

**PENGARUH PERIODE SUBKULTUR
TERHADAP KADAR SAPONIN AKAR RAMBUT TANAMAN GINSENG
JAWA (*Talinum paniculatum* Gaertn.)**

JURNAL SKRIPSI



AILA IKHTIMAMI

**PROGRAM STUDI S-1 BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2012**

PENGARUH PERIODE SUBKULTUR TERHADAP KADAR SAPONIN AKAR RAMBUT TANAMAN GINSENG JAWA (*Talinum paniculatum* Gaertn.)

Aila Ikhtimami, Hery Purnobasuki, dan Y. Sri Wulan Manuhara
Prodi S-1 Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi,
Universitas Airlangga, Surabaya

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of subculture period on dry weight and saponin content of ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) hairy root. This study used transformed hairy root of *T. paniculatum* leaf explants which has been inserted by T-DNA plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* and the media were semisolid MS medium without plant growth regulators as subculture medium. The roots were treated by subculture periods (0, 2, 3, 4 weeks) and were cultured for 10 weeks. Datas were obtained as fresh weight root, dry weight root, and saponin content at the end of subculture period. Dry weight data analysis used one-way ANOVA followed up with LSD test (5% significance level). Saponin content were analyzed by semi-quantitative descriptive with Thin Layer Chromatography (silica gel GF₂₅₄). The results showed that the treatment of various subculture periods had significant influence in increasing dry weight of hairy root and 2-weeks subculture period treatment produced the highest dry weight of hairy root with $0,0229 \pm 0,0031$ g dry weight. The result of saponin content on Thin Layer Chromatography test showed that the treatment of various subculture periods had effect on saponin content of hairy root and the highest saponin content obtained in without subculture (0 week) treatment with spot width $34 \pm 2,83$ mm²/0,04 dry weight. The conclusion of this study were the treatment of various periods of subculture had significant effect on the *T. paniculatum* hairy root dry weight with the highest dry weight obtained at 2-weeks subculture period treatment with $0,0229 \pm 0,0031$ g dry weight and various of subculture periods had effect on saponin content of *T. paniculatum* hairy root, the highest saponin content obtained in without subculture treatment with spot width $34 \pm 2,83$ mm²/0,04 dry weight.

Keywords : Hairy root, ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.), subculture, saponin.

Pendahuluan

Ginseng (*Panax ginseng*) diketahui mengandung saponin, antioksidan, peptida, polisakarida, alkaloid, lignans, dan poliasetilen. Saponin dikenal sebagai ginsenosides yaitu komposisi utama bioaktif (Jo *et al.*, 1995; Sticher, 1998;

Palazon *et al.*, 2003). Indonesia memiliki banyak tanaman obat yang dapat dimanfaatkan. Di Indonesia juga terdapat tanaman yang mirip dengan ginseng-ginseng tersebut, yaitu *Talinum paniculatum* Gaertn. dengan nama daerah antara lain ginseng jawa, som jawa, kolesom, dan sebagainya. Morfologi tanaman ginseng jawa ini menunjukkan kesamaan dengan *Panax ginseng* khususnya pada bagian akar sehingga ada anggapan memiliki khasiat yang sama (Heyne, 1987). Analisis metode kromatografi lapis tipis-densitometri terhadap akar kedua tanaman menunjukkan sedikitnya ada dua senyawa yang hampir sama antara akar ginseng jawa dengan akar *Panax ginseng* yaitu senyawa golongan terpenoid dan golongan steroid, yang keduanya termasuk dalam senyawa saponin (Sukardiman, 1996).

