

ISBN 978-979-15649-6-0

# PROSIDING



**SIMPOSIUM DAN SEMINAR BERSAMA  
PERAGI-PERHORTI-PERIPHI-HIGI  
MENDUKUNG KEDAULATAN PANGAN DAN  
ENERGI YANG BERKELANJUTAN**

**IPB International Convention Center  
Bogor, 1-2 Mei 2012**

**DEPARTEMEN AGRONOMI DAN HORTIKULTURA  
FAKULTAS PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

Bekerjasama dengan:



## PROSIDING

Simposium dan Seminar Bersama  
PERAGI-PERHORTI-PERIPHI-HIGI  
Bogor, 1-2 Mei 2012

ISBN: 978-979-15649-6-0

Editor

Maya Melati

Sandra Arifin Aziz

Darda Efendi

Ni Made Armini

Sudarsono

Nita Ekana'ul

Syhabuddin Al Tapsi

Cover Desain : Shalati Febjislami

Layout : Nita Ekana'ul  
Syhabuddin Al Tapsi

Penerbit

Departemen Agronomi dan Hortikultura

Bekerja sama dengan:

Perhimpunan Agronomi Indonesia

Perhimpunan Hortikultura Indonesia

Perhimpunan Ilmu Pemuliaan Indonesia

Himpunan Ilmu Gulma Indonesia

Sekretariat

Departemen Agronomi dan Hortikultura

Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Jalan Meranti Kampus IPB Dramaga Bogor, 16680

Phone/fax: (0251) 8422-889/8629-353

## INDUKSI PROLIFERASI TUNAS IN VITRO *Mentha piperita* MELALUI PENAMBAHAN BAP DAN CHITOSAN

Alfia Annur Aini Azizi\*, Agus Purwito dan Ni Made Armini Wiendi

Department of Agronomy and Horticulture, Faculty of Agriculture, Bogor Agricultural University (IPB)  
Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

\* Corresponding author: alfia.azizi@gmail.com

### Abstract

The aims of the research was to study the effect of Chitosan and BAP on in vitro shoot proliferation of *Mentha piperita*. This research was conducted from March 2011 to November 2011 at Tissue Culture's Laboratory, Departement of Agronomy and Horticulture IPB, Bogor. The research was arrangement on completely randomized block design. This research consisted of two factors and three replications and each replication consisted 15 observation unit. The first factor is Chitosan with three levels of concentration of 0 mg/l, 10 mg/l, and 20 mg/l. The second factor is BAP with five levels of concentration of 0 mg/l, 0.5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, and 2 mg/l. Axilar shoots of *Mentha piperita* explant were cultured on MS medium contained Chitosan and BAP as treatment. The culture was incubated for eight weeks in culture room with temperature 25°C and light intensity 1000 lux. The result showed the treatment of Chitosan are significantly affected initial growth, number and length of shoot, number of node, root, and biomass. The treatments of BAP and its interaction with Chitosan are not significantly affected to all variable observed. Chitosan 0 mg/l and BAP 1.5 mg/l is the best treatment for initial growth, number of node, and root.

*Keywords: axilar shoot, biomass, tissue culture.*

### PENDAHULUAN

Menthol merupakan senyawa volatil yang memiliki aroma dan rasa khas sehingga sering dimanfaatkan sebagai pemberi aroma dan rasa dari produk-produk komersial seperti kosmetik, obat-obatan, pewangi, dan makanan. Kebutuhan industri dari produk yang dihasilkan oleh *Mentha* sp. ini sangat besar, akan tetapi sampai saat ini Indonesia belum mampu untuk memenuhi kebutuhan tersebut. Impor produk turunan dari *Mentha* sp. setiap tahun semakin meningkat, pada tahun 2006 nilai impor mencapai US \$ 3 780 000 setara dengan 34 milyar rupiah (BPS, 2007).

