuhan tunas pegagan (*Centella asiatica*) secara in vitro

An examination of various concentrations of mahkota dewa, meniran extract, and liquid organic fertilizer in *Centella asiatica* shoot growth in vitro

VENI SISKAYANTI, RETNA BANDRIYATI ARNIPUTRI, PRASWANTO

Prodi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 4 Maret 2016. Revisi disetujui: 9 Juni 2016.

Abstract. Siskayanti V, Arniputri RB, Praswanto. 2016. An examination of various concentrations of mahkota dewa, meniran extract, and liquid organic fertilizer in *Centella asiatica* shoot growth in vitro. *Biofarmasi* 14: 47-55. *Centella* (*Centella asiatica* L) is a plant utilized in traditional medicine because it has many benefits, one of which is to fulfill the brain requirement. This research aimed to examine *Centella asiatica* shoot growth in vitro on the various media types. The concentrations of meniran, mahkota dewa, and liquid organic fertilizer used by tissue culture and filtering (2k design). This method could be screened for the primary media types, organic material types (*mahkota dewa* and *meniran* extract), and the expected concentrations (*meniran*, *mahkota dewa*, and liquid organic fertilizer). This research was taken place in the Plant Physiology and Biotechnology Laboratory of Agriculture Faculty of Sebelas Maret University from November 2010 to June 2011. This research used a 2k design with a RAL environment. Factor 1: Media type ($\frac{1}{2}$ MS and MS); Factor 2: Concentration of liquid organic fertilizer (2 mL/L and 20 mL/L); Factor 3: Concentration of *meniran* 5 mL/L and 25 mL/L; and Factor 4: Concentration of mahkota dewa (5 mL/L and 25 mL/L). Thus, there are $24 = 16$ treatment combinations, each of which is repeated three times. The variables observed are shoot emerging duration, shoot number, shoot height, and leaves a number. The data were analyzed descriptively. The research showed that basic media MS, that basic media MS, POC 20 mL/L, and *meniran* extract 5 mL/L provided the best explants growth of *Centella* through in vitro.

Keywords: *Centella asiatica*, RAL environment, basic media MS

PENDAHULUAN

Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.) merupakan salah satu tanaman yang dapat tumbuh dimana saja, seperti di kebun, sawah ataupun pinggiran jalan dan ternyata tanaman ini telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Secara empirik *C. asiatica* dapat menggantikan ginkgo biloba sebagai pemenuh kebutuhan otak hingga juga bisa menyembuhkan beberapa penyakit seperti disentri ataupun tuberculosius. Penemuan terbaru yaitu tanaman inipun juga mampu menghambat virus HIV yang dapat mempertahankan kekebalan tubuh si penderita.

Hal tersebut menarik perhatian industri farmasi maupun perusahaan jamu untuk dapat mengembangkan serta memanfaatkan *C. asiatica* tetapi saat ini, tanaman tersebut yang dikembangkan secara konvensional belum mampu memenuhi kebutuhan dalam skala besar. Kebutuhan *C. asiatica* yang harus dipenuhi pada sebuah perusahaan jamu tiap tahunnya adalah sebanyak 25 ton, tetapi saat ini, per tahun baru bisa terpenuhi 4 ton saja (Pusat Studi Biofarmaka-IPB Bogor 2010).

Kultur jaringan merupakan salah satu alternatif budidaya tanaman untuk menghasilkan tanaman dalam skala besar sebab dengan teknik ini, lingkungan tumbuh in

vitro terkendali sehingga tanaman yang ingin dikembangkan tidak harus bergantung musim dan bebas penyakit. Penambahan ekstrak tanaman atau sering disebut dengan penambahan bahan organik pada media tanam yang mengandung antibiotik mampu menekan pertumbuhan bakteri yang berkembang biak serta membantu pertumbuhan eksplan yang ditanam.

Komponen lain seperti senyawa nitrogen organik, berbagai asam organik, metabolit dan ekstrak tambahan tidak mutlak tetapi dapat menguntungkan ketahanan sel dan perbanyakan (Wetter et al. 1991). Pada tahun 1937, Robbins dan White (1937), melakukan percobaan kultur jaringan dengan menambahkan ekstrak ragi kedalam medium. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa ekstrak ragi dapat memperbaiki pertumbuhan akar. Penelitian lain juga menambahkan bahan organik pada kultur anggrek yang menggunakan penambahan air kelapa. Air kelapa juga mengandung zeatin dan ribozeatin (kelompok zat tumbuh sitokinin) yang mempunyai kemampuan dalam merangsang pembelahan dan diferensiasi sel, terutama dalam hal pembentukan pucuk tanaman dan pertumbuhan akar (Hess 1975 dalam Widiastoety et al. 1997).

Ekstrak tanaman meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dan mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) juga

merupakan bahan organik. Hal terpenting dalam penggunaan kedua tanaman tersebut karena keduanya mengandung alkaloid yang dapat menekan pertumbuhan bakteri maupun infeksi jamur dan diharapkan senyawa ini dapat dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman.

Pertumbuhan tanaman yang diawali dari pembentukan tunas dalam teknik kultur jaringan membutuhkan penambahan nutrisi. Nutrisi yang dibutuhkan tanaman, tentu saja yang dapat memacu pertumbuhan tanaman tersebut untuk kemunculan tunas dan juga yang mengandung unsur makro serta mikro, biasanya nutrisi dalam kultur jaringan didapat dari penambahan hormon dan zat pengatur tumbuh (ZPT). Namun ternyata penggunaan pupuk organik cair juga dapat menggantikan peran dari hormon maupun ZPT sebab pupuk organik cair telah mengandung unsur makro mikro maupun hormon.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis media dasar, jenis bahan organik (ekstrak mahkota dewa dan meniran), konsentrasi meniran, konsentrasi mahkota dewa, konsentrasi pupuk organik cair yang paling baik untuk perkembangan kultur tunas pegagan.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan bulan November 2010-Juni 2011 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Bahan dan alat

Bahan tanaman yang akan digunakan sebagai eksplan adalah bagian mata tunas tanaman pegagan. Bahan kimia yang akan digunakan dalam penelitian ini meliputi media *Murashige and Skoog* (MS), aquades, chrolox, fungisida, bakterisida, detergen, spirtus, dan alkohol 70 %. Selain itu juga menggunakan ekstrak tanaman antibiotik yaitu mahkota dewa dan meniran. Serta menggunakan pupuk organik cair untuk kebutuhan unsur hara bagi tanaman pegagan.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Botol kultur; *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC); Timbangan analitik; Plastik PP 0,4; pH meter; Autoklaf dan Thermoshaker.

Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan metode screening yaitu 2k dengan rancangan lingkungan RAL yang disusun secara faktorial dengan 4 faktor yang masing-masing mempunyai 2 taraf perlakuan, yaitu: (i) Faktor 1: Media dasar *Murashige and Skoog* (MS) = $\frac{1}{2}$ MS dan MS; (ii) Faktor 2: Konsentrasi pupuk organik cair = 2 mL/L dan 20 mL/L; (iii) Faktor 3: Konsentrasi meniran = 5 mL/L dan 25 mL/L; (iv) Faktor 4: Konsentrasi mahkota dewa = 5 mL/L dan 25 mL/L. Maka ada 24 = 16 kombinasi perlakuan yang masing-masing diulang sebanyak 3 kali (Tabel 1).

Tabel 1. Kombinasi perlakuan

		$\frac{1}{2}$ MS		MS	
		POC 2 mL/L	POC 20 mL/L	POC 2 mL/L	POC 20 mL/L
Meniran	5 mL/L	1	5	9	13
	25 mL/L	2	6	10	14
Mahkota dewa	5 mL/L	3	7	11	15
	25 mL/L	4	8	12	16

Cara kerja

Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok yaitu dengan menimbang bahan-bahan kimia, hara makro, maupun hara mikro sesuai komposisi media MS untuk dibuat larutan stok. Kemudian bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan aquades dan diaduk sampai homogen dengan *magnetic stirrer*, kemudian dimasukkan dalam botol yang diberi label pada tiap botolnya sesuai dengan perlakuan dan disimpan dalam lemari pendingin.

Pembuatan ekstrak

Ekstrak tanaman antibiotik menggunakan tanaman mahkota dewa dan meniran. Pengambilan tanaman dari lapang juga harus memperhatikan kualitas tanamannya, yaitu tanaman yang berwarna hijau segar, tidak terlalu banyak serangan hama. Kemudian tanaman dicuci bersih hingga tidak ada kotoran yang tertinggal. Setelah itu ditimbang sebanyak 80 g berat segar. Lalu tanaman tersebut direndam dengan menggunakan fungisida selama 10 menit dan dilanjutkan direndam pada detergen selama 5 menit. Setelah itu dibilas dengan air mengalir hingga bersih lalu dibilas pula dengan aquades steril. Setelah semua tanaman telah bersih, masing-masing tanaman baik meniran maupun biji mahkota dewa yang sudah ditimbang sebanyak 80 g, lalu di blender dengan menambahkan aquades sebanyak 200 mL. Setelah itu diambil ekstrakanya.

Pembuatan media tanam

Pembuatan media dengan mengambil dan menakar masing-masing larutan stok sesuai dengan perlakuan dan ukuran yang telah ditentukan serta menambahkan ekstrak dan pupuk organik cair sesuai perlakuan kemudian memasukkannya ke dalam labu takar. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan aquades sampai volume larutan mencapai 1 liter. Kemudian ditambahkan gula sebanyak 30 g. Larutan dimasukkan dalam beker glass dan diaduk serta dididihkan dengan menggunakan magnetik stirer dan hot plate.

Langkah selanjutnya yaitu pengukuran pH larutan. pH media diatur pada kisaran 5,6-5,8. Apabila pH terlalu rendah ditambahkan dengan NaOH dan bila pH terlalu tinggi ditambahkan dengan HCl. Setelah pH telah sesuai, kemudian larutan ditambahkan bahan pematat media yaitu agar-agar sebanyak 8 g. Setelah semua larutan terlarut, maka tahap selanjutnya adalah menuangkan larutan tersebut ke botol-botol kultur, kurang lebih 25 mL setiap botolnya.

Botol ditutup dengan plastik PP dan kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, pada tekanan 1,5 kg/cm³ selama 45 menit. Setelah selesai, botol diangkat dari autoklaf dan di tempatkan di ruang inkubasi supaya media menjadi padat. Apabila media telah memadat, maka penanaman eksplan dapat dilakukan.

Sterilisasi alat

Alat-alat yang harus disterilkan diantaranya adalah botol kultur, petridish, skalpel, dan pinset. Alat-alat tersebut dicuci sampai bersih dengan menggunakan sabun cuci kemudian dikeringkan. Setelah kering dibungkus dengan kertas koran (kecuali botol kultur) lalu dimasukkan ke dalam autoklaf pada tekanan 1,5 Psi (kg/cm²), pada suhu 121°C selama 45 menit.

Sterilisasi eksplan dan penanaman

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah mata tunas tanaman pegagan. Eksplan dicuci dengan deterjen sampai bersih dan dibilas dengan air mengalir, kemudian digojog dalam campuran larutan Agrept dan Dithane selama 12 jam dengan shaker dan dibilas dengan air mengalir. Lalu direndam dalam larutan detergen selama 5 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan aquades steril. Eksplan yang telah steril dibawa ke dalam LAFC dan disterilisasi dalam larutan clorox yang telah dicampur aquades dengan perbandingan 1:2 selama 5 menit dan dibilas aquades steril.

Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*) yang telah dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70 % dan ruang LAFC disemprotkan dengan alkohol 70 % dan ruang LAFC disemprotkan dengan alkohol 70 % dan ruang LAFC disemprotkan dengan alkohol 70 %. Kemudian eksplan dikeluarkan dari botol dengan menggunakan pinset panjang yang telah direndam dalam alkohol dan dibakar diatas lampu bunsen, eksplan siap ditanam dalam botol kultur dan kemudian ditutup kembali dengan plastik pp 0,4. Botol-botol yang telah selesai diberi label sesuai dengan perlakuan dan tanggal penanaman.

Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan untuk meminimalisasi risiko kontaminasi dengan cara menyemprotkan alkohol ke botol-botol kultur setiap 2 hari sekali serta mengeluarkan botol-botol kultur yang terkontaminasi dari ruang inkubasi.

Variabel pengamatan

Saat muncul tunas

Pengamatan munculnya tunas dilakukan setiap hari pada tiap–tiap botol kultur dengan menghitung berapa hari tunas sudah mulai muncul atau tumbuh.

Jumlah tunas yang Terbentuk

Pengamatan jumlah tunas dilakukan setiap hari pada tiap–tiap botol kultur dengan menghitung berapa jumlah tunas yang sudah muncul pada setiap botol.

Tinggi tunas

Tinggi diamati pada akhir pengamatan, dengan mengukur tinggi dari pangkal batang hingga ujung daun tertinggi.

