

PENGARUH KONSENTRASI EKSTRAK MALT DAN SUMBER EKSPLAN YANG BERBEDA TERHADAP INDUKSI TUNAS SECARA LANGSUNG PADA LIMAU KUE' (*Citrus sp*)

Sri Pertiwi Estuningsih dan Anom Wulandani
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRAK

Penelitian pengaruh konsentrasi ekstrak malt dan sumber eksplan yang berbeda terhadap induksi tunas secara langsung pada Limau Kue' (Citrus sp) secara in vitro telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak malt dan sumber eksplan terhadap induksi tunas secara langsung. Dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pengaruh konsentrasi ekstrak malt dan sumber eksplan terhadap induksi tunas serta sebagai langkah awal propagasi limau kue'. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan penambahan ekstrak malt dengan 6 taraf konsentrasi yaitu 0, 100, 150, 200, 250 dan 300 mg/ L. Semua kombinasi media perlakuan digunakan untuk menanam eksplan (hipokotil, epikotil dan kotiledon) yang berasal dari biji limau Kue' yang dikedambahkan secara steril, masing-masing diulang 2 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kotiledon dan hipokotil, semua perlakuan yang dicobakan belum mampu menginduksi tumbuhnya tunas, tetapi hanya menginduksi tumbuhnya kalus. Tunas tumbuh hanya pada eksplan epikotil. Tunas paling cepat muncul pada perlakuan M3 (penambahan ekstrak malt 150 mg/ L) yaitu 6,5 hari setelah penanaman dengan tinggi tunas yang mencapai paling panjang yaitu 28,9 mm.

Kata kunci : Ekstrak Malt, Eksplan, Limau Kue' (*Citrus sp*)

PENDAHULUAN

Limau Kue' (*Citrus sp*) merupakan salah satu jenis jeruk khas yang berasal dari Sumatra Selatan khususnya dari daerah Ogan Komering Ilir (OKI). Tanaman ini mempunyai buah dengan rasa manis dan aroma yang harum. Tinggi batang 5 – 8 meter, buah menggantung pada kedua ujungnya, kulit buah berwarna hijau jingga kemerahan. Kulit agak berbenggol-

benggol, mudah dilepaskan dari daging buahnya. Jeruk ini mempunyai ciri-ciri seperti jeruk ragi, sedangkan jeruk ragi termasuk jeruk keprok (Heyne, 1987).

Menurut data Dinas Pertanian Tingkat II OKI (1990), populasi sangat banyak pada tahun di bawah delapan puluhan, khususnya di Kecamatan Tanjung Raja. Tanaman ini hampir terdapat di seluruh desa dalam wilayah Kecamatan

Tanjung Raja. Namun pada saat ini limau Kue' sudah sulit dijumpai.

Faktor yang menyebabkan langkanya limau kue' ini adalah adanya serangan CVPD (Citrus Vein Phloem Degeneration), dan daerah OKI dianggap sebagai daerah yang endemis (Semangun, 1991). Penyebab penyakit ini adalah sejenis prokariota, *Micoplasma* patogen yang ditularkan lewat alat pemangkas, misalnya: pisau, gunting pemangkas, gergaji atau alat-alat untuk perbanyakan vegetatif baik penempelan maupun penyambungan serta serangga penular (Semangun, 1991).

Berdasarkan pemikiran tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk menyelamatkan atau mempertahankan suatu plasma nutfah dan keragaman genetik suatu sumber daya alam hayati, seperti halnya dengan jeruk kue' ini, sehingga jeruk ini di masa yang akan datang tidak hanya tinggal namanya saja.

Pengadaan bibit jeruk secara konvensional biasanya dengan bibit cemani. Namun ternyata semua bibit semai ini sensitif terhadap CVPD. Pembiakan secara vegetatif seperti stek, cangkok, sambung (grafting) dan okulasi menghasilkan tanaman yang sama dengan induknya, tetapi boros dalam penggunaan materi, sulit

memperoleh bibit dalam jumlah yang besar (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Usaha yang paling tepat untuk melestarikan jenis-jenis tanaman yang terancam punah adalah dengan teknik kultur jaringan khususnya teknik kloning. Dengan teknik ini akan diperoleh bibit/anakan dalam waktu yang relatif singkat, dengan jumlah yang relatif banyak, bebas virus sekaligus mempunyai sifat-sifat seperti induknya (George dan Sherington, 1984 dan Gunawan, 1995).