Teknik kultur jaringan tanaman memiliki prospek yang lebih baik dari pada metode perbanyakan tanaman secara vegetatif konvensional dikarenakan diantaranya jutaan klon dapat dihasilkan dalam waktu setahun hanya dari sejumlah kecil material awal, teknik kultur jaringan juga menawarkan suatu alternatif bagi spesies yang resisten terhadap sistem perbanyakan vegetatif konvensional dengan melakukan manipulasi terhadap faktor-faktor lingkungan (Zulkarnain, 2011). Kultur akar merupakan jaringan akar yang hidup dan berdiferensiasi secara terorganisasi membentuk biomassa akar tanpa kehadiran organ lainnya seperti batang, tunas atau daun secara *in vitro* (Payne *et al.*, 1992). Salah satu bentuk aplikasi dari kultur akar yang mulai banyak dikembangkan adalah melalui teknik transformasi gen, yang dikenal dengan istilah 'hairy root culture' atau 'kultur akar rambut' (Grierson & Covey, 1988). Kultur akar rambut merupakan metode yang ideal untuk mempelajari kandungan senyawa aktif yang diproduksi tanaman karena akar rambut dapat melakukan sintesis senyawa aktif yang diinginkan, tumbuh stabil dalam media secara *in vitro* (Savary & Flores, 1994).

Pada penelitian ini menggunakan akar rambut yang diketahui dapat menghasilkan metabolit sekunder dalam jumlah yang lebih tinggi dan lebih stabil dari kultur akar normal dan dengan memberikan perlakuan periode subkultur pada akar rambut bertujuan untuk mengetahui pengaruh periode subkultur akar rambut

terhadap kadar saponin tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) sebagai salah satu upaya peningkatan kadar saponin pada akar tanaman tersebut.

Bahan dan Metode

Bahan hayati yang digunakan adalah tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) diperoleh dari Surabaya dan yang digunakan adalah daun sebagai eksplan. Akar rambut diperoleh dari hasil infeksi eksplan daun tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) oleh bakteri *Agrobacterium rhizogenes*. Bahan kimia yang digunakan meliputi bahan kimia penyusun media Murashige dan Skoog (1962) yang mengandung bahan-bahan anorganik dan zat-zat organik (makronutrien, mikronutrien, sukrosa, zat besi, myoinositol, vitamin), clorox 10%, etanol 96% (Merck), akuades, anisaldehyd (Merck), asam asetat glacial (Merck), asam sulfat pekat, alkohol 70%, 2-propanol (Merck), saponin (Calbiochem), pelat *silica gel* GF₂₅₄(Merck).

Induksi akar rambut dan penanaman

Biakan *A. rhizogenes* dalam medium Luria Bertani berumur 24 jam diambil sebanyak 5 mL dan dicampur dengan 50 mL medium *Murashige & Skoog* cair tanpa zat pengatur tumbuh (MS0) kemudian ditambahkan *Asetosyringone* 600 µL (0,004 M). Proses pencampuran dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow cabinet*. Eksplan (daun tanaman ginseng jawa) yang sudah disterilisasi dipotong-potong dengan ukuran ± 1 cm menggunakan skalpel. Potongan daun dipindahkan ke cawan petri yang berisi medium penginfeksi *A. rhizogenes*. Agitasi dilakukan perlahan-lahan secara manual selama ± 5 menit, kemudian eksplan ditiriskan di dalam cawan petri steril beralaskan kertas saring steril selama ± 1 menit. Potongan daun yang sudah ditiriskan, ditempatkan ke dalam cawan petri yang berisi medium MS0 padat.

Eksplan daun yang sudah terinfeksi dengan *A. rhizogenes* dilakukan kokultivasi selama 3 hari pada MS0 padat kemudian eksplan dipindahkan pada media MS0 semisolid + *cefotaxime* yang juga ditempatkan pada cawan petri. Eksplan daun pada media MS0 semisolid + *cefotaxime* ditumbuhkan selama 6 hari dan diperoleh akar rambut ± 2 cm.

Subkultur akar rambut

Periode subkultur dihitung ketika akar rambut ditumbuhkan pada media MSO semisolid + *cefotaxime* berukuran ± 2 cm dan dikultur selama 10 minggu. Akar diberi perlakuan periode subkultur (tanpa subkultur, 2 minggu, 3 minggu, dan 4 minggu).

Ekstraksi saponin

Ekstraksi saponin dilakukan dengan memanen akar kemudian ditimbang berat segar, selanjutnya dioven dengan suhu 50° selama 7 hari. Setelah kering kemudian ditimbang berat kering akar tanaman dan selanjutnya akar digerus dengan mortar untuk mendapatkan tekstur bubuk. Kemudian 0,04 gram bubuk akar kering ditambah 4 mL etanol 96% dan dipanaskan pada suhu 80°C pada *waterbath* selama 45 menit. Ekstrak akar kemudian dipekatkan menjadi 0,2 mL.