Jumlah daun

Jumlah daun diamati pada akhir pengamatan, dilakukan dengan menghitung jumlah buku yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Saat Muncul tunas

Munculnya tunas merupakan faktor penting dalam budidaya secara in vitro untuk mengetahui perkembangan dan pertumbuhan eksplan. Tunas terbentuk dari hasil diferensiasi sel eksplan. Semakin cepat muncul tunas makasemakin cepat pula dihasilkan bahan untuk perbanyak tanaman. Pada dasarnya induksi tunas dipengaruhi oleh penggunaan zat pengatur tumbuh salah satunya adalah sitokinin (Wattimena 1991), namun pada penelitian ini tidak menggunakan zat pengatur tumbuh, melainkan menggunakan pupuk organik cair. Dan menggunakan penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa sebagai fitohormon yang berfungsi untuk pertahanan anti bakteri. Rata- rata saat muncul tunas eksplan pegagan tiap kombinasi perlakuan disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. menunjukkan bahwa rata-rata saat muncul tunas tercepat dari eksplan pegagan yaitu pada kombinasi No 1. yang merupakan kombinasi antara penggunaan media dasar ½ MS serta penambahan POC 2 mL/L dan ekstrak meniran 5 mL/L muncul pada 7,6 HST. Hal ini dapat terjadi karena diduga adanya penambahan pupuk organik cair sebanyak 2 mL/L, meskipun hanya menggunakan ½ MS sudah dapat memunculkan tunas pegagan. Pupuk organik cair juga mengandung hormon (zat pengatur tumbuh) seperti sitokinin, auksin dan giberelin yang dapat membantu pertumbuhan tanaman (Suskindriyati 2003).

Hal lain terjadi pada kombinasi no.12 yang mengalami kelambatan dalam memunculkan tunas yaitu 33 HST. Kombinasi perlakuan no.12 terdiri dari MS, POC 2 mL/L dan ekstrak mahkota dewa 25 mL/L. Hal ini diduga penambahan ekstrak mahkota dewa menghambat pertumbuhan tunas yang akan muncul. Menurut Sevon dan Candentey (2002) senyawa yang terkandung dalam mahkota dewa seperti alkaloid dan saponin dapat menghambat pembelahan sel. Pada Tabel 2. dapat dilihat bahwa untuk semua kombinasi perlakuan yang diberikan penambahan ekstrak mahkota dewa mengalami pertumbuhan yang lama hingga tidak tumbuh tunas sama sekali dibandingkan dengan yang menggunakan ekstrak meniran yaitu pada kombinasi no. 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 dan 16. Histogram pengaruh faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas Gambar 1.

Pada Gambar 1. dapat dilihat bahwa penambahan ekstrak meniran lebih banyak memunculkan tunas eksplan pegagan yaitu 54% dibandingkan ekstrak mahkota dewa yang hanya 12% seperti yang telah dipaparkan sebelumnya bahwa ternyata mahkota dewa memiliki senyawa yang dapat menghambat pembelahan sel yang menyebabkan pertumbuhan tunas juga terganggu. Sedangkan pada tanaman meniran terdapat senyawa filantin yang dapat membantu dalam pertumbuhan tunas (Putra 2010). Hal ini

berarti penambahan ekstrak meniran dapat memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan tunas eksplan pegagan.

Pada penelitian ini, kemunculan tunas tidak hanya berasal dari faktor penambahan bahan organik yaitu ekstrak meniran maupun mahkota dewa tetapi juga pengaruh dari media dasar dalam penanaman eksplan pegagan itu sendiri. Media dasar yang digunakan yaitu MS (Murashige and Skoog) dengan taraf $\frac{1}{2}$ MS serta MS. Media MS merupakan media dasar yang paling banyak digunakan, baik untuk tanaman herba maupun berkayu, selain itu juga modifikasi media MS juga banyak digunakan (Pierik 1987).

Pada Gambar 2 terlihat bahwa penggunaan media dasar dengan taraf MS lebih banyak dalam menghasilkan persentase keberhasilan tumbuh tunas eksplan pegagan dibandingkan dengan taraf $\frac{1}{2}$ MS yaitu nilai persentase untuk masing-masing taraf adalah MS sebesar 37% dan $\frac{1}{2}$ MS sebesar 29%. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan pegagan yang dikulturkan lebih responsif terhadap penggunaan media dasar dengan taraf MS meskipun dengan menggunakan $\frac{1}{2}$ MS pun juga ada beberapa eksplan pegagan yang dapat muncul tunas tetapi membutuhkan waktu yang lama.

Pertumbuhan kemunculan tunas yang relatif banyak dengan menggunakan media dasar dengan taraf MS ini, disebabkan adanya kandungan total ion yang tinggi pada media dasar MS, khususnya NH_4 . Amonium dapat meningkatkan biosintesis sitokinin alami yang berperan dalam menstimulasi pertunasan (Hyndman et al. 1982). Maka penggunaan media dasar MS cocok untuk digunakan dalam menumbuhkan eksplan pegagan secara kultur jaringan, meskipun menggunakan taraf $\frac{1}{2}$ MS pun juga bisa tumbuh dengan waktu yang cukup lama.

Penambahan pupuk organik cair pada penelitian ini juga dijadikan salah satu faktor dalam mengkulturkan eksplan pegagan. Pupuk organik cair selain dapat memperbaiki sifat fisik, kimia, dan biologi tanah, membantu meningkatkan produksi tanaman, meningkatkan kualitas produk tanaman, mengurangi penggunaan pupuk anorganik dan sebagai alternatif pengganti pupuk kandang (Indrakusuma 2000). Pada penelitian ini, penggunaan pupuk organik berfungsi sebagai pengganti penggunaan zat pengatur tumbuh seperti auksin, sitokinin maupun giberelin serta unsur hara makro dan mikro.

Nutrisi sangat penting bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman, tanpa air dan mineral tanaman tidak dapat hidup (Arniputri 1993). Pada Gambar 3 terlihat bahwa pemberian POC (pupuk organik cair) dengan konsentrasi 2 mL/L dapat memberikan nilai persentase keberhasilan tumbuh tunas yang lebih besar dari pada POC konsentrasi 20 mL/L yaitu sebesar 37% sedangkan POC konsentrasi 20 mL/L hanya mampu memunculkan tunas sebesar 28%. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian POC 2 mL/L telah mampu memunculkan tunas eksplan pegagan. Menurut Parman (2007), POC mengandung unsur N (Nitrogen) yang berperan sebagai penyusun protein sedangkan fosfor dan kalsium berperan dalam memacu pembelahan jaringan meristem dan merangsang pertumbuhan akar dan perkembangan daun.

Pada penelitian ini juga menggunakan penambahan bahan organik yaitu ekstrak mahkota dewa dan meniran dengan masing-masing faktor, menggunakan 2 taraf yaitu konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L. Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas disajikan dalam Gambar 4.

Dari Gambar 4 dapat terlihat bahwa penambahan bahan organik, baik yang menggunakan ekstrak meniran ataupun mahkota dewa, ternyata pada konsentrasi 5 mL/L sudah dapat memberikan kemunculan tunas eksplan pegagan dibanding konsentrasi 25 mL/L. Penambahan ekstrak meniran dengan konsentrasi 5 mL/L, memunculkan tunas lebih banyak yaitu 75% dibandingkan dengan yang konsentrasi 25 mL/L yang 33%. Begitu juga halnya dengan penambahan ekstrak mahkota dewa dengan konsentrasi 5 mL/L dapat memunculkan tunas lebih banyak yaitu 17% daripada konsentrasi 25 mL/L yang hanya memunculkan tunas sebanyak 8%. Hal ini diduga penambahan konsentrasi yang terlalu banyak dapat menghambat pertumbuhan dari eksplan pegagan itu sendiri, sehingga konsentrasi 5 mL/L dirasa lebih baik daripada konsentrasi sebesar 25 mL/L. Hal lain dalam penggunaan bahan organik memang harus disesuaikan dengan jenis eksplannya terlebih dahulu.

Pada Gambar 5 menunjukkan bahwa pada 19 HST kombinasi antara penggunaan media dasar $\frac{1}{2}$ MS serta penambahan POC 2 mL/L dan ekstrak meniran 5 mL/L muncul tunas ke dua. Kemunculan tunas eksplan pegagan secara kultur jaringan juga dipengaruhi oleh faktor eksplannya itu sendiri, maka sangat penting sekali dalam melakukan pemilihan eksplan yang baik dari lapang, sebelum dilakukan penanaman. Eksplan adalah bahan tanam yang kecil dan masih aktif untuk membelah. Maka dari itu dalam kultur jaringan tanaman pegagan, bagian yang digunakan sebagai eksplan yaitu tunas yang terbentuk karena pada bagian tersebut merupakan bagian yang masih aktif mengalami pembelahan sehingga memudahkan dalam terbentuknya tunas baru.

Jumlah tunas

Tunas adalah bagian dari tanaman yang tumbuh dalam rangka melangsungkan keturunan pada tanaman tersebut. Semakin banyak tunas yang terbentuk maka tahap multiplikasinya semakin tinggi maka dari itu jumlah tunas sangat penting dalam kultur jaringan tanaman. Pada variabel jumlah tunas ini, sangat terlihat perbedaannya pada penambahan pupuk organik cair (POC). Histogram faktor konsentrasi POC terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk disajikan dalam Gambar 6.

Pada Gambar 6 terlihat bahwa penambahan POC sebanyak 20 mL/L memberikan pengaruh terhadap banyaknya jumlah tunas yang terbentuk yaitu 0,94 dibandingkan POC 2 mL/L yaitu hanya 0,83. Hal ini diduga karena dalam pembuatan media penanaman, POC terakumulasi dengan media dasar MS itu sendiri, yang mana media MS itu sendiri mengandung banyak unsur sama halnya dengan POC yang mengakibatkan terjadi kompetisi unsur. Menurut Suryanti (2011) bahwa pengaplikasian POC secara konvensional hanya

membutuhkan 2 mL/L untuk jenis tanaman herbaceous, hal ini berarti apabila POC diaplikasikan secara kultur jaringan harus membutuhkan konsentrasi yang lebih banyak dibanding budidaya secara konvensional.

Pada Tabel 3 dapat dilihat pada kombinasi no 13, yang terdiri dari media dasar MS; POC 20 mL/L; meniran 5 mL/L dapat membentuk tunas paling banyak dari kombinasi lainnya yaitu dengan nilai rata-rata sebesar 2,5. Hal ini diduga, pada kombinasi ini merupakan kombinasi yang tepat dengan penambahan konsentrasi dari MS, ekstrak meniran 5 mL/L serta POC 20 mL/L. Diketahui bahwa, dalam teknik kultur jaringan perlu memperhatikan konsentrasi yang tepat sebab media dasar seperti MS, membutuhkan bahan organik atau zat pengatur tumbuh untuk merangsang pertumbuhan dari tunas suatu eksplan (Wattimena 1991). Sedangkan kombinasi no 9, yang juga terdiri dari media dasar MS; meniran 5 mL/L; dan POC 2 mL/L, jumlah tunas yang terbentuk yaitu 2. Diduga penambahan POC dengan konsentrasi yang berbeda, dapat dilihat pada Tabel 3, bahwa dengan penambahan POC 20 mL/L jumlah tunas yang terbentuk lebih banyak dihasilkan.

Dalam perbanyakan secara *in vitro* beberapa metode dapat ditempuh melalui perbanyakan tunas aksilar dan adventif, baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara tidak langsung, pembentukannya terjadi melalui tahap pembentukan kalus. Pada penelitian ini, muncul tunas tanpa diawali dengan pembentukan kalus terlebih dahulu. Dari Gambar 7 dapat terlihat perbedaan antara kombinasi no. 13 yang dapat membentuk tunas lebih banyak daripada kombinasi perlakuan no 9. Hal ini sesuai dengan pendapat Rao (1994) dan Poewowidodo (1992) yang mengatakan bahwa pupuk organik cair mengandung unsur kalium yang berperan penting dalam setiap proses metabolisme tanaman, yaitu dalam sintesis asam amino dan protein dari ion-ion ammonium serta berperan dalam memelihara tekanan turgor dengan baik sehingga memungkinkan lancarnya proses-proses metabolisme dan menjamin kesinambungan pemanjangan sel.

Jumlah tunas yang terbentuk juga dipengaruhi oleh adanya penambahan dari ekstrak meniran dan mahkota dewa yang juga dipengaruhi oleh konsentrasi penambahan dari kedua ekstrak tersebut. Histogram faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap jumlah tunas yang terbentuk disajikan pada Gambar 8.

Pada Gambar 8, terlihat bahwa penambahan ekstrak meniran lebih banyak menghasilkan terbentuknya tunas eksplan pegagan daripada ekstrak mahkota dewa. Nilai rata-ratanya adalah untuk ekstrak meniran yaitu 1,4 sedangkan ekstrak mahkota dewa hanya 0,37. Hal ini diduga ekstrak dari meniran bekerja secara optimal sehingga eksplan pegagan lebih responsif terhadap ekstrak tersebut. Hal ini berarti sesuai dengan Andini (2010) yang menyatakan bahwa tanaman meniran yang diekstrak akan bekerja secara optimal sebab mampu meningkatkan aktivitas sel yang membantu dalam pembelahan meristem sehingga meningkatkan pertumbuhan tanaman. Maka untuk membentuk jumlah tunas eksplan pegagan secara kultur jaringan, dapat menambahkan ekstrak meniran sesuai kebutuhan. Hal ini juga terjadi pada pemberian konsentrasi 5 mL/L ekstrak meniran yang meningkatkan hasil lebih

banyak daripada konsentrasi 25 mL/L. Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran disajikan pada Gambar 9.

Terlihat pada Gambar 9, bahwa meniran 5 mL/L lebih banyak membentuk tunas yaitu 1,79 sedangkan meniran 25 mL/L hanya 1. Hal ini diduga penggunaan konsentrasi ekstrak meniran yang terlalu banyak menghambat metabolisme dan proses fisiologis pada tumbuhan yang mengakibatkan jaringan meristem tidak dapat menyerap nutrisi yang diberikan dengan baik. Hal yang sama juga terjadi pada ekstrak mahkota dewa.

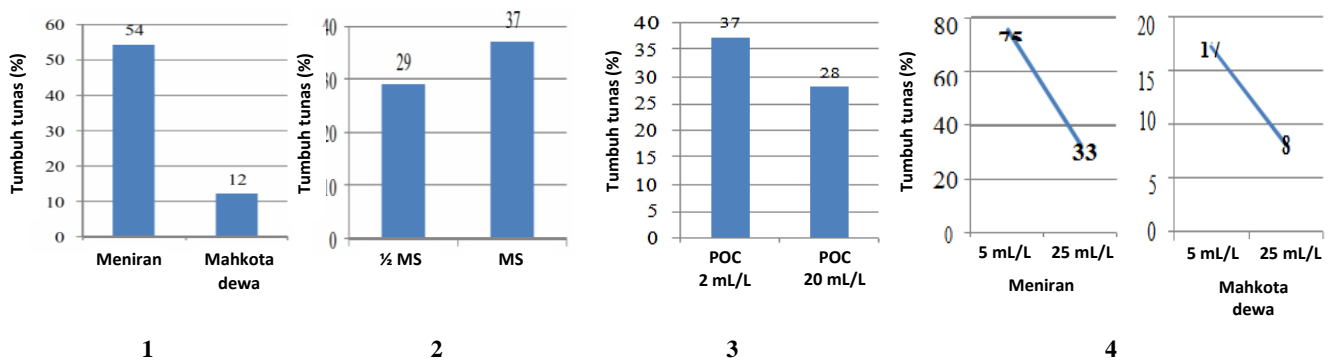
Pada Gambar 10. Konsentrasi 25 mL/L lebih sedikit membentuk tunas eksplan pegagan yaitu 0,25 sedangkan pada konsentrasi 5 mL/L lebih banyak yaitu 0,5. Sama halnya dengan ekstrak meniran, pada penambahan ekstrak mahkota dewapun, apabila penambahan ekstrak dengan konsentrasi yang terlalu banyak juga menghambat pertumbuhan tunas yang akan muncul.

Faktor media dasar juga memberikan pengaruh terhadap jumlah tunas yang terbentuk pada eksplan pegagan. Gambar 11, menunjukkan bahwa penggunaan media dasar MS lebih banyak membentuk tunas daripada $\frac{1}{2}$ MS dengan nilai rata-rata yaitu MS 1,1 dan $\frac{1}{2}$ MS 0,7. Yuniyati (2005) melaporkan bahwa media dasar $\frac{1}{2}$ MS lebih tepat untuk perkecambahan biji dan pertumbuhan protokorm anggrek *Dendrobium* hibrida. Sehingga untuk membentuk tunas pada tanaman herbaceous seperti pegagan membutuhkan konsentrasi penuh dari MS. Media MS mengandung unsur N yang banyak sehingga eksplan pegagan responsif dan dapat melakukan metabolisme dengan baik sehingga membentuk tunas anakan.

Tinggi tunas

Tinggi tunas merupakan variabel yang diamati pada akhir pengamatan, yaitu dengan mengukur tinggi tunas dari pangkal tunas yang muncul hingga tunas tertinggi. Semakin tinggi tunas merupakan salah satu keberhasilan dalam melakukan multiplikasi. Histogram faktor Media terhadap rata-rata tinggi tunas disajikan dalam Gambar 12.

Pada Gambar 12 terlihat bahwa, pemberian konsentrasi media dasar MS lebih besar menunjukkan nilai rata-rata daripada $\frac{1}{2}$ MS yaitu 1,25 cm untuk $\frac{1}{2}$ MS dan 1,75 cm untuk MS. Hal ini diduga karena pada penggunaan media MS dengan komposisi yang penuh memberikan pengaruh yang baik sehingga eksplan pegagan dapat responsif untuk melangsungkan metabolisme dan tunas dapat berkembang dengan tinggi. Seperti halnya dengan variabel saat muncul tunas serta jumlah tunas yang terbentuk, pemberian MS pun juga memberikan hasil yang lebih besar daripada $\frac{1}{2}$ MS. Media MS mengandung 40 mM N dalam bentuk NO_3 dan 29 mM N dalam bentuk NH_4^+ . Kandungan N ini, 15 kali lebih tinggi dari media tembakau Hildebrandt, dan 19 kali lebih tinggi dari media White. Kalium juga ditingkatkan sampai 20 mM, sedangkan P, 1,25 mM. Unsur makro lainnya konsentrasinya dinaikkan sedikit (Yuniyati 2005). Maka dengan penggunaan komposisi yang tepat pada media MS, dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman sehingga eksplan pegagan dapat tumbuh tinggi dengan maksimal.

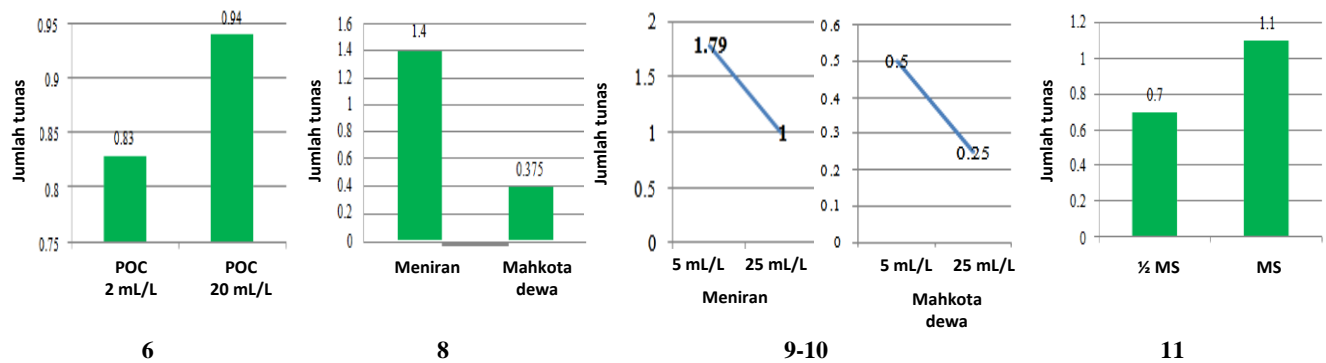


Gambar 1. Pengaruh faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkotadewa terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas (%)

Gambar 2. Pengaruh faktor media dasar terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas (%)

Gambar 3. Pengaruh faktor konsentrasi pupuk organik cair (POC) terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas (%)

Gambar 4. Pengaruh konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas (%) (a) Ekstrak meniran (b) Ekstrak mahkota dewa



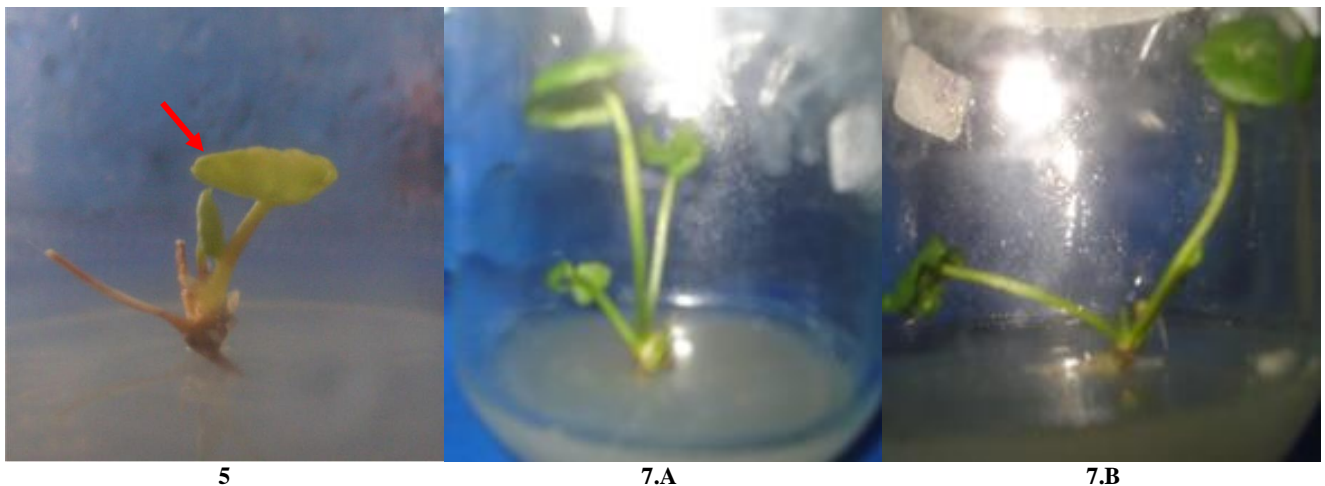
Gambar 6. Pengaruh faktor konsentrasi POC terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk

Gambar 8. Pengaruh faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk

Gambar 9. Pengaruh konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk

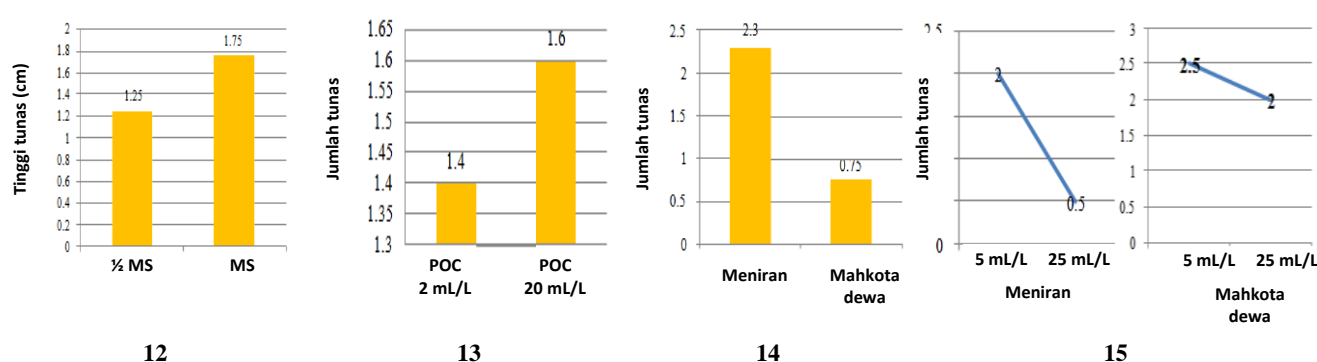
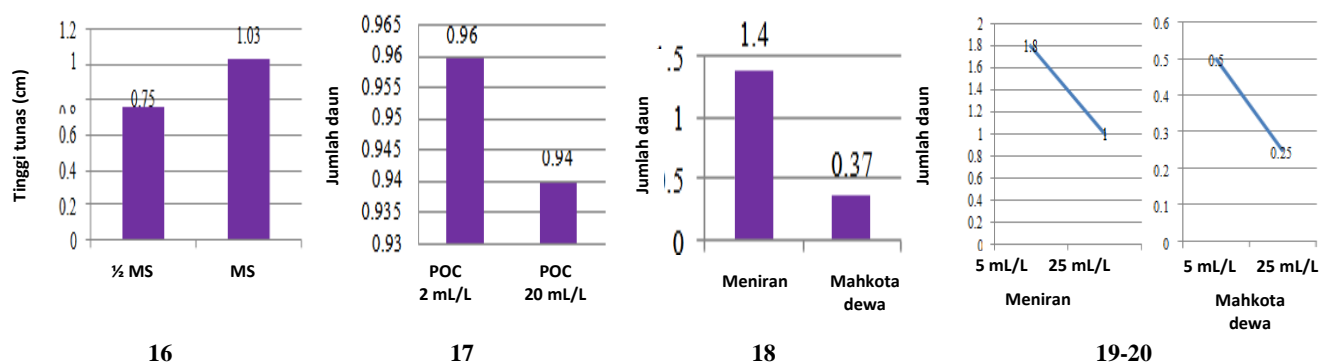
Gambar 10. Pengaruh konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak mahkota dewa terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk

Gambar 11. Pengaruh faktor media dasar terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk



Gambar 5. Tunas ke-2 kombinasi perlakuan No. 1, yang terbentuk pada 19 HST

Gambar 7. Tunas yang terbentuk pada 60 HST. A. Kombinasi perlakuan no. 13, B. Kombinasi perlakuan no. 9

**Gambar 12.** Pengaruh faktor media dasar terhadap rata-rata tinggi tunas (cm)**Gambar 13.** Pengaruh faktor konsentrasi POC terhadap rata-rata tinggi tunas**Gambar 14.** Pengaruh faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap tinggi tunas**Gambar 15.** Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/ ekstrak meniran terhadap rata-rata tinggi tunas**Gambar 16.** Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak mahkota dewa terhadap rata-rata tinggi tunas**Gambar 17.** Pengaruh faktor media terhadap rata-rata jumlah daun**Gambar 18.** Pengaruh faktor konsentrasi POC terhadap rata-rata jumlah daun**Gambar 19.** Pengaruh faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap rata-rata jumlah daun**Gambar 20.** Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap rata-rata jumlah daun**Tabel 2.** Rata-rata saat muncul tunas eksplan pegagan (HST) tiap kombinasi

Jenis bahan organik		$\frac{1}{2}$ MS		MS	
		POC	POC	POC	POC
		2 mL/L	20 mL/L	2 mL/L	20 mL/L
Meniran	5 mL/L	7,6	22	10,3	9
	25 mL/L	8	10	28	13
Mahkota dewa	5 mL/L	0	15	0	9
	25 mL/L	0	0	33	0

Keterangan: HST = hari setelah tanam

Tabel 4. Rata-rata tinggi tunas (cm) eksplan pegagan pada umur 60 HST tiap kombinasi perlakuan

Jenis bahan organik		$\frac{1}{2}$ MS		MS	
		POC	POC	POC	POC
		2 mL/L	20 mL/L	2 mL/L	20 mL/L
Meniran	5 mL/L	2	2	3	3
	25 mL/L	2	2	2	2
Mahkota dewa	5 mL/L	0	2	0	2
	25 mL/L	0	0	2	0

Tabel 3. Rata-rata jumlah tunas eksplan pegagan yang terbentuk tiap kombinasi perlakuan pada umur 60 HST

Jenis bahan organik		$\frac{1}{2}$ MS		MS	
		POC	POC	POC	POC
		2 mL/L	20 mL/L	2 mL/L	20 mL/L
Meniran	5 mL/L	1,66	1	2	2,5
	25 mL/L	1	1	1	1
Mahkota dewa	5 mL/L	0	1	0	1
	25 mL/L	0	0	1	0

Tabel 5. Rata-rata jumlah daun eksplan pegagan pada umur 60 HST tiap kombinasi perlakuan

Jenis bahan organik		$\frac{1}{2}$ MS		MS	
		POC	POC	POC	POC
		2 mL/L	20 mL/L	2 mL/L	20 mL/L
Meniran	5 mL/L	2	1	1,7	2,5
	25 mL/L	1	1	1	1
Mahkota dewa	5 mL/L	0	1	0	1
	25 mL/L	0	0	1	0

Penambahan konsentrasi POC 20 mL/L juga memberikan pertumbuhan tinggi yang maksimal dibandingkan dengan POC 2 mL/L. Histogram faktor konsentrasi POC terhadap rata-rata tinggi tunas disajikan dalam Gambar 13. Gambar 13, menunjukkan bahwa POC 20 mL/L memberikan nilai rata-rata tertinggi yaitu 1,6 cm daripada POC 2 mL/L hanya 1,4 cm. Hal ini diperkirakan bahwa pemberian pupuk organik cair dapat menyebabkan terdorongnya atau terpacunya sel diujung batang untuk segera mengadakan pembelahan dan pembesaran sel terutama didaerah meristematis. Hal ini sesuai dengan Suryanti (2011) yang menyatakan bahwa pemberian pupuk organik cair yang mengandung unsur N, P, K, Mg dan Ca akan menyebabkan terpacunya sintesis dan pembelahan dinding sel secara antiklinal sehingga akan mempercepat pertambahan tinggi tanaman.

Pada Gambar 14, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak meniran juga memberikan rata-rata tinggi tunas tertinggi daripada mahkota dewa yaitu sebesar 2,3cm dan nilai rata-rata ekstrak mahkota dewa yaitu 0,75cm. Penambahan ekstrak meniran juga didukung dengan konsentrasi 5 mL/L ekstrak meniran yang ditambahkan pada media penanaman. Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran terhadap rata-rata tinggi tunas disajikan dalam Gambar 15.

Pada Gambar 15, menunjukkan nilai rata-rata dari ekstrak meniran 5 mL/L dan 25 mL/L yang ditambahkan pada eksplan pegagan yaitu masing-masing 2,5cm dan 2 cm. Itu berarti dengan hanya menambahkan ekstrak meniran 5 mL/L saja, sudah dapat memberikan tinggi tanaman yang maksimal pada eksplan pegagan, diduga karena konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menjadi toksik terhadap tanaman, sehingga dapat menghambat pertumbuhan tanaman. Hal ini juga terjadi pada penambahan konsentrasi ekstrak mahkota dewa. Diketahui bahwa pada dasarnya tanaman mahkota dewa meskipun mengandung banyak senyawa yang bermanfaat bagi manusia yang dijadikan sebagai bahan obat tetapi juga bisa bersifat toksik bila salah cara pengolahan. Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak mahkota dewa terhadap rata-rata tinggi tunas disajikan pada Gambar 16.

Gambar 16 menunjukkan nilai rata-rata konsentrasi 5 mL/L ekstrak mahkota dewa lebih tinggi daripada konsentrasi 25 mL/L yaitu 2 cm dan 0,5 cm. Terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi yang ditambahkan maka akan menghambat pertumbuhan. Hal ini diduga karena dalam pembuatan ekstrak mahkota dewa, menggunakan bagian biji yang diketahui bahwa pada biji mahkota dewa terdapat senyawa yang toksik yang dapat membunuh bakteri, sehingga adanya senyawa tersebut juga menghambat pembelahan dinding sel sehingga tanaman tidak dapat tumbuh optimal.

Pada Tabel 4, menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan yang menunjukkan pertumbuhan dengan tinggi tanaman yaitu pada kombinasi no. 13 dan kombinasi no. 9. Kombinasi no. 13 terdiri dari MS; POC 20 mL/L; Meniran 5 mL/L sedangkan kombinasi no. 9 terdiri dari MS; POC 2 mL/L; Meniran 5 mL/L. Tinggi tunas pada kombinasi no. 13 dan 9 mencapai 3 cm. Hal ini diduga karena kombinasi tersebut, terdiri dari penambahan yang

komplementer dalam menunjang pertumbuhan tinggi tunas eksplan pegagan. Meskipun penambahan konsentrasi POC berbeda, ternyata pertumbuhan tinggi tanaman menunjukkan nilai yang sama pada 60 HST. Diketahui bahwa media MS dengan komposisi yang penuh, dapat merangsang eksplan pegagan, sehingga responsif dalam perpanjangan sel-sel dan ditambah pula tambahan nutrisi yang berasal dari POC.

Jumlah daun

Daun merupakan salah satu organ penting bagi tumbuhan yang tumbuh dari batang, umumnya berwarna hijau dan berfungsi sebagai penangkap energi dari cahaya matahari melalui fotosintesis. Fotosintesis yaitu proses pembentukan karbohidrat dari CO₂ dan H₂O dengan bantuan sinar matahari. Semakin banyak jumlah daun, mengindikasikan pertumbuhan eksplan yang semakin baik.

Pada Tabel 5, menunjukkan bahwa untuk variabel jumlah daun terbanyak ada pada kombinasi perlakuan no. 13 yaitu sebanyak 2,5. Campuran dari MS; POC 20 mL/L; dan Meniran 5 mL/L, mampu merangsang eksplan pegagan sehingga dapat melakukan pertumbuhan dengan baik. Jumlah daun yang terbentuk dipengaruhi oleh adanya penambahan POC serta meniran yang ditambahkan pada media tanam, sehingga mendukung dalam pembentukan perkembangan daun.

Gambar 17, menunjukkan bahwa pada penggunaan media MS lah yang mampu membentuk jumlah daun terbanyak. Rata-rata jumlah daun dari MS 1,03 dan ½ MS 0,75. Kebutuhan eksplan akan unsur hara sangat bergantung pada jenis tanaman yang digunakan, ketersediaan unsur hara dalam jumlah optimal selama masa pertumbuhan berdampak terhadap peningkatan laju pertumbuhan. Unsur hara terutama N dimanfaatkan oleh tanaman untuk membentuk asam amino yang akan diubah menjadi protein. Pada proses pembelahan sel, protein merupakan sumber energi untuk terjadinya proses meiosis dan mitosis (Yuniyati 2005). Hal tersebut diduga juga mempengaruhi eksplan pegagan sehingga pada penggunaan media MS penuh, jumlah daun lebih banyak dari pada yang ½ MS. Faktor lainnya dalam membantu pertumbuhan jumlah daun pada eksplan pegagan yaitu penggunaan POC.

Pada Gambar 18 terlihat bahwa POC 2 mL/L memberikan jumlah daun terbanyak sebanyak 0,96 dibandingkan POC 20 mL/L hanya 0,94. Pada dasarnya POC mengandung unsur hara yang diperlukan oleh tumbuhan salah satunya adalah unsur nitrogen. Unsur hara nitrogen dan unsur hara mikro tersebut berperan sebagai penyusun klorofil sehingga meningkatkan aktivitas fotosintesis tersebut akan menghasilkan fotosintat yang mengakibatkan perkembangan pada jaringan meristematis daun (Poewowidodo 1992). Hal ini tidak sesuai pada eksplan pegagan, meskipun pada konsentrasi 20 mL/L jumlah daun tetap muncul tetapi tidak sebanyak POC 2 mL/L, diduga karena terlalu banyak penggunaan konsentrasi unsur hara, kemungkinan akan bersifat toksik pada tumbuhan sehingga mengganggu aktivitas fotosintesis.

Selain itu pula, pada penelitian ini, nutrisi yang ditambahkan tidak hanya berasal dari POC saja melainkan juga berasal dari penambahan bahan organik yaitu ekstrak meniran dan mahkota dewa.

Pada Gambar 19 menunjukkan bahwa ekstrak meniran memberikan jumlah daun yang lebih banyak daripada ekstrak mahkota dewa yaitu sebanyak 1,4 dan ekstrak mahkota dewa 0,37. Hal ini diduga adanya senyawa dalam mahkota dewa yang menghambat pembentukan daun, sehingga eksplan pegagan tidak dapat merespon ekstrak mahkota dewa dengan baik. Sama halnya dengan variabel yang lain, pada jumlah daun penambahan ekstrak meniran dengan konsentrasi yang rendah, mampu membentuk daun lebih banyak. Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap rata-rata jumlah daun disajikan dalam Gambar 20.

Dari Gambar 20 terlihat bahwa penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa yang menggunakan konsentrasi yang rendah menunjukkan nilai rata-rata yang lebih besar dari pada konsentrasi yang tinggi yaitu untuk ekstrak meniran dan mahkota dewa konsentrasi 5 mL/L masing-masing bernilai 1,8 dan 0,5. Sedangkan untuk konsentrasi 25 mL/L penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa masing-masing, yaitu: 1 dan 0,25. Hal ini diduga penambahan konsentrasi yang terlalu tinggi, kemungkinan bersifat toksik terhadap beberapa eksplan pegagan sehingga seharusnya metabolisme dan proses fotosintesis yang akan membentuk fotosintat terhambat sehingga sel tumbuhan yang seharusnya membentuk jaringan dengan sempurna juga terhambat dan daunpun tidak terbentuk. Bahan organik dapat merangsang pertumbuhan tanaman secara signifikan apabila, menggunakan konsentrasi yang tepat sebab apabila konsentrasi berlebih bagi tanaman, maka akan menghambat metabolisme tanaman (Bowo 2010).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa penggunaan media dasar MS, penambahan pupuk organik cair 20 mL/L dan ekstrak meniran 5 mL/L dapat memberikan pertumbuhan yang paling baik dalam pengembangan kultur jaringan tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.)

DAFTAR PUSTAKA

- Andini AP. 2010. Pengaruh Pemberian Simunox Terhadap Kadar Interferon Gamma (IFN-) pada Mencit Swiss. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran UNDIP, Semarang.
- Arniputri RB. 1993. Studi Beberapa Jenis Substitusi Agar dan Pengaruhnya Terhadap Empat Jenis Tanaman Penguji dalam Kultur Jaringan. Program Pasca Sarjana IPB, Bogor.
- Bowo T. 2010. Pembentukan Tunas Lengkeng Dataran Rendah (*Dimorcarpus longan* Lour) pada Berbagai Konsentrasi BA dan Bahan Organik Secara In vitro. [Skripsi]. Fakultas Pertanian, UNS, Surakarta.
- Hyndman SL, Hasegawa PM, Bressand KA. 1982. Stimulation of root initiation from cultured rose through the use concentration of mineral salt. *Hort Sci* 17 (1): 82-83.
- Indrakusuma. 2000. Proposal Pupuk Organik Cair Supra Alam Lestari. PT Surya Pratama Alam, Yogyakarta.
- Parman S. 2007. Pengaruh Pemberian Pupuk Organik Cair Terhadap Pertumbuhan dan perkembangan. *Anatomi dan Fisiologi* 15 (2):-.
- Pierik RLM. 1987. In vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands.
- Poewowidodo. 1992. Telaah Kesuburan Tanah. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Pusat Studi Biofarmaka-IPB. 2010. Pasar Domestik dan Ekspor Produk Tanaman Obat. Biofarmaka, IPB, Bogor.
- Putra DP. 2010. Isolasi Senyawa Filantin dari Daun Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn). [Skripsi]. Fakultas Farmasi UMS, Surakarta.
- Rao S. 1994. Mikroorganisme dan Pertumbuhan Tanaman. Universitas Indonesia, Jakarta.
- Robbins WJ, White VB. 1937. Effect of Extracts from the corn plant on growth of excised root tips. *Bot Gaz* 98: 520-534.
- Sevon N, Candente KM. 2002. *Agrobacterium rhizogenes* Mediated transformation root culture as a source of alkaloid. *Planta Medica* 68: 859-950.
- Suryanti. 2011. Aplikasi POC. www.indofarm.com. Diakses 5 Juni 2011.
- Suskendriyati H, Solichatun, Setyawan AD. 2004. Pertumbuhan dan produksi saponin kultur kalus *Talinum paniculatum* Gaertn dengan variasi pemberian sumber karbon. *BioSmart* 6 (1): 19-23.
- Wattimenna G.A, Wiendi NMA, Gunawan LW. 1991. Zat Pengatur Tumbuh Bioteknologi Tanaman. PAU Biotek IPB, Bogor.
- Wetter LR, Constabel F. 1991. Metode Kultur Jaringan Tanaman. ITB Press, Bandung.
- Widiastoety D, Kusumo S, Syafni. 1997. Pengaruh tingkat ketuaan air kelapa dan jenis kelapa terhadap pertumbuhan plantlet anggrek *Dendrobium*. *J Hort* 7 (3):768-772.
- Yuniyati N. 2005. Pengaruh Konsentrasi Media MS dan NAA Terhadap Pengakaran *Alocasia suhirmaniana* Secara In vitro. [Skripsi]. Jurusan Budidaya Pertanian, FP, IPB, Bogor.