Teknik kloning dalam kultur jaringan dapat dilakukan melalui proses organogenesis yang dapat diinduksi secara tak langsung, melalui pembentukan kalus (sudah dilakukan pada penelitian sebelumnya) dan secara langsung yaitu organogenesis diinduksi langsung dari eksplan tanpa melalui tahapan pembentukan kalus. Namun tidak semua tanaman dapat diinduksi proses organogenesisnya secara langsung pada hipokotil, epikotil dan kotiledon.

Menurut Pieric (1987) bahwa substansi organik memberikan sumbangan besar bagi keberhasilan kultur jaringan tumbuhan tingkat tinggi. Ekstrak malt yang merupakan salah satu bahan organik dapat digunakan untuk memacu pertumbuhan tunas jeruk secara *in vitro* bila digunakan

dengan konsentrasi dan pada eksplan yang tepat. Ekstrak malt sebagai sumber karbon dan pensuplai zat pengatur tumbuh serta sumber nitrogen.

Tanaman berkayu dalam teknik *in vitro* sering menemui kendala, yaitu adanya pencoklatan (*browning*) yang selanjutnya akan mematikan kultur itu sendiri. Penggunaan eksplan terutama dari hipokotil, epikotil atau kotiledon merupakan upaya untuk mengatasi hal tersebut. Bertitik tolak dari pemikiran tersebut di atas maka akan dilakukan penelitian perbanyakan limau kue' secara *in vitro*, khususnya tentang proses organogenesis (terjadinya tunas) secara langsung pada hipokotil, epikotil dan kotiledon limau kue' yang diinduksi oleh ekstrak malt.

TUJUAN DAN MANFAAT

Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak malt serta sumber eksplan (hipokotil, epikotil dan kotiledon) terhadap induksi tunas limau lue' secara langsung.

Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini merupakan penelitian dasar di bidang Bioteknologi, dimana

Bioteknologi pada umumnya bertujuan untuk kesejahteraan manusia, termasuk dalam hal penyelamatan kekayaan hayati.

2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan informasi mengenai pengaruh konsentrasi ekstrak malt serta sumber eksplan terhadap induksi tunas secara langsung.
3. Sebagai langkah awal propagasi limau kue' (*Citrus sp*) secara *in vitro*, sehingga kekayaan genetik limau kue' tetap lestari adanya.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan alat

Eksplan yang digunakan adalah hipokotil, epikotil dan kotiledon limau kue'. Media yang digunakan adalah media dasar MS padat dengan penambahan zat pengatur tumbuh NAA 2,5 ppm, BAP 0,1 ppm dan ekstrak malt sesuai perlakuan. Bahan lain adalah akuades, aluminium foil, cloroC, alkohol 70 %, Na Cl, Na OH, kertas label dan parafilm.

Alat yang digunakan : Neraca analitik, gelas ukur, pH meter, magnetic stirer dengan pemanas, Laminar air flow (LAF), autoclave, botol kultur, dissecting set, lampu fluoresence dan sprayer.

Cara Kerja

Tahap penelitian ini meliputi : Pembuatan media, persiapan sumber eksplan dan penanaman eksplan serta pemeliharaan kultur. Masing-masing perlakuan dicobakan pada eksplan hipokotil, epikotil dan kotiledon.

Rancangan percobaan

Rancangan percobaan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan 6 perlakuan percobaan penambahan ekstrak malt (0, 100, 150, 200, 250 dan 300 mg/L) masing-masing perlakuan diulang sebanyak 2 kali.

Analisis data

Parameter yang diamati meliputi: waktu tumbuh tunas (hari) dan tinggi tunas (mm). Data yang diperoleh dianalisis secara statistik untuk mengetahui apakah perlakuan yang dicobakan berpengaruh pada parameter yang diukur digunakan analisis sidik ragam (ANOVA), apabila hasilnya signifikan dilanjutkan dengan uji lanjut dengan uji wilayah berganda Duncan (DMRT)

Waktu dan tempat penelitian

- a. Penelitian ini dilakukan pada bulan April s/d Desember 1999
- b. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan

Bioteknologi Jurusan Biologi
FMIPA Unsri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pengamatan, diperoleh bahwa dari ketiga jenis eksplan, yaitu hipokotil, epikotil dan kotiledon yang berasal dari kecambah steril biji jeruk / limau kue' (*Citrus* sp) menunjukkan pertumbuhan dan perkembangan dengan baik. Hal ini disebabkan bahwa jaringan tanaman yang digunakan sebagai eksplan, terdiri dari sel-sel yang masih aktif melakukan pembelahan dan diferensiasi sel, sehingga keberhasilan dari kultur jaringan akan besar.