Secara konvensional, tanaman *Mentha* diperbanyak melalui stolonnya atau dengan setek pucuk dan batang yang panjangnya 5-8 cm. Cara ini akan mengurangi hasil terna yang dipanen. Selain itu perbanyakan vegetatif yang terus-menerus akan mengakumulasi penyakit sistemik terutama virus. Salah satu cara untuk memenuhi kebutuhan bibit yang banyak dan bebas penyakit dengan waktu yang cepat tanpa mengurangi hasil panen serta tidak membutuhkan areal tanam yang luas ialah memanfaatkan teknologi kultur jaringan.

*Benzylaminopurin* (BAP) paling banyak digunakan untuk memacu pembentukan tunas karena BAP termasuk sitokinin yang dapat mendorong pembelahan sel-sel meristematik (George and Sherington, 1984). Sitokinin BAP untuk mendorong pembentukan tunas dan mengurangi dominansi apikal (Pierik, 1987). Chitosan adalah senyawa yang memiliki banyak manfaat dan salah satunya menstimulasi pertumbuhan tunas *Dendrobium* secara *in vitro* (Nge et al, 2006). Chitosan mampu menjadi elisitor dalam metabolit sekunder dalam kultur jaringan (Bohlmann and Eilert, 1994).

Tujuan penelitian untuk mempelajari pengaruh zat pengatur tumbuh tanaman BAP dan konsentrasi Chitosan terhadap proliferasi tunas *Mentha piperita* secara *in vitro* yang nantinya dapat dipergunakan sebagai bibit.

### BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret 2011 hingga bulan November 2011 di Laboratorium Kultur Jaringan, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor. Alat yang digunakan

adalah autoklaf, pH meter, labu erlenmeyer, gelas ukur, botol kultur, neraca digital, *magnetic stirrer*, pipet, pinset, gunting, dan cawan petri. Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah pucuk *Mentha piperita* yang didapat dari petani di daerah Cipanas. Bahan lain yang digunakan adalah aquades, media Murashige-Skoog (MS), Chitosan, BAP, larutan sterilan dengan bahan aktif sodium hipoklorit 5.25%, dan alkohol.

Penelitian disusun dalam rancangan lingkungan kelompok lengkap teracak faktorial dengan 2 faktor. Kelompoknya adalah ulangan yang dikelompokkan berdasarkan hari. Faktor pertama ialah konsentrasi senyawa chitosan dengan tiga taraf konsentrasi yaitu 0, 10 dan 20 mg/l. Faktor kedua yaitu BAP dengan lima taraf konsentrasi yaitu 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 dan 2.0 mg/l. Masing-masing perlakuan diulang 3 kali dan setiap ulangan terdiri dari 15 eksplan sebagai satuan amatan sehingga terdapat 675 satuan amatan dalam penelitian ini. Pengolahan data menggunakan uji F dengan program aplikasi SAS (*Statistical Analysis System*). Faktor yang berpengaruh nyata dilakukan uji nilai tengah menggunakan DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf 5% (Mattjik dan Sumertajaya, 2006).

Pucuk *Mentha piperita* diambil dari lapang dicuci bersih dengan air mengalir kemudian direndam dalam larutan bakterisida (Agrept) dan fungisida (Dithane M-45) yang masing-masing konsentrasinya 4 g/l selama 3 jam dengan alat *shaker*. Setelah direndam bakterisida dan fungisida, pucuk *Mentha piperita* dibilas air steril dua kali lalu direndam sambil dikocok dalam sodium hipoklorit 30% (v/v) selama 30 menit. Selanjutnya bilas sekali lalu direndam dan dikocok dalam sodium hipoklorit 10% (v/v) selama 10 menit. Pucuk yang telah disterilisasi langsung ditanam pada media MS0 untuk pra kondisi sebelum disubkultur ke media perlakuan.