Analisis kadar saponin

1. Uji kadar saponin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji KLT dengan cara menotolkan sampel dari ekstrak akar menggunakan mikro pipet pada plat KLT *silica gel* GF₂₅₄, kemudian mengamati fase gerak pada bejana yang berisi larutan eluen dengan komposisi larutan 2-propanol:air = 14:3. Sebagai larutan pembanding menggunakan saponin standar (Calbiochem) 100.000 ppm yang kemudian ditotolkan sebanyak 1 μL pada pelat KLT *silica gel* GF₂₅₄, sedangkan sampel ditotolkan sebanyak 5 μL pada pelat KLT *silica gel* GF₂₅₄. Setelah dielusi kemudian dilakukan penyemprotan pada permukaan pelat KLT *silica gel* GF₂₅₄ dengan menggunakan larutan anisaldehyd-asam sulfat dan selanjutnya dilakukan pemanasan dengan oven 100°C selama 7-10 menit (Stahl, 1985).

2. Uji kadar saponin dengan spektrofotometer

Ekstrak akar 0,2 mL diencerkan dengan akuades sampai 10 mL. Kemudian melakukan pengukuran OD ekstrak akar dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 365 nm (Stahl, 1985). Kemudian nilai absorbansi dimasukkan pada persamaan regresi kurva standar saponin $y = 0,001x$ dengan y adalah nilai absorbansi dan x adalah saponin (ppm) (Yachya, 2012). Nilai saponin yang diperoleh dikonversi menjadi mg/g berat kering eksplan dengan rumus:

$$S = \frac{\text{Saponin di dalam sampel} \times \text{fp}}{\text{Berat sampel}}$$

fp = faktor pengenceran

Penelitian disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dimana metode yang diuji menggunakan 4 macam perlakuan (tanpa subkultur, subkultur 2 minggu, subkultur 3 minggu, dan subkultur 4 minggu). Terdapat 8 kali ulangan pada setiap perlakuan untuk pengamatan berat kering akar rambut dan pengamatan dilakukan setelah akar berumur 10 minggu setelah awal perlakuan sedangkan untuk pengamatan kadar saponin terdapat 2 ulangan untuk masing-masing perlakuan.

Pengamatan dilakukan terhadap berat segar, berat kering akar rambut, dan kadar saponin akar. Berat kering akar ditentukan dengan menimbang akar rambut yang telah dikeringkan pada suhu 50° selama 7 hari setelah panen (umur 10 minggu kultur pada MS0 semisolid). Analisis kandungan saponin dilakukan secara kuantitatif dengan mengukur nilai absorbansi ekstrak etanol akar rambut, kemudian nilai absorbansinya dimasukkan ke persamaan regresi kurva standar untuk memperoleh kandungan saponin (mg)/berat kering sampel (g). Analisis semi kuantitatif kandungan saponin dilakukan dengan menotolkan ekstrak etanol akar rambut yang sudah dipekatkan ke pelat KLT (*silica gel* GF₂₅₄). Noda saponin yang terbentuk diukur dan dihitung luasnya/0,04 g berat kering sampel. Data luas noda saponin merupakan gambaran kandungan saponin pada sampel.

Data berat kering akar diuji dengan menggunakan *one way* ANOVA. Analisis semi kuantitatif kadar saponin dengan mengukur luas noda saponin pada pelat *silica gel* GF₂₅₄. Data luas noda dianalisis secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

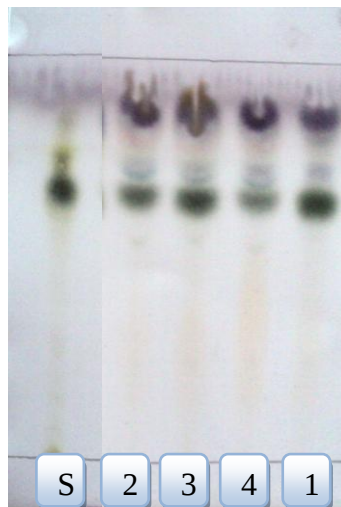
Akar rambut setelah panen kemudian dilakukan penimbangan berat segar selanjutnya akar dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 7 hari dan ditimbang berat keringnya. Data berat segar dan berat kering akar rambut *Talinum paniculatum* Gaertn. pada berbagai periode subkultur dapat dilihat pada tabel 1.1.