Dari eksplan hipokotil dan kotiledon tumbuh kalus, sedangkan yang berhasil diinduksi pertunasannya adalah yang berasal dari epikotil. Hal ini diduga disebabkan oleh perbedaan posisi / letak atau topofisiologi dari eksplan yang dipergunakan, yang mana menyebabkan adanya perbedaan kandungan zat pengatur tumbuh endogen. Walaupun zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dari luar (secara eksogen) seragam, akhirnya akan terakumulasi, menimbulkan rasio zpt yang berbeda. Perbedaan rasio ini menyebabkan bentuk pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang berbeda pula.

Pada jaringan hipokotil dan kotiledon arah perkembangannya baru pada tahap pembelahan sel atau perbanyakkan sel tanpa mengalami diferensiasi (berupa kalus). Jadi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan yaitu NAA 2,5 ppm dan BAP 0,1 ppm serta ekstrak malt pada semua perlakuan (0; 100; 150; 200; 250 dan 300 mg/L), memacu tumbuhnya kalus. Auksin yang terakumulasi pada eksplan masih tinggi dibandingkan dengan sitokinin. Auksin akan memacu pembesaran dan pembelahan sel, kemudian bila berinteraksi dengan sitokinin pada konsentrasi rendah, maka akan terjadi pembelahan sel. Fungsi auksin dalam proses tersebut adalah membebaskan DNA dari histon sehingga DNA dapat membentuk RNA untuk melakukan sintesis protein. Wattimena (1988) menyatakan bahwa sitokinin berperan dalam merangsang pembelahan sel. Sitokinin akan berperan pada tingkat transkripsi dan translasi, dimana pada transkripsi adalah pada pembentukan mRNA dan pada tingkat translasi sitokinin berinteraksi dengan molekul mRNA, rRNA, tRNA dan mempengaruhi sintesis protein. Dengan demikian auksin terbukti dapat mengaktifkan sintesis RNA yang akan merangsang aktifitas protein dan enzim

apabila ditambahkan dengan golongan yang dapat menyebabkan pembelahan sel.

Kombinasi perbandingan antara auksin dan sitokinin menentukan keberhasilan dalam kultur jaringan. Pada metode Mohr, bila konsentrasi auksin lebih tinggi dari sitokinin akan menumbuhkan akar (Hendaryono dan Wijayani, 1994), sebaliknya menurut George dan Sherington (1984) bila konsentrasi sitokinin yang tinggi dapat menumbuhkan tunas. Ratio konsentrasi sitokinin dan auksin yang tidak berbeda jauh (3:2 atau 2:3) dapat menumbuhkan akar dan tunas.

Pada eksplan epikotil ternyata dari semua perlakuan yaitu penambahan ekstrak malt 0, 100, 150, 200, 250 dan 300 mg/L bisa menginduksi terjadinya tunas. Epikotil mempunyai kandungan auksin endogen yang paling tinggi, walaupun demikian ratio auksin dan sitokinin yang ada pada eksplan merupakan ratio yang paling cocok untuk induksi tunas secara langsung.

Tumbuhnya tunas pada epikotil dan jaringan kecambah, selain disebabkan oleh perimbangan zpt yang ada dan penambahan ekstrak malt, diduga walaupun auksinnya juga tinggi seperti halnya pada hipokotil maupun kotiledon, tetapi pada epikotil terdapat primordia tunas. Adanya primordia tunas pada epikotil ini, kemudian didukung

dengan kondisi yang sesuai (zpt + nutrien + lingkungan) maka akan mendorong primordia ini untuk tumbuh menjadi tunas.

Dari hasil Analisis Sidik Ragam, ternyata perlakuan penambahan ekstrak malt berpengaruh sangat nyata terhadap waktu munculnya tunas. Hal ini dapat dilihat bahwa F hitung lebih besar dari F tabel (lampiran -1).

