

Pertumbuhan *In vitro* Tunas Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Crantz) pada Berbagai Bahan Pekat Alternatif Pengganti Agar

The growth of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) on various alternative gelling agents

DODY PRIADI*, HANI FITRIANI, ENNY SUDARMONOWATI

Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor 16911

Diterima: 20 Nopember 2007. Disetujui: 27 Desember 2007.

ABSTRACT

Gelling agents which is an important component in plant tissue culture media is considered expensive which causes high cost of plant micropropagation in developing countries. The objective of the study was to evaluate various commercial starches (hunkue, sago, tapioca, maize and arrowroot) and food agars for substitution of standard technical agar which commonly used in tissue culture medium. Young stem cuttings with five buds of cassava (*Manihot esculenta* Crantz. genotype Iding and Gebang) cultured on MS hormone-free media solidified with those starches and agars. Parameters observed were total and length of shoots and rate of contamination. Result of study showed that the highest total shoots (2.45) on genotype Iding obtained from Agar *Swallow* 0.8% (control), meanwhile on Gebang (2.85) obtained from tapioca 25%. The highest shoot length on genotype Iding (17.2 mm) obtained from maize, meanwhile on Gebang obtained from agar *Sinar Kencana* 2% (8.95 mm). Contamination rate of explants caused by bacteria or fungi on genotype Iding was 30-70%, meanwhile on Gebang was 20-60%. Further study needs to be done to evaluate more gelling agents from different sources and their combinations.

© 2008 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: medium, gelling agents, agar, starch, cassava (*Manihot esculenta* Crantz).

PENDAHULUAN

Bahan pekat (*gelling agents*) merupakan salah satu komponen yang penting di dalam media kultur jaringan tanaman maupun mikroorganisme. Media yang dipadatkan secara sempurna dapat menjadi media yang baik untuk pertumbuhan jaringan tanaman maupun mikroorganisme, karena dapat memelihara proses biokimia dan fisiologisnya (Maliro dan Lameck, 2004). Bahan pekat yang digunakan dalam kultur jaringan tanaman adalah jenis agar standar khusus untuk kultur jaringan tanaman yang umumnya masih diimpor, misalnya merek *Bacto*, *Oxoid* atau *Gelrite* dan *Phytigel*.

Salah satu kendala penggunaan bahan pekat impor di negara sedang berkembang seperti Indonesia adalah harganya yang mahal, dan kadang kala memerlukan waktu yang relatif lama untuk memperolehnya. Hal ini mendorong para peneliti di negara berkembang untuk mencari bahan pekat alternatif dari berbagai tumbuhan umbi-umbian dan sereal, misalnya dari pati ubi kayu (Dabai dan Muhammad, 2005) dan guar gum (diisolasi dari endosperma *Cyamopsis tetragonoloba*), isubgol (diisolasi dari kulit biji *Plantago ovata*) (Jain dan Babbar, 2004) dan tepung maizena (Henderson dan Kinnersley, 1988; Wattimena *et al.*, 1994), serta menggunakan bahan tanaman anggrek, kentang, ubi kayu dan sebagainya.

Derajat kepadatan bahan pekat media terutama agar teknis standar kultur jaringan tanaman bergantung kepada konsentrasi dan derajat keasaman (pH). Kepadatan yang optimum biasanya tercapai pada pH 5,0-6,0 (Hartmann *et al.*, 1990). Karakteristik pati atau bahan pekat non agar lainnya berbeda dengan agar, sehingga untuk mencapai kepadatan yang optimum diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi, seperti halnya campuran pati kentang dan gelatin (4% dan 8%) (Ibrahim *et al.*, 2005).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi bahan pekat alternatif dari beberapa jenis pati (tepung) dan agar-agar bahan kue sesuai perlakuan, serta mengidentifikasi pengaruhnya terhadap pertumbuhan stek muda ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) secara *in vitro* sebagai tanaman model.