Tabel 1.1 Berat segar dan berat kering akar rambut *Talinum paniculatum* Gaertn. dengan berbagai perlakuan periode subkultur.

Periode subkultur (minggu)	Rerata berat segar (g)	Rerata berat kering (g)
0	0,1756 ± 0,0188	0,0125 ± 0,0013 ^a
2	0,3859 ± 0,0576	0,0229 ± 0,0031 ^c
3	0,2038 ± 0,0446	0,0148 ± 0,0023 ^{ab}
4	0,2494 ± 0,0594	0,0166 ± 0,0041 ^b

Keterangan : Huruf a,b,dan c menunjukkan beda nyata antar perlakuan pada taraf signifikansi 5%
Huruf yang sama tidak menunjukkan beda nyata.

Berdasarkan tabel 1.1 terlihat bahwa berat kering akar rambut *T. paniculatum* Gaertn. paling tinggi dihasilkan dari perlakuan periode subkultur 2 minggu dan berat kering pada kontrol (tanpa subkultur) memiliki berat kering yang paling rendah. Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada perlakuan tanpa subkultur, akar telah memasuki fase stasioner dan kematian karena tidak ada suplai nutrisi dengan ditandai rendahnya berat kering. Pada perlakuan periode subkultur 2 minggu didapatkan berat kering akar yang paling tinggi dikarenakan pada periode subkultur 2 minggu, setiap 2 minggu sekali dilakukan subkultur sehingga memberikan pengaruh yang baik terhadap biomassa akar rambut karena ketika nutrisi dalam media berkurang segera mendapatkan tambahan nutrisi dan suplai oksigen baru (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Read (1990) menyatakan bahwa oksigen merupakan salah satu faktor pembatas bagi pembelahan dan pertumbuhan sel-sel pada jaringan yang dikulturkan secara *in vitro*. Jay *et al.*, (1992) menyatakan bahwa selama fase proliferasi, laju pertumbuhan kultur sel tanaman *Daucus carota* lebih rendah dan penyerapan gula mengalami hambatan pada kadar oksigen 10% dibandingkan kadar oksigen 100%. Pada perlakuan periode subkultur 3 dan 4 minggu yang tidak berbeda nyata, diduga dikarenakan meskipun akar mendapat suplai nutrisi dari media yang baru namun pertumbuhan akar sudah hampir memasuki fase stasioner sehingga diperlukan waktu yang cukup lama untuk adaptasi pada media yang baru.



Gambar 2. Hasil Kromatografi lapis tipis ekstrak etanol akar rambut tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) pada pelat *silica gel* GF₂₅₄ menggunakan larutan pengembang 2-propanol/air : 14/3 dan disemprot dengan anisaldehyde-asam sulfat yang diikuti dengan pemanasan. (S) saponin standar, (1) tanpa subkultur, (2) subkultur 2 minggu, (3) subkultur 3 minggu, (4) subkultur 4 minggu.

Kandungan saponin dalam ekstrak etanol akar rambut ginseng jawa dideteksi dengan membandingkan nilai *Rf* (*retardation factor*) noda yang terbentuk pada ekstrak etanol akar rambut ginseng jawa dengan larutan saponin standar dan warna noda setelah dilakukan penyemprotan penampak noda pada pelat *silica gel*. Berdasarkan gambar 2, pada bagian atas pelat *silica gel* terdapat sederetan noda dengan warna ungu berderet pada *Rf* yang sama, warna ungu tersebut hanya terdapat pada sampel ekstrak akar pada semua perlakuan periode subkultur sedangkan pada larutan standar tidak terdapat warna ungu tersebut. Noda berwarna biru juga muncul dan terdeteksi pada sampel ekstrak akar pada semua perlakuan periode subkultur sedangkan pada larutan standar tidak muncul warna biru tersebut. Hal ini membuktikan bahwa larutan penyemprot anisaldehyd-asam sulfat dapat digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa lain dengan menghasilkan warna lain.