Planlet pada media MS tanpa zat pengatur tumbuh disubkultur ke media perlakuan. Eksplan yang digunakan berupa buku tunggal dan bagian pucuk tidak digunakan sebagai eksplan. Setiap eksplan terdiri atas satu buku yang memiliki sepasang mata tunas. Masing-masing botol kultur ditanami tiga eksplan kemudian kultur disimpan dalam ruangan dengan suhu 25°C dan cahaya 1000 lux selama delapan minggu.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Jumlah Tunas *Mentha piperitain Vitro*

Setiap eksplan *Mentha piperita* menghasilkan tunas antara 1-6 tunas aksilar. Sidik ragam terhadap jumlah tunas per eksplan *Mentha piperita* menunjukkan Chitosan memiliki pengaruh yang nyata pada 1 sampai 8 minggu setelah tanam. BAP memiliki pengaruh yang nyata pada 2 dan 8 minggu setelah tanam sedangkan interaksi Chitosan dan BAP tidak memiliki pengaruh yang nyata selama pengamatan. Rata-rata jumlah tunas per eksplan *M. piperita* diberikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah tunas per eksplan *Mentha piperita* pada media MS dengan penambahan Chitosan dan BAP saat 8 MST.

Perlakuan	Konsentrasi (mg/l)	Rata-rata jumlah tunas per eksplan
BAP	0.0	2.22ab
	0.5	2.26ab
	1.0	2.16b
	1.5	2.10b
	2.0	2.39a
KK (%)		8.75
Chitosan	0.0	2.48a
	10.0	2.20b
	20.0	2.00c
KK (%)		8.75

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada baris atau kolom rataan yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji DMRT taraf 5%, KK = koefisien keragaman

Jumlah tunas terbanyak yaitu 2.48 dihasilkan pada media MS tanpa Chitosan. Rata-rata tunas aksilar yang dihasilkan *Mentha piperita* secara *in vitro* adalah 2 tunas namun beberapa mata tunas menghasilkan lebih dari 2 tunas aksilar. Berikut persentasi jumlah eksplan yang menghasilkan tunas lebih dari 2 di masing-masing perlakuan.

Persentase eksplan yang membentuk tunas lebih dari 2 di media perlakuan tanpa Chitosan lebih tinggi dibandingkan persentase eksplan pada media dengan Chitosan 10 mg/l dan 20 mg/l (Tabel 2). Konsentrasi Chitosan yang tinggi memberikan pengaruh yang tidak diharapkan dalam proliferasi tunas *Mentha piperita* karena menghasilkan jumlah tunas per eksplan lebih sedikit.

Tabel 2. Persentase eksplan membentuk tunas aksilar lebih dari 2 saat 8 MST.

BAP(mg/l)	Chitosan(mg/l)			Rataan
	0	10	20	
	-----%-----			
0.0	40.0	13.3	0.0	17.77
0.5	31.1	20.0	6.7	19.27
1.0	26.7	15.6	0.0	14.10
1.5	17.8	6.7	0.0	8.17
2.0	53.3	28.9	4.4	28.87
Rataan	33.78	16.90	2.22	

### Jumlah Buku Aktif per Planlet *Mentha piperitain Vitro*

Chitosan memiliki pengaruh negatif yang nyata pada 2-8 minggu setelah tanam sedangkan BAP memiliki pengaruh yang nyata saat 2 dan 7 minggu setelah tanam terhadap jumlah buku aktif per planlet *M. piperita*. Interaksi antara Chitosan dengan BAP berpengaruh nyata terhadap jumlah buku aktif per planlet *Mentha piperita* saat minggu kelima dan keenam setelah tanam.