BAHAN DAN METODE

Bahan pekat dan sumber eksplan

Bahan pekat yang diuji adalah berbagai jenis pati dan agar-agar kue yang diperoleh dari pasar tradisional maupun swalayan. Pada penelitian ini, agar *Swallow* tanpa zat pewarna digunakan sebagai kontrol karena sudah umum digunakan di laboratorium, sebagai alternatif agar standar kultur jaringan tanaman untuk perbanyakan melalui multiplikasi tunas majemuk. Meskipun harga agar *Swallow* relatif lebih mahal dari pada agar batangan, penggunaan agar *Swallow* yang berbentuk serbuk dinilai lebih praktis dan murni, serta diperlukan dalam jumlah yang lebih sedikit sehingga memerlukan energi yang lebih sedikit pula untuk mengolahnya. Masing-masing bahan pekat dari agar

* Alamat korespondensi:

Jl. Raya Bogor Km.46 Cibinong 16911
Tel. +62-21-8754587; Fax. +62-21-8754588
e-mail: d_priadi@telkom.net

komersial maupun pati yang digunakan pada penelitian ini ditambahkan ke dalam media sehingga diperoleh kepadatan yang sesuai untuk kultur jaringan tanaman.

Sebagai tanaman model digunakan eksplan tunas pucuk dari stek muda ubi kayu (*M. esculenta*) unggul (mempunyai kandungan amilosa atau amilopektin yang tinggi) yang berdiameter 5 mm dan mempunyai 5 mata tunas, dikoleksi secara langsung dari Kebun Koleksi Ubi Kayu Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Cibinong-Bogor. Pertimbangan ubi kayu digunakan sebagai eksplan model pada penelitian ini karena mudah diperoleh dan cepat tumbuh serta teknik sterilisasi dan perbanyakannya sudah diketahui. Secara rinci bahan pematat dan eksplan yang digunakan pada penelitian ini dapat diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis bahan pematat dan eksplan yang digunakan pada penelitian.

Jenis bahan pematat	Kode	Genotipe ubi kayu	
Agar kue <i>Swallow</i> (kontrol)	ASW	Iding	Gebang
Agar kue <i>Sinar Kencana</i>	ASK	Iding	Gebang
Tepung hunkue <i>Achille</i>	HUN	Iding	Gebang
Tepung sagu <i>Alini</i>	SAG	Iding	Gebang
Tepung tapioka <i>Alini</i>	TAP	Iding	Gebang
Tepung maizena <i>Hero Save</i>	MAI	Iding	Gebang
Tepung ubi garut	GAR	Iding	Gebang

Persiapan media dan inkubasi

Media yang digunakan adalah media basal MS (Mura-shige-Skoog) ditambah dengan 4% sukrosa komersial (gula pasir) tanpa ditambah zat pengatur tumbuh. Media diatur pH-nya menjadi 5,8 sebelum ditambah bahan pematat (agar atau pati) sesuai dengan perlakuannya. Media dibuat dengan dua cara. Cara pertama yaitu larutan media dipanaskan di atas alat pemanas sampai mencapai titik didihnya, lalu dituangkan ke botol kultur, kemudian disterilisasi. Cara kedua yaitu media disterilisasi terlebih dahulu kemudian dituangkan ke botol-botol selai yang sudah disterilkan sebelumnya dengan volume sekitar 10 mL. Media disterilisasi menggunakan otoklaf pada suhu 121°C (1,5 atm) selama 20 menit.

Tunas ubi kayu diperoleh dari stek yang ditanam di rumah kaca. Eksplan disterilisasi permukaan menggunakan berbagai sterilan sebagai berikut: air mengalir yang ditambah detergen selama 30 menit, fungisida 4% *Dithane M* (30 menit), 0,1% fungisida *Masalgin* (30 menit), 0,1% HgCl₂ (3-5 menit) dan etanol 70% (5 menit). Di antara tahapan sterilan, eksplan dicuci beberapa kali menggunakan akuades steril dan dilakukan di dalam laminar air flow. Kultur disimpan pada ruangan kultur bersuhu 25-28°C dengan fotoperiode 8 jam terang dan 16 jam gelap.