Tabel 1.2 Rerata berat kering dan kadar saponin akar rambut *T.paniculatum* pada berbagai periode subkultur.

Periode subkultur	Rerata berat kering (g)	Rerata luas noda saponin (mm ² /0,04 g berat kering)	Kadar saponin (mg/g)
Tanpa subkultur	0,0125±0,0013	34 ± 2,83	337,5
2 minggu	0,0229±0,0031	16,5 ± 9,19	762,5
3 minggu	0,0148±0,0023	22 ± 8,49	4687,5
4 minggu	0,0166±0,0041	16 ± 8,49	662,5

Berdasarkan hasil Uji KLT diketahui bahwa perlakuan kontrol (tanpa subkultur) diperoleh kandungan saponin paling tinggi dan tabel 1.2 menunjukkan bahwa kandungan saponin berkorelasi terbalik terhadap berat kering akar yang diperoleh. Menurut Bhojwani dan Razdan (1996), produksi metabolit sekunder umumnya terjadi pada akhir stasioner ketika persediaan nutrisi medium menipis. Sehingga disimpulkan pada perlakuan kontrol, sel mengalami stress oleh lingkungan ekstrim dan metabolit sekunder dihasilkan sebagai respon atas lingkungan yang kritis tidak ada suplai nutrisi dan oksigen, fase stasioner dicapai lebih cepat sedangkan pada perlakuan yang disubkultur, sel memperoleh suplai nutrisi dan oksigen sehingga sel terkonsentrasi dalam pertumbuhan dan fase stasioner dicapai lebih lama. Hasil yang diperoleh ini juga sesuai dengan hasil yang diperoleh oleh Rijhwani & Shanks (1998) dimana kandungan tabersonine pada akar rambut *Catharanthus roseus* mengalami penurunan linear terhadap biomassa dari hari ke-21 menuju hari ke-35, kandungan tabersonine berkorelasi terbalik dengan biomassa akar. Menurut Rijhwani & Shanks (1998) senyawa yang diamati sebenarnya disintesis secara *continue* namun kecepatan sintesis lebih rendah dari proses transformasi atau degradasi menjadi senyawa lain.

Anand (2010) menyatakan bahwa keuntungan adanya gen asing dari *A.rhizogenes* yang ditransfer pada gen tanaman memungkinkan produksi metabolit sekunder tertentu atau menghasilkan metabolit sekunder tersebut karena hadirnya gen penyandi enzim yang mengkatalis proses hidroksilasi, metilasi, dan reaksi glikolisis.

Pada panjang gelombang 365 nm diperoleh data kandungan saponin dari yang paling tinggi sampai rendah yaitu pada perlakuan periode subkultur 3

minggu sebesar 4687,5 mg/g berat kering, selanjutnya pada perlakuan periode subkultur 2 minggu sebesar 762,5 mg/g berat kering, pada perlakuan periode subkultur 4 minggu sebesar 662,5 mg/g berat kering, dan yang memiliki kandungan saponin yang paling rendah yaitu pada perlakuan tanpa subkultur sebesar 337,5 mg/g berat kering. Kandungan saponin hasil analisis secara spektrofotometri keempat kultur dengan perlakuan periode subkultur yang berbeda secara tidak langsung menginformasikan hasil kandungan saponin secara spektrofotometri berbeda dengan kandungan saponin hasil analisis secara KLT. Perbedaan kandungan saponin hasil analisis secara spektrofotometri dengan KLT dapat disebabkan adanya pigmen kuning pada masing-masing ekstrak etanol atau adanya senyawa lain. Pigmen kuning nampak pada hasil KLT sebelum pelat disemprot dengan reagen anisaldehyd-asam sulfat. Analisis menggunakan sinar UV seperti pada spektrofotometer UV-Vis yang teridentifikasi adalah semua kandungan senyawa metabolit sekunder yang dapat dilihat pada panjang gelombang maksimal 365 nm. Sedangkan analisis saponin dengan KLT dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat hanya mengidentifikasi noda saponin. Data luas noda saponin hanya diperoleh benar-benar merupakan luasan noda senyawa saponin dalam sampel, karena hanya saponin yang dapat memberikan warna hijau dengan reagen penampak noda anisaldehyd-asam sulfat sehingga metode yang diacu untuk menjawab rumusan masalah adalah analisis kadar saponin dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Kesimpulan