Pengaruh Chitosan terhadap eksplan *Mentha piperita* menunjukkan semakin tinggi konsentrasi Chitosan, jumlah buku aktif per planlet yang dihasilkan semakin sedikit. Media MS tanpa Chitosan dengan penambahan 1.5 mg/l BAP menghasilkan jumlah buku *Mentha piperita* terbanyak saat 5 MST dengan rata-rata 13.16 buku aktif per planlet. Perlakuan yang sama juga menghasilkan jumlah buku aktif terbanyak saat 6 MST. Jumlah buku aktif per planlet *Mentha piperita* pada interaksi Chitosan dan BAP saat 6 MST ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Jumlah buku *Mentha piperita* pada media MS dengan penambahan Chitosan dan BAP Saat 6 MST

BAP (mg/l)	Chitosan (mg/l)		
	0	10	20
0.0	11.58bcde	11.57bcde	10.47cde
0.5	11.06cde	11.42bcde	11.07cde
1.0	13.72ab	12.13bcd	10.78cde
1.5	15.63a	12.30bc	9.25e
2.0	13.69ab	12.17bc	9.80ed
KK (%)	10.23		

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada baris atau kolom rata-rata yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji DMRT taraf 5%; KK = koefisien keragaman

Media MS dengan penambahan BAP 1.5 mg/l tanpa Chitosan menghasilkan jumlah buku terbanyak dengan rata-rata 15.63 buku aktif per planlet pada 6 MST. Jumlah buku aktif penting dalam perbanyakan tanaman kultur jaringan karena buku merupakan sumber eksplan tunas aksilar. Semakin banyak jumlah buku yang dihasilkan semakin banyak jumlah tunas aksilar untuk perbanyakan bibit *Mentha piperita*.

### Tinggi Tunas *Mentha piperita in Vitro*

Chitosan berpengaruh sangat nyata sedangkan perlakuan BAP hanya berpengaruh sangat nyata saat minggu keempat setelah tanam terhadap tinggi tunas *Mentha piperita* secara *in vitro*. Interaksi Chitosan dan BAP tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap tinggi tunas *Mentha piperita*.

Konsentrasi Chitosan yang semakin tinggi pada media sampai 20 mg/l menyebabkan rata-rata tinggi tunas *Mentha piperita* semakin pendek (Tabel 4). Pengaruh ini tidak diharapkan dalam proliferasi tunas *Mentha piperita* karena makin pendek tunas maka makin sedikit jumlah buku yang dapat disubkultur untuk dijadikan sumber eksplan. Berdasarkan hasil analisis terhadap data tinggi dan jumlah buku *Mentha piperita*, didapatkan korelasi yang sangat nyata dengan nilai Korelasi Pearson sebesar 0.84.

Tabel 4. Tinggi planlet *Mentha piperita* pada media MS dengan penambahan Chitosan saat 8 MST

Chitosan (mg/l)			KK (%)
0	10	20	
----- Tinggi planlet (cm) -----			
11.67a	9.36b	6.76c	25.27

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada baris rata-rata yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji DMRT taraf 5%, KK = koefisien keragaman.

#### Akar *Mentha piperita* in Vitro

Pengamatan peubah akar menggunakan skor 0-4. Chitosan memiliki pengaruh yang sangat nyata terhadap pertumbuhan akar *Mentha piperita* secara *in vitro*, sedangkan BAP tidak memiliki pengaruh yang nyata. Interaksi Chitosan dan BAP hanya berpengaruh nyata terhadap akar *Mentha piperita* saat 8 minggu setelah tanam.

Interaksi Chitosan dan BAP terhadap pertumbuhan akar *Mentha piperita* yang menghasilkan skor akar tertinggi saat 8 MST yaitu media MS tanpa Chitosan dan penambahan 1.5 mg/l BAP dengan skor 3.72 (Tabel 5). Artinya eksplan yang dikulturkan pada komposisi media MS ditambah 1.5 mg/l BAP memiliki akar yang jumlahnya lebih dari sama dengan 20 dan panjangnya lebih dari 2 cm.