Jadi kehadiran ekstrak malt disini, bisa mempercepat munculnya tunas dari jaringan epikotil. Fenomena ini disebabkan karena kompleknya komponen dari ekstrak malt yang cukup lengkap, yaitu karbohidrat, protein, nitrogen dan zat pengatur tumbuh, yaitu zeatin yang termasuk golongan sitokinin. Dilihat dari komponen tersebut yang masing-masing mempunyai fungsi penting, seperti karbohidrat yang merupakan sumber energi bagi berlangsungnya metabolisme sel. Pada kultur jaringan kehadiran karbohidrat ini sangat penting, karena pada kondisi *in vitro* eksplan belum bisa menghasilkan sumber energi, karena tidak bisa melakukan proses fotosintesis. Pieric (1987) menyatakan bahwa dalam kultur jaringan diperlukan suplai karbon sebagai sumber energi bagi pertumbuhan eksplan jika kondisi tumbuh tidak memungkinkan diperolehnya CO₂ dalam jumlah yang cukup. George dan

Sherington (1984) memperkuat untuk memperoleh laju pertumbuhan yang cukup perlu penambahan sumber energi pada media.

Zeatin yang merupakan komponen pada ekstrak malt merupakan sitokinin yang aktif sehingga dengan penambahan zat pengatur tumbuh eksogen (NAA 2,5 ppm dan BAP 0,1 ppm) dan ekstrak malt, akan menyebabkan adanya ratio auksin dan sitokinin yang memacu tumbuhnya tunas.

Hasil uji lanjut DMRT terhadap waktu munculnya tunas dan panjang tunas disajikan dalam tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 : Pengaruh penambahan ekstrak malt terhadap waktu muncul tunas (hari) dan tinggi tunas (mm) pada kultur epikotil limau kue' (*Citrus sp*).

Perlakuan(Penam bahan ekstrak malt)	Rata-rata waktu munculnya tunas (hari)	Rata-rata tinggi tunas (mm)
M 0=tanpa ekstrak malt	60,5 ^{ab}	2,5 ^a
M 1=100 mg/L	12,0 ^c	16,95 ^{de}
M 2= 150 mg/L	6,5 ^c	28,9 ^f
M 3= 200 mg/L	16,5 ^{cd}	13,5 ^c
M 4= 250 mg/L	12,0 ^c	21,97 ^d
M 5= 300 mg/L	58,0 ^a	3,65 ^{ab}

Pada tabel 1 di atas terlihat bahwa perlakuan yang paling baik adalah pada M2 (penambahan ekstrak malt 150 mg/L),

karena mampu menginduksi munculnya tunas hanya dalam waktu 6,5 hari setelah penanaman eksplan dengan panjang tunas 28,9 mm. Pada penambahan ekstrak malt 300 mg/L dan tanpa penambahan ekstrak malt, waktu munculnya tunas paling lama yaitu kurang lebih 60 hari dengan panjang tunas 2,5 dan 3,65 mm. Sedangkan pada penambahan ekstrak malt 100, 200 dan 250 mg/L mampu menginduksi tunas rata-rata 13,6 hari (2 minggu) setelah penanaman dengan panjang tunas 17,4 mm.

Fenomena tersebut menunjukkan bahwa kebutuhan baik nutrisi maupun zat pengatur tumbuh untuk masing-masing organ tanaman, dalam hal ini pada epikotil adalah khas, tidak boleh lebih atau kurang. Dari hasil penelitian terlihat bahwa tanpa penambahan ekstrak malt ataupun dengan penambahan ekstrak malt 300 mg/L, menghasilkan waktu muncul tunas maupun panjang tunas yang kurang baik dibanding perlakuan yang lain. Pada perlakuan tanpa penambahan ekstrak malt pada media, berarti suplai karbon, sumber nitrogen dan zeatin lebih kecil dibandingkan dengan yang lain. Hal ini berarti nutrisi maupun zat pengatur tumbuh yang disediakan belum mencukupi kebutuhan eksplan, sehingga menghasilkan tingkat pertumbuhan yang paling lambat. Sebaliknya pada

penambahan ekstrak malt 300 ppm/L, merupakan perlakuan konsentrasi yang sudah melampaui batas maksimum kebutuhan eksplan, baik nutrisi maupun zat pengatur tumbuh. Hal ini menyebabkan mulai terjadinya hambatan-hambatan pertumbuhan dan perkembangan, diduga kejadian ini disebabkan mulai bekerjanya enzim umpan balik (feed back) yang justru menghambat perubahan substrat menjadi produk, akibat menumpuknya penimbunan produk akhir (over produksi).