Periode subkultur berpengaruh terhadap berat kering akar rambut tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) pada taraf signifikansi 5% dan perlakuan yang menghasilkan berat kering akar paling tinggi yaitu pada perlakuan periode subkultur 2 minggu dengan berat kering akar $0,0229 \pm 0,0031$ g. Berdasarkan analisis secara deskriptif, periode subkultur berpengaruh terhadap kadar saponin akar rambut tanaman ginseng jawa (*Talinum paniculatum* Gaertn.) dan perlakuan yang menghasilkan kadar saponin paling tinggi yaitu pada perlakuan tanpa subkultur dengan luas noda $34 \pm 2,83 \text{ mm}^2/0,04$ berat kering.

Daftar pustaka

- Bhojwani, S.S and Razdan M.K, 1996, Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition, *Elsevier*.
- Grierson, D., and S. N. Covey, 1988, Plant *Molecular Biology*, 2nd edition, Blackie, Chapman & Hall, New York, 141-147.
- Hendaryono, D.P.S, dan A. Wijayani, 1994, *Teknik Kultur Jaringan : Pengenalan dan petunjuk Perbanyakan Tanaman Secara Vegetatif-Modern*, Kanisius, Yogyakarta.
- Heyne K, 1987, *Tumbuhan berguna Indonesia*, Litbang Kehutanan Dep Pertanian RI.
- Jay, V, S. Genestier, J.C. Courdouroux, 1992, Bioreactor Studies on The Effect of Dissolved Oxygen Concentrations on Growth and Differentiation of Carrot (*Daucus carota* L.) Cell Cultures, *Plant Cell Reports* 11.
- Jo, J.S, Han, Y.N., Oh, H.I., Park, H., Sung, H.S. and Park, J.I, 1995, *Korean ginseng has a characteristic shape. In understanding of Korean ginseng*, Hanrimwon Publishing Co, Seoul, Korea.
- Palazon, J., Cusido, R.M., Bonfil, M., Mallol, A., Moyamo, E., Marales, C. and Pinol, M.T, 2003, Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improvement ginsenoside production, *Plant physiology Biochemistry* 41: 1019-1025.
- Payne GF, Bringi V, Prince CL, and Shuler ML, 1992, *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, New York: Wiley.
- Read, P. E, 1990, *Environmental effects in Micropropagation* dalam Zulkarnain, *Kultur Jaringan Tanaman*, Bumi aksara, Jakarta.
- Rijhwani S.K., and Shanks J.V, 1998, Effect of subculture cycle on growth and indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* hairy root cultures, *Elsevier*.
- Savary BJ, and Flores HE, 1994, Biosynthesis of defense-related protein in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim var. *japonicum* (Kitam), *Plant Physiology* 106: 1195-1204.
- Stahl, E, 1985, *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Sudiro, Bandung: ITB.
- Sticher, O, 1998, Getting to the root of ginseng, *Chemtech* 28: 26-32.
- Sukardiman, 1996, *Perbandingan profil kandungan kimia dari akar Talinum paniculatum Gaertn. dan panax ginseng dengan metode KLT-Densitometri*, Buku Panduan Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XI, Surabaya.
- Yachya, A, 2012, Pengaruh laju aerasi dan kerapatan inokulum terhadap biomassa dan kandungan saponin kultur akar rambut ginseng jawa (*talinum paniculatum* gaertn.) dalam bioreaktor tipe balon, *Thesis*, Universitas Airlangga.
- Zulkarnain, 2011, *Kultur Jaringan Tanaman*, Bumi Aksara, Jakarta.