Pengamatan kontaminasi

Pengamatan kontaminasi kultur dilakukan untuk mengetahui saat kontaminasi muncul dan tingkat eksplan yang kontaminasi selama penelitian. Pengamatan dilakukan secara visual setiap hari selama 2 minggu.

Disain percobaan

Penelitian disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 10 ulangan (jumlah tunas) dan 4 ulangan (tinggi tunas). Faktor pertama adalah jenis bahan pematat dan faktor kedua adalah parameter pertumbuhan (jumlah dan tinggi tunas) serta laju kontaminasi. Jumlah tunas dan laju kontaminasi diamati setiap dua hari,

sedangkan tinggi tunas diamati setelah kultur berumur 2 minggu. Data dianalisis dengan Sidik Ragam dan dilanjutkan dengan DMRT menggunakan paket perangkat lunak statistik SPSS 11.0. Ringkasan rancangan percobaan tersebut disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Ringkasan kombinasi perlakuan faktorial pengaruh jenis bahan pematat terhadap parameter pertumbuhan serta laju kontaminasi.

Perlakuan	
Faktor I	Jenis bahan pematat (%): 1. Agar kue <i>Swallow</i> (Kontrol) 2. Agar kue <i>Sinar Kencana</i> Argapura 3. Tepung hunkue <i>Achille</i> 4. Tepung sagu <i>Alini</i> 5. Tepung tapioka <i>Alini</i> 6. Tepung maizena <i>Hero Save</i> 7. Tepung ubi garut
Faktor II	Jumlah tunas Tinggi tunas Laju kontaminasi (%)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi optimum bahan pematat

Agar

Media yang dipadatkan dengan agar secara umum warnanya lebih transparan tergantung dari tingkat kemurniannya, semakin murni agar yang digunakan semakin sedikit jumlah agar yang dibutuhkan untuk membuat media. Agar *Swallow* (kontrol) lebih murni dari pada agar *Sinar Kencana* sehingga kebutuhan agar *Swallow* (0,8 g) lebih sedikit dari pada agar *Sinar Kencana* (2,0 g). Media yang transparan diperlukan untuk pengamatan perakaran. Keuntungan penggunaan agar sebagai bahan pematat media adalah karena agar dapat dicairkan kembali sewaktu-waktu menggunakan alat pemanas atau oven "microwave", setelah disimpan dalam keadaan padat. Sifat negatif agar adalah dapat mengikat air dan menyerap senyawa dari media sehingga dapat mengurangi penyerapan zat pengatur tumbuh (Yaseen, 2001), tetapi konsentrasi agar yang tepat dapat menyebabkan kontak yang baik antara eksplan dengan media serta memperlancar penyerapan hara (Hartmann *et al.*, 1990). Fungsi bahan pematat secara umum adalah untuk menambah viskositas media sehingga jaringan atau organ tanaman dapat tetap berada di atas permukaan media (Prakash *et al.*, 2004).

Pati

Media yang dipadatkan dengan pati menjadi berwarna keruh karena pati tersusun dari dua fraksi polimer, yaitu amilose dan amilopektin. Amilose dalam larutan akan segera membentuk ikatan hidrogen untuk membentuk gel yang kaku dan keruh, sedangkan amilopektin mempunyai kemampuan terbatas untuk membentuk ikatan hidrogen sehingga membentuk gel yang lembek dan relatif jernih (Moore *et al.*, 1984). Dengan demikian kemampuan pati untuk menjadi padat ditentukan oleh kadar amilose yang terkandung di dalamnya, sehingga semakin tinggi kadar amilosnya maka akan semakin cepat memadat dan kepadatannya lebih kuat (Zallie, 1988). Tapioka sebagaimana jenis pati yang lain bukan hanya berfungsi sebagai bahan pematat tetapi juga merupakan sumber karbohidrat di dalam media (Gebre dan Sathyanarayana,

2001). Hasil pengujian beberapa bahan pematik disajikan pada Gambar 1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi pati yang paling tinggi untuk memadatkan media adalah sagu dan tapioka (masing-masing 25%), diikuti berturut-turut oleh tepung garut (16%), tepung hunkue (12%), dan tepung maizena (8,0%).

Penelitian Wattimena *et al.* (1994) menunjukkan bahwa konsentrasi maizena 8% dapat mensubstitusi agar dan mempengaruhi produksi mikro kentang sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim *et al.* (2005) menunjukkan bahwa konsentrasi maizena yang lebih tinggi (20-40%) menyebabkan stek tanaman kentang tidak dapat menghasilkan tunas dan meristem yang hidup. Selain itu maizena juga dapat meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi kultur sel tanaman (Henderson dan Kinnersley, 1998). Kelemahan pati sebagai bahan pematik adalah permukaan media di dalam botol menjadi tidak rata setelah dingin. Selain itu apabila menggunakan aluminium foil sebagai penutupnya maka akan menjadi sangat lengket melekat pada botol, sehingga mudah robek apabila dibuka.

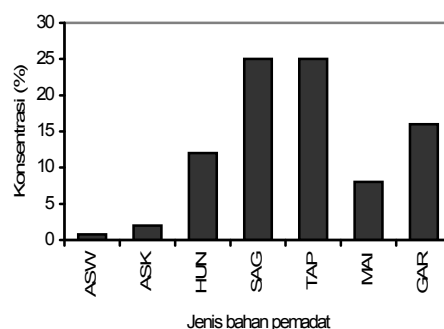
Jenis bahan pematik dan pertumbuhan stek ubi kayu Jumlah tunas

Media yang paling banyak menghasilkan tunas pada genotip Iding adalah agar *Swallow* 0,8% (kontrol) yang tidak berbeda nyata dengan sebagian besar jenis bahan pematik lainnya kecuali sagu 25% dan garut 16%. Hunkue menghasilkan tunas yang sama dengan maizena (2,15), tetapi hunkue menyebabkan permukaan media menjadi tidak rata, dengan demikian maizena adalah pati yang paling sesuai untuk perbanyak genotip Iding setelah agar *Swallow*.

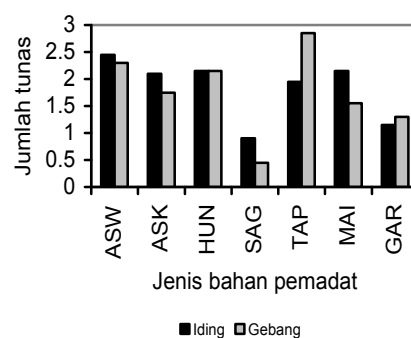
Jumlah tunas terbanyak pada genotip Gebang dihasilkan dari tapioka 25% (2,85) lebih banyak dari kontrol (2,30), dan hanya dua jenis bahan pematik yang tidak berbeda nyata dengan kontrol secara statistik (5%) yaitu agar *Sinar Kencana* 2%, hunkue 12% dan tapioka 25%, sedangkan sebagian besar jenis pematik lainnya tidak berbeda nyata. Oleh karena itu tapioka adalah pati yang paling sesuai untuk genotip Gebang dari pada agar *Swallow* dan media pematik lainnya (Gambar 2). Penelitian Costa *et al.* (2007) menunjukkan bahwa perbanyak tunas nanas dengan menggunakan tepung tapioka menghasilkan jumlah yang tidak berbeda dengan apabila menggunakan agar, tetapi apabila tapioka dikombinasikan dengan agar akan menghasilkan jumlah tunas yang lebih sedikit. Media yang dipadatkan dengan sagu menunjukkan angka rerata jumlah tunas yang paling rendah dibandingkan dengan bahan pematik lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa sagu bukan merupakan bahan pematik yang baik, sama seperti hasil penelitian Gebre dan Sathyanarayana (2001) pada tanaman kentang.