Faktor lain yang menyebabkan terhambatnya pertumbuhan eksplan pada penambahan ekstrak malt 300 mg/L adalah terhambatnya penyerapan nutrisi sel-sel pada jaringan eksplan akibat gangguan osmotik. Ekstrak malt sebagian besar terdiri dari karbohidrat yang tersusun oleh heksosa, maltosa, glukosa, sukrosa dan dekstrin yang kesemuanya merupakan zat-zat osmotikum yang bisa mempengaruhi tekanan turgor sel. Dengan semakin banyaknya ekstrak malt maka tekanan turgor pada sel akan mendekati keadaan hipertonis yang mengakibatkan hambatan pada penyerapan sel. Pieric (1987) menyatakan bahwa pemberian sumber karbon yang lebih banyak akan menyediakan sumber energi yang lebih banyak pula. Walaupun demikian

pemberian pada konsentrasi yang terlalu tinggi (melebihi batas optimum) akan menyebabkan menurunnya laju pertumbuhan dan perkembangan.

Hasil yang terbaik diperoleh dari perlakuan penambahan ekstrak malt 150 mg/L. Pada perlakuan ini berarti suplai nutrisi maupun zpt dari ekstrak malt berada pada konsentrasi yang paling tepat. Eksplan tidak mengalami kekurangan maupun sebaliknya tidak terlalu berlebihan. Pada penambahan ekstrak malt 150 mg/L, kebutuhan ATP bisa disuplai dengan baik melalui jalur glikolisis dari karbohidrat yang berasal dari ekstrak malt. Salisbury dan Ross (1992) menyatakan bahwa satu molekul glukosa atau fruktosa dapat menghasilkan 38 ATP sebagai sumber energi.

Selain sumber karbon, karbohidrat dalam ekstrak malt juga merupakan sumber hidrogen dan oksigen (Staba,1982), yang akan menjamin berlangsungnya transport nutrisi, reaksi-reaksi enzimatis metabolisme dan transport kimia menjadi lebih lancar. Lehninger (1993) menyatakan bahwa reaksi metabolisme akan berlangsung pada media yang menjamin berlangsungnya transport nutrisi, transport kimia dll. Ini merupakan salah satu fungsi dari H_2O sehingga reaksi-reaksi

metabolisme dapat berjalan dengan lancar. H_2O dan produk ionisasi yaitu H^+ dan OH^- sangat mempengaruhi sifat berbagai komponen penting sel, seperti enzim, protein, asam nukleat dan lemak. Pada aktivitas protein misalnya katabolik enzim, keberadaan ion H^+ dan OH^- berperan sebagai pengatur pH sel. Enzim merupakan protein yang sensitif, yang memerlukan kondisi suhu dan pH yang sesuai untuk meningkatkan laju enzimatis.

Konsentrasi ekstrak malt 150 mg/L memungkinkan juga tersuplainya zat pengatur tumbuh sitokinin (yang berasal dari zeatin), yang menyebabkan sitokinin lebih tinggi dari auksin yang ada pada eksplan. Dengan tingginya kandungan sitokinin telah memacu tumbuhnya primordia tunas menjadi tunas. Pieriek (1987) dan Bhojwani dan Razdan (1983) menegaskan bahwa ratio konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi dari pada auksin diperlukan untuk membentuk tunas-tunas pada eksplan.

Pada perlakuan ekstrak malt 200, 250 dan 300 mg/L menghasilkan panjang tunas yang lebih pendek dan waktu munculnya tunas yang lebih lama dibanding dengan penambahan ekstrak malt 150 mg/L. Salah satu penyebabnya adalah kurang tepatnya suplai sitokinin pada eksplan. Dalam hal ini

sitokinin terlalu tinggi dari auksin, sudah mulai menyebabkan hambatan pertumbuhan. Isbandi (1992) menyatakan bahwa zat pengatur tumbuh tidak hanya merangsang pertumbuhan tetapi pemakaian zat pengatur tumbuh yang kurang tepat akan menyebabkan hambatan mandiri atau "self inhibitor" karena pengikatan molekul-molekul yang berbeda pada daerah pengikatan atau kedua molekul saling bersaing dalam pengikatan ("Self competition Reaction").