Tabel 5. Pertumbuhan akar *Mentha piperita* pada media MS dengan penambahan Chitosan dan BAP saat 8 MST

BAP(mg/l)	Chitosan(mg/l)		
	0	10	20
0.0	3.27a	2.40b	1.33c
0.5	3.60a	2.25b	1.27c
1.0	3.60a	2.53b	1.15c
1.5	3.72a	2.00b	1.17c
2.0	3.33a	3.30a	1.20c
KK(%)	13.27		

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada baris atau kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji DMRT taraf 5%, KK = koefisien keragaman. Skor 0= Eksplan tidak berakar, skor 1= Eksplan yang memiliki akar < 10, skor 2= Eksplan yang memiliki akar  $\geq 10$  dan <20, skor 3= Eksplan yang memiliki akar  $\geq 10$  dan <20, serta panjangnya  $\geq 2$  cm, skor 4= Eksplan yang memiliki akar  $\geq 20$ .

Akar merupakan organ tanaman yang berfungsi menyerap unsur hara yang dibutuhkan tanaman untuk tumbuh dan berkembang. Terhambatnya pertumbuhan akar pada media perlakuan dengan Chitosan menyebabkan jumlah tunas, jumlah buku, dan tinggi tunas planlet *Mentha piperita* ikut terhambat. Selain itu, akar yang pendek dan jumlahnya yang sedikit dapat menyebabkan tanaman sulit bertahan saat aklimatisasi.

Terdapat dua mekanisme yang diduga menghambat pertumbuhan akar planlet *M. piperita*. Mekanisme pertama, Chitosan merupakan polimer kationik yang dapat berikatan dengan unsur anion (Aranaz, 2009). Unsur fosfor (P) yang merangsang pertumbuhan akar diserap oleh akar dalam bentuk  $H_2PO_4^-$  (Madjid, 2007), tetapi karena ada Chitosan dalam media perlakuan planlet *M. piperita* sehingga terjadi persaingan antara akar dengan Chitosan dalam mengikat unsur P. Kekurangan fosfor menyebabkan pertumbuhan akar planlet terhambat dan menyebabkan penyerapan hara oleh akar juga terhambat.

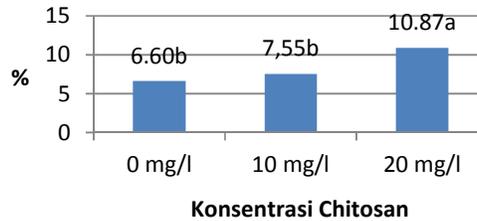
Mekanisme kedua, Chitosan diduga terlibat dalam mengatur biosintesis fenolik (Collinge *et al*, 1993; van Loon *et al*, 1994) yang berfungsi melindungi tanaman dari mikroorganisme namun jika berlebihan akan menjadi toksik bagi tanaman. Fenolik pada media tanam menghambat pertumbuhan akar sehingga akar tidak menyerap hara dengan optimal.

#### Persentase Bobot Kering Planlet *Mentha piperita*

Chitosan merupakan biopolimer sakarida yang dihasilkan dari proses deasetilasi kitin (Hadwiger, 2006). Polisakarida yang dikandung chitosan diduga dapat meningkatkan biomassa pada planlet *Mentha piperita*. Menurut hasil sidik ragam, Chitosan memiliki pengaruh sangat nyata dan BAP tidak berpengaruh nyata terhadap persentase bobot kering planlet *Mentha piperita*. Interaksi Chitosan dan BAP juga tidak memiliki pengaruh yang nyata terhadap persentase bobot kering planlet *Mentha piperita*.

Persentase bobot kering terbesar yaitu 10.87% terdapat pada perlakuan media dengan konsentrasi Chitosan 20 mg/l. Berdasarkan hasil uji nilai tengah, persentase bobot kering pada perlakuan Chitosan 20

mg/l berbeda sangat nyata dari perlakuan Chitosan 0 dan 10 mg/l (Gambar 1). Hal ini menunjukkan Chitosan dapat meningkatkan biomassa dari bobot planlet *Mentha piperita* segar. Chitosan meningkatkan aktifitas enzim yang memproduksi prekursor metabolit sekunder, termasuk lignin (Uthairatanakij *et al.*, 2007). Hal ini yang diduga meningkatkan persentase biomassa planlet *M. piperita* yang dikulturkan pada media MS dengan penambahan Chitosan.

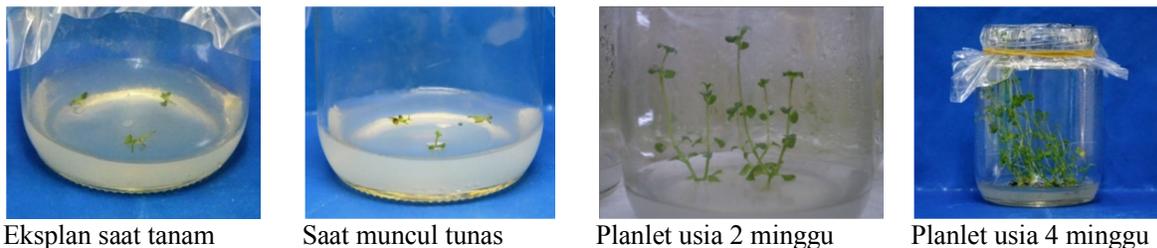


Gambar 1. Persentase Bobot Kering Planlet *Mentha piperita* pada Media Perlakuan Chitosan; Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji DMRT taraf 5%.

Konsentrasi Chitosan menunjukkan pengaruh yang negatif terhadap peubah pengamatan waktu muncul tunas, tinggi tunas, jumlah tunas per eksplan, jumlah buku per eksplan, dan pertumbuhan akar *Mentha piperita*. Namun memberikan pengaruh yang positif terhadap biomassa *Mentha piperita*. Menurut Wiendi *et al* (1992), secara umum pembentukan tunas secara *in vitro* baik melalui morfogenesis langsung ataupun tidak langsung sangat tergantung pada jenis dan konsentrasi yang tepat dari senyawa organik, inorganik, dan zat pengatur tumbuh (ZPT). Pitta-Alvarez *et al.* (2000), menyatakan tidak semua tanaman kultur merespon elisitor, dan beberapa elisitor menginduksi rute metabolisme yang berbeda dari target yang diinginkan.

#### Penyediaan Bibit *Mentha piperita* dari Kultur jaringan

Salah satu tujuan kultur jaringan ialah penyediaan bibit yang banyak dalam waktu singkat. Berdasarkan hasil penelitian, planlet *M. piperita* sudah dapat disubkultur saat usia empat minggu. Sumber eksplan berupa buku aktif tunggal *M. piperita*. Data jumlah buku aktif *M. piperita* saat usia empat minggu yang ditanam pada media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh rata-rata adalah 9 buku per eksplan. Bibit *Mentha piperita* yang dihasilkan dari 1 eksplan yang dikulturkan pada media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dan disubkultur setiap bulan selama 1 tahun akan menghasilkan 3 145 079 530 planlet dengan asumsi kematian eksplan hanya 9.8%. Pertumbuhan planlet *Mentha piperita* secara *in vitro* ditampilkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pertumbuhan Planlet *M. Piperita* secara In Vitro

Planlet *Mentha piperita* yang telah berumur 2 bulan dan berakar dapat diaklimatisasi menggunakan media aklimatisasi berupa pupuk kandang dan tanah dengan perbandingan 1:1 (Balitro, 1987). Tanaman muda *Mentha piperita* yang diaklimatisasi disungkup selama 15 sampai 30 hari untuk mempertahankan kelembaban. Setelah itu sungkup dilepas dan *M. piperita* mini dipindahkan ke nurseri. Saat di nurseri, bibit induk *M. piperita* yang telah dipelihara menghasilkan banyak stolon. Stolon tersebut dipotong 2-3 ruas untuk dijadikan bibit setek pertama. Bibit setek pertama ditanam dan dipelihara di nurseri untuk mendapatkan stolon yang lebih banyak. Bibit setek kedua, setek stolon dari bibit setek pertama, akan menjadi bibit *M. piperita* yang disebar atau ditanam di lapang.

## KESIMPULAN

Chitosan memberikan pengaruh yang nyata pada terhadap jumlah tunas, jumlah buku, tinggi tunas, akar, dan persentase bobot kering planlet *Mentha piperita*. Konsentrasi Chitosan yang terlalu tinggi memberikan pengaruh negatif terhadap jumlah tunas, jumlah buku, tinggi tunas, dan akar planlet *M. piperita*. BAP hanya memberikan pengaruh yang nyata terhadap waktu muncul tunas *Mentha piperita* secara *in vitro*. Interaksi Chitosan dan BAP memberikan pengaruh interaksi nyata terhadap jumlah buku per eksplan saat 5 dan 6 MST, serta pertumbuhan akar saat 8 MST. Perlakuan terbaik untuk waktu muncul tunas, jumlah buku, dan pertumbuhan akar planlet *Mentha piperita* adalah media dasar MS tanpa Chitosan dengan penambahan 1.5 mg/l BAP. Namun perlakuan ini tidak berbeda nyata dengan media MS tanpa penambahan BAP dan Chitosan (MS0).

## DAFTAR PUSTAKA

- Aranaz, I. 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. Spain. *Current Chemical Biology*, 2009, 3, 203-230.
- Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. 1987. Laporan Perbanyakan Tanaman Mentha Melalui Kultur Jaringan. Departemen Pertanian. Bogor.
- Bohlmann, J. and U. Eilert. 1994. Elicitor induced secondary metabolism in *ruta graveolens* L. role of chorismate utilizing enzymes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38, 189-198.
- BPS. 2001 – 2007. Statistik Impor tahun 2000 – 2006.
- Collinge, D.B., K.M. Kragh, J.D. Mikkelsen, K.K. Nielsen., U. Rasmussen and K. Vad.1993. Plant chitinase. *Plant Journal* 3: 31-40.
- George, E.F and P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. London: Eastern Press. 709 p.
- Hadwiger, L.A. and P.O. McBride. 2006. Low-level copper plus chitosan applications provide protection against late blight of potato. *Plant Health Progress* April.
- Madjid, A. 2007. Mekanisme Penyerapan Hara. Bahan Kuliah Online Fakultas Pertanian. Universitas Sriwijaya. [9 Januari 2012]
- Mattjik, A.A. dan I.M. Sumertajaya. 2006. Perancangan Percobaan. IPB Press. Bogor. 101 hal.
- Nge, K.L., N. Nwe, S. Chandkrachang, and W.F. Stevens. 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Science* 170: 1185-1190.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plant*. Department of Horticulture, Agriculture University Wageningen. Nederland: Martinus Nijhoff Pub. 334 p.
- Pitta-Alvarez, S.I. dan A.M. Giulietti. 2000. Influence of chitosan, acetic acid and citric acid on growth and tropane alkaloid production in transformed roots of brugmansia candida effect of medium pH and growth phase. Netherland. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59:31-38.
- Uthairatanakij, A. J.A. Teixeira da Silva and K. Obsuwan. 2007. Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Science and Biotechnology* 1(1): 1-5 Global Science Books.
- van Loon L.C., W.S. Pierpoint, T. Voller and V. Conejero. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related rrotein. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 245-264.
- Wiendi, N.M.A., G.A. Wattimena dan L.W. Gunawan. 1992. Perbanyakan Tanaman. Hal. 17-77. *Dalam* Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman (*Eds.*). Bioteknologi Tanaman. Pusat Antar Universitas. Bogor. 309 hal.