Panjang tunas

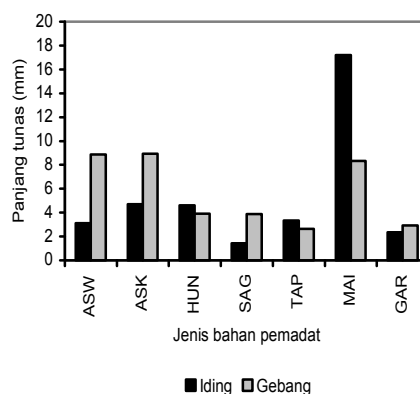
Seperti halnya pada jumlah tunas, maizena adalah pati yang paling sesuai untuk media pertumbuhan Iding karena menghasilkan rerata jumlah tunas paling tinggi (17,2 mm) dan berbeda nyata (5%) dengan kontrol maupun dengan bahan pematik lainnya. Tunas yang panjang pada genotip Iding diakibatkan oleh jarak antara buku-buku yang lebih panjang dari pada genotip lainnya. Bahan pematik yang menghasilkan panjang tunas tertinggi pada Gebang adalah agar *Sinar Kencana* 2% (8,95 mm) yang lebih tinggi dari kontrol (8,88 mm) sedangkan maizena 8% adalah pati yang menghasilkan tunas tertinggi (8,33 mm) di antara jenis pati lainnya (Gambar 3).



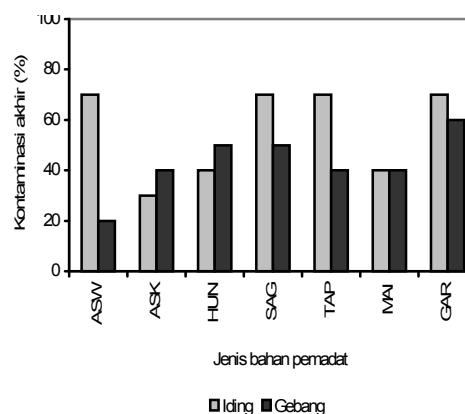
Gambar 1. Konsentrasi optimum bahan pematik yang bersumber dari pati dan agar.



Gambar 2. Pengaruh beberapa jenis bahan pematik alternatif terhadap jumlah tunas ubi kayu.



Gambar 3. Pengaruh beberapa jenis bahan pematik alternatif terhadap panjang tunas ubi kayu.



Gambar 4. Tingkat kontaminasi rata-rata yang dihasilkan dari stek ubi kayu genotip Iding dan Gebang pada berbagai jenis bahan pematik media.

Laju kontaminasi

Walaupun prosedur sterilisasi sudah lama dikembangkan di Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, namun persentase eksplan bersih bervariasi bergantung pada jenis maupun genotip tanaman. Hasil pengamatan laju kontaminasi menunjukkan bahwa kontaminasi bakteri maupun jamur muncul pada kultur lding dan Gebang, tetapi secara umum kultur lding (30-70%) lebih banyak yang terkontaminasi daripada Gebang (20-60%) (Gambar 2). Hal ini membuktikan bahwa prosedur sterilisasi dan jenis sterilan yang digunakan pada penelitian ini tidak cukup kuat untuk mematikan bakteri dan jamur karena sumber kontaminasi yang kemungkinan ada di dalam epidermis bahkan di ruang intraseluler tidak terkena oleh perlakuan sterilisasi permukaan (Pence dan Sandoval, 2002). Pada umumnya bakteri yang sukar dimusnahkan adalah bakteri endogen yang tidak menunjukkan gejala yang terlihat pada kultur (Wojtania *et al.*, 2005). Menurut Cooke *et al.* (1992) kontaminasi oleh bakteri tidak muncul selama mikropropagasi karena konsentrasi garam, sukrosa, pH dan temperatur tidak optimal untuk pertumbuhan bakteri. Penelitian lebih lanjut masih harus dilakukan untuk mengetahui jenis bakteri maupun kapang yang menyebabkan kontaminasi pada setiap genotip atau media yang digunakan seperti yang dilakukan oleh Pirttila *et al.* (2000) pada eksplan tunas pinus menggunakan teknik hibridisasi.

Perbandingan biaya

Keuntungan menggunakan bahan pematat standar (agar) pada kultur jaringan tanaman adalah karena mempunyai warna yang lebih terang daripada bahan pematat alternatif. Namun penggunaan agar standar pada perbanyakan secara massal akan meningkatkan biaya produksi secara signifikan. Hal ini sangat perlu diperhatikan karena di antara komponen penyusun media, biaya bahan pematat dapat mencapai sekitar 70%, sedangkan komponen lain seperti garam-garam mineral, gula dan zat pengatur tumbuh hanya sedikit berpengaruh terhadap biaya produksi karena harganya relatif murah (Prakash *et al.*, 2004). Pada Tabel 3 disajikan perbandingan harga beberapa jenis bahan pematat media standar kultur jaringan tanaman dengan bahan pematat media yang digunakan pada penelitian ini.

Tabel 3. Perbandingan biaya berbagai bahan pematat yang digunakan untuk kultur jaringan tanaman.

Jenis bahan pematat	Harga/g (Rp.)	Konsen-Biaya/trasi (%)	Biaya/L (Rp.)
Agar (Oxoid) No.1*	1.740.000/500	0,8	27.840
Phytigel (Sigma)*	294.300/100	0,3	8.829
Tepung hunkue (HK)	2.475/150	12	1.980
Tepung sagu (SG)	5.500/500	25	2.750
Tepung tapioka (TP)	3.850/500	25	1.925
Agar-agar kue "Swallow" (SW)	1.850/7	0,8	2.115
Tepung maizena (MZ)	5.450/400	8	1.090
Tepung ubi garut (GR)	8.000/1000	16	1.280
Agar-agar kue "Sinar Kencana" (SK)	40.000/500	2	1.600

Keterangan: *. Bahan pematat standar untuk kultur jaringan tanaman

KESIMPULAN

Pada penelitian ini jenis pati yang paling baik digunakan sebagai bahan pematat pada kultur jaringan genotip lding adalah agar *Swallow* 0,8% (Rp. 2.115,00/L) dan maizena 8% (Rp. 1.090,00/liter), sedangkan untuk Gebang adalah tepung tapioka 25% (Rp. 1.925,00/liter) dan

agar *Sinar Kencana* 2% (Rp. 1.600,00/liter). Penggunaan tepung maizena dan tapioka sebagai bahan pematat pengganti agar dapat disarankan, namun harus diperhatikan cara pembuatannya mengingat sifat-sifat pati yang berbeda dengan agar, misalnya tidak bisa dicairkan kembali setelah didinginkan. Oleh karena itu penggunaan bahan pematat media yang bersumber dari agar kue (*Swallow* dan *Sinar Kencana*) masih merupakan pilihan mengingat agar mempunyai karakteristik fisik yang lebih baik dari pada pati. Meskipun hasil penelitian ini menunjukkan bahwa beberapa jenis pati dan agar dapat digunakan sebagai bahan pematat media pengganti agar standar kultur jaringan terutama untuk perbanyakan tanaman, penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mencari jenis bahan pematat alternatif yang lebih baik kualitasnya seperti warna yang lebih jernih dan proses pengolahan yang tidak terlalu rumit serta harganya yang relatif murah.

DAFTAR PUSTAKA

- Cooke, D.L., W.M. Waites, and C. Leifert. 1992. Effects of *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas siringae* and *Xanthomonas campestris* on plant tissue cultures of *Aster*, *Cheiranthus*, *Delphinium*, *Iris* and *Rosa*: disease development *in vivo* as a results of latent infection *in vitro*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 99: 469-481.
- Costa, F.H. da S., M.A.A. Pereira, J.P. de Oliveira, and J.E.S. Pereira. 2007. Effect of alternative gelling agents in culture medium in the *in vitro* cultivation of pineapple and banana. *Ciência e Agrotecnologia* 31 (1): 41-46.
- Dabai, Y.U. and S. Muhammad. 2005. Cassava starch as an alternative to agar-agar in microbiological media. *African Journal of Biotechnology* 4 (6): 573-574.
- Gebre, E. and B.N. Sathyanarayana. 2001. Tapioca-A new and cheaper alternative to agar for direct *in vitro* shoot regeneration and microtuber production from nodal cultures of potato. *African Crop Science Journal* 9 (1): 1-8.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, and F.T. Davies. 1990. *Plant Propagation: Principles and Practices*. 5th ed. Singapore: Prentice Hall Inc.
- Henderson, W.E. and A. M. Kinnersley. 1988. Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 15 (1): 17-22.
- Ibrahim, K.M, M.A. Kazal and K.I. Rasheed. 2005. Alternative gelling agents for potato tissue culture applications. *Majalah Al-Istismar Al-Zara'y* 3: 80-83. www.aaaid.org/pdf/magazine3/Desiree%20tissue%2080-82.pdf.
- Jain, R. and S.B. Babbar. 2005. Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling agents for *in vitro* multiplication of an orchid, *Dendrobium chrysotoxum*. *Current Science* 88 (2): 292-295.
- Maliro, M.F.A. and G. Lameck. 2004. Potential of cassava flour as a gelling agent in media for plant tissue cultures. *African Journal of Biotechnology* 3 (4): 244-247.
- Moore, C.O., J.V. Tuschhoff, C.W. Hastings and R.V. Schanefelt. 1984. Application of starch in foods. In: Whistler, R.L. and J.N. Bemiller (eds.). *Starch Chemistry and Technology*. 2nd ed. London: Academic Press Inc.
- Pence, V.C and J.A. Sandoval. 2002. Controlling contamination during *in vitro* collecting. In: Pence V.C., J.A. Sandoval, V.M. Villalobos A., and F. Engelmann (eds.). *In vitro Collecting Techniques for Germplasm Conservation*. Rome: IPGRI Technical Bulletin No. 7.
- Pirttila, A.M., H. Laukkanen, H. Pospiech, R. Myllyla and A. Hohtola. 2000. Detection of intracellular bacteria in the buds of scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (7): 3073-3077.
- Prakash, S., M.I. Hoque, and T. Brinks. 2004. Culture media and containers. In: *Low Cost Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries. Proceedings of Workshop of FAO-IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture*. Vienna, 26-30 August 2002.
- Wattimena, G.A., A. Purwito dan D. Permatasari. 1994. Tepung maizena sebagai substitusi agar pada produksi tunas *in vitro* kentang (*Solanum tuberosum* L.). Dalam: Soetisna (ed.). *Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi II*. LIPI, Bogor, 6-7 September 1994.
- Wojtania, A., J. Pulawska and E. Gabryszewska. 2005. Identification and elimination of bacterial contaminants from pelargonium tissue cultures. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 13: 101-108.
- Yaseen, Y.M. 2001. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberelin and plant morphogenesis *in vitro*. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 37 (2): 204-205.
- Zallie, J.P. 1988. *New Starches for Gelling and Non-Gelling Applications in the Manufacturing Confectioner*. National Starch and Chemical Co. <http://www.foodinnovation.com/pdfs/gelling.pdf>