Penambahan ekstrak malt 100 mg/L, kurang mencukupi suplai kebutuhan energi dan juga zat pengatur tumbuh belum berfungsi untuk mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Zat pengatur tumbuh yang konsentrasinya rendah akan mengurangi keaktifan dari zat pengatur tumbuh tersebut

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sbb :

1. Konsentrasi ekstrak malt 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 250 mg/L dan 300 mg/L belum mampu menginduksi tunas pada eksplan kotiledon dan hipokotil, tetapi dapat menginduksi tumbuhnya kalus.

2. Pada eksplan epikotil, berhasil diinduksi tumbuhnya tunas. Perlakuan yang terbaik adalah penambahan ekstrak malt 150 mg/L, mampu memacu tumbuhnya tunas 6,5 hari dengan panjang tunas 28,9 mm.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan, yaitu menginduksi tumbuhnya akar pada tunas yang diperoleh secara in vitro, sehingga bisa didapatkan plantlet (plantula).

DAFTAR PUSTAKA

- Bhojwani, S S & Razdan M K. 1983. Plant Tissue Culture. Elsevier Science Publiser Netherland.
- Button, J & Kochba, J. 1977. Tissue Culture in The Citrus Industry dalam YPS Bajaj dan Reinert. Applied and Fundamental Aspect of Plant Cell Tissue and Organ Culture. Publishing House. New Delhi.
- Creuger, W & A Creuger. 1989. Biotechnology. Sunderland. USA.
- Donnelly, D J & W E Vidaven. 1988. Glossary of Plant Tissue Culture. Belhaven Press. London.
- Fritz, G J & E R Noggle. 1983. Plant Physiology. Prentice Inc. New Jersey.

- George E F & P D Sherington. 1984. Plant Propagation By Tissue Culture. Hand Book and Directory of Commercial Laboratories. Eversley. England.
- Gunawan. L W. 1995. Teknik Kultur In vitro Dalam Holtikultura. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Hendaryono, D P S; Wijayani A. 1994. Teknik Kultur Jaringan. Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman Secara Vegetatif Modern. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Heyne, K. 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid II (Terjemahan) Badan litbang Kehutanan. Jakarta.
- Isbandi D. 1989. Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman. Jurusan Budidaya Pertanian. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Lehninger. 1993. Dasar-dasar Biokimia I. Thana Wijaya (Penerjemah). Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Pierick, R L M. 1987. In Vitro Cultur of Higher Plants. Martines Nijhoff Publishers. Netherland.
- Salisbury P E & C W Ross. 1992. Plant Physiology. Wadsworth Inc. Belmont. California.
- Sarwono. 1986. Jeruk dan Kerabatnya. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Semangun, H. 1991. Penyakit-penyakit Tanaman Holtikultural di Indonesia. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Soejono S, Djahuri E, Widowati A. 1988. Perbanyak jeruk secara in Vitro. Dalam Bul. Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Holtikultura. Jakarta.
- Soeryowinoto M. 1990. Budidaya Jaringan dan Manfaatnya. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Staba, J. 1982. Plant Tissue Culture As A Source of Biochemicals. C R C press Florida.
- Tjotrosoepomo, G. 1989. Taksonomi Tumbuhan. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Wareing P F & D J Philips. 1991. The Control of Growth and Differentiation in Plant. Pergamon Press. Oxford England.
- Wattimena, G A. 1988. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman. P A U Bioteknologi IPB. Bogor.

Lampiran 1

Analisis statistik pengaruh ekstrak malt terhadap waktu tumbuh tunas dan panjang tunas epikotil yang dikultur secara in vitro.

2.1. Analisis statistik pengaruh ekstrak malt terhadap waktu tumbuh tunas dari epikotil Limau Kue' yang dikultur secara in vitro.

Sumber keragaman	b	JK	KT	F hitung	F tabel	
					0,01	0,05
Perlakuan		5088,90	1017,78	121,165**	2,51	3,71
Galat		42,00	8,4			
Total	0	5130,90				

2.2. Analisis statistik pengaruh ekstrak malt terhadap tinggi tunas dari epikotil limau kue' yang dikultur secara in vitro.

Sumber keragaman	b	JK	KT	F hitung	F tabel	
					0,01	0,05
Perlakuan		1063,69	212,73	118,895**	2,51	3,71
Galat		10,73	1,789			
Total	0	1074,43				

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata.