Jurnal Produksi Tanaman
Vol. 6 No. 1, Januari 2018: 154 - 160
ISSN: 2527-8452

SLOW GROWTH JERUK CITRUMELO (*Citrus paradisi* Macfaden cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) DALAM KONDISI *IN VITRO* : PENGARUH TIPE DAN KONSENTRASI SUMBER KARBON

SLOW GROWTH OF CITRUMELO (*Citrus paradisi* Macfaden cv. Duncan x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) IN IN VITRO CONDITION AFFECTED BY TYPE AND CONCENTRATION OF CARBON SOURCE

Fitriani Rohmatun Nufus[1*)], Darmawan Saptadi[1)] dan Farida Yulianti[2)]

[1)]Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Malang 65145 Jawa Timur, Indonesia
[2)]Balai Penelitian Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro)
Jl. Raya Tlekung No. 1 Tlekung, Junrejo, Kota Batu 65301 Jawa Timur
[*)]E-mail : fitrianirohma@gmail.com

ABSTRAK

Citrumelo merupakan jeruk hasil persilangan antara *Citrus paradisi* Macf. dengan *Poncirus trifoliata* L. Raf. Jeruk citrumelo memiliki banyak keunggulan. Sifat unggul citrumelo merupakan sumber keragaman genetik yang perlu dikonservasi. Konservasi *in vitro* merupakan salah satu teknik konservasi *ex-situ* yang dapat digunakan. Tujuan konservasi secara *in vitro,* salah satunya adalah untuk memperlambat pertumbuhan (*slow gowth*). Faktor penyebab *slow gowth* salah satunya adalah pengaturan konsentrasi dan jenis sumber karbon yang *slow release*. Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan efektifitas penggunaan sumber karbon dalam mendukung konservasi citrumelo secara *in vitro* serta mendapatkan jenis dan konsentrasi sumber karbon yang paling baik untuk mendukung *slow gowth.* Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Somatic Embryogenesis, Balitjestro, Batu, Malang, pada Bulan Desember 2015 hingga Maret 2016. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF). Faktor pertama yaitu sumber karbon dan faktor kedua yaitu konsentrasi sumber karbon. Variabel pengamatan yaitu, jumlah tunas, tinggi tunas (cm), bobot segar (mg) dan jumlah daun. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, berdasarkan uji ANOVA tidak terjadi interaksi antar perlakuan. Perlakuan glukosa + mannitol memberikan respon pertumbuhan yang paling lambat. Perlakuan glukosa + mannitol 10 – 30 gl^{-1} merupakan perlakuan terbaik dalam mendukung *slow growth* dan pertumbuhan eksplan tidak *stagnan*. Perlakuan ini mampu memperpanjang masa subkultur hingga 6 bulan dibandingkan perlakuan kontrol (sukrosa 30 gl^{-1}).

Kata kunci: Citrumelo, Konservasi, In vitro, *Slow Growth*, Sumber Karbon

ABSTRACT

Citrumelo is citrus variety resulted from crossing between *Citrus paradisi* Macf. and *Poncirus trifoliata* L. Raf. Citrumelo has many advantages. As superior germplasm and source of genetic diversity, citrumelo needs to be conserved. In vitro conservation is one of the ex-situ conservation techniques which can be used. The main objective of in vitro conservation is a slow growth. One of the important compound is carbon source. The objectives of the

research were to assess the effectiveness of carbon source and to get the best type and concentration of carbon sources for supporting slow growth of Citrumelo's shoot. Experiment has been conducted from December 2015 until March 2016 at laboratory of somatic embryogenesis, Balitjestro, Batu, Malang. This study used factorial completely randomized design with the first factor was type of carbon source and second factor was concentration of carbon source. Variable observed were shoots number, shoot height (cm), fresh weight (mg) and leaves number. The results showed that all treatments had not formed complete plantlets for 90 dap. ANOVA showed no interaction between the treatments. In this observation, glucose + mannitol 10 – 30 gl^{-1} is the best treatment to support citrumelo's shoot slow growth. the treatment caused increasing time of subculture periods until 6 months than the control treatment (sucrose 30 gl^{-1}).

Keywords: Citrumelo, Conservation, In vitro, Slow Growth, Carbon Source

PENDAHULUAN

Citrumelo merupakan jeruk hasil persilangan antara *Citrus paradisi* Macf. dengan *Poncirus trifoliata* L. Raf. Jeruk citrumelo biasa digunakan sebagai *interstock* atau *rootstock,* memiliki banyak keunggulan diantaranya toleran terhadap kekeringan, memiliki ketahanan menengah terhadap kondisi salinitas tinggi, toleran terhadap CTV (*Citrus Tristeza Virus*), CEV (*Citrus Exocortis Viroid*), Xylospora serta tahan terhadap nematoda jeruk dan phytopthora (Ray, 2002). Sifat unggul citrumelo merupakan salah satu sumber keragaman genetik yang perlu dikonservasi. Disisi lain, citrumelo memiliki biji rekalsitran. Perkecambahan biji lambat serta sulit untuk menentukan masa panen buah citrumelo, sehingga akan sulit jika dilakukan penyimpanan sumber genetik citrumelo dalam bentuk biji maupun penanaman dilahan. Konservasi *in vitro* merupakan salah satu teknik konservasi *ex-situ* yang dapat digunakan. Tujuan utama dalam konservasi secara *in vitro,* salah satunya adalah untuk memperlambat pertumbuhan (*slow gowth*) tanaman.

Faktor-faktor yang menyebabkan terjadinya *slow growth* adalah konsentrasi sumber karbon dan jenis sumber karbon yang *slow release*. Penggunaan sumber karbon dalam upaya konservasi jeruk telah dilakukan oleh Thorpe *et al.* (2008), yang menyatakan bahwa media terbaik yang digunakan dalam konservasi jeruk Pamelo adalah MS yang diperkaya dengan sukrosa. Penggunaan sorbitol sebagai sumber karbon dalam media juga terbukti mampu mendukung *slow gowth* dalam konservasi jeruk pamelo kultivar Srinyonya (Dewi *et al*., 2010). Penggunaan sumber karbon dalam mendukung *slow growth* pada jeruk citrumelo belum pernah dilakukan. Dalam penelitian ini, berbagai perlakuan digunakan untuk menentukan jenis dan konsentrasi sumber karbon yang memberikan respon *slow gowth* namun eksplan citrumelo didalamnya tetap hidup dalam kondisi yang baik.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Somatic Embryogenesis, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO), Batu, Malang pada Bulan Desember 2015 hingga Maret 2016. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial (RALF), terdiri dari 9 (sembilan) perlakuan dan diulang sebanyak 5 (lima) kali, sehingga terdapat 45 satuan percobaan. Setiap perlakuan dalam satu ulangan terdapat 1 botol kultur yang ditanam 5 eksplan *binodule* (ruas) di dalamnya. Faktor pertama jenis sumber karbon yaitu, Sukrosa (S), Glukosa + Manitol (GM), dan Glukosa + Sorbitol (GS). Faktor kedua berupa konsentrasi sumber karbon yaitu 10 gl^{-1}, 20 gl^{-1}, dan 30 gl^{-1}. Pengamatan dilakukan 3 minggu sekali selama 3 bulan. Variabel yang diamati ialah jumlah tunas, tinggi tunas (cm), bobot segar (mg) dan jumlah daun.

Analisa data menggunakan analisis ragam (ANOVA), apabila terdapat pengaruh nyata dilanjutkan dengan uji perbandingan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf nyata 5%. Dilakukan perhitungan

***Jurnal Produksi Tanaman**, Volume 6 Nomor 1, Januari 2018, hlm. 154 – 160*

persentase penurunan pertumbuhan eksplan, dengan rumus (Tyas *et al.*, 2013):

$$\%\ PP = \left\{ \text{Nilai kontrol} - \left(\frac{\text{Nilai x}}{\text{Nilai kontrol}} \right) \right\} \times 100$$

Keterangan,

% PP	:	Persentase Penurunan Pertumbuhan
Nilai Kontrol	:	Nilai pertumbuhan variabel pengamatan pada perlakuan sukrosa 30 gl^{-1} (kontrol).
Nilai x	:	Nilai pertumbuhan variabel pengamatan pada perlakuan non kontrol.

Rata-rata laju pertumbuhan, dengan rumus (Totok dan Rahayu, 2004):

$$\ddot{x}\ LP = \frac{\text{Nilai Pertumbuhan t1} - \text{Nilai Pertumbuhan t0}}{\text{jumlah hari (t)}}$$

Perhitungan periode subkultur terhadap perlakuan yang paling efektif, dengan rumus:

$$\text{Periode subkultur} = \left[\frac{\text{P x}}{\text{P kontrol}} \text{ x PS.kontrol} \right] + \text{PS. kontrol}$$

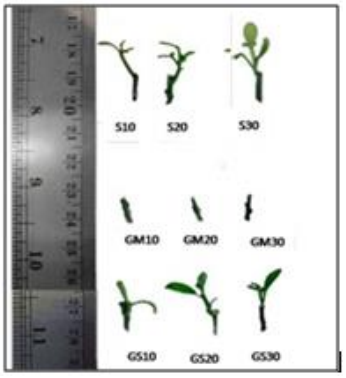
Keterangan,

PS	:	Periode subkultur (Bulan / bl)
P. kontrol	:	Persentase kemampuan pertumbuhan kontrol (100%)
P. x	:	kemampuan pertumbuhan eksplan dalam sumber karbon non kontrol (%)
PS. Kontrol	:	90 hari (eksplan citrumelo dalam perlakuan kontrol telah mencapai grafik stasioner)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kondisi Umum Eksplan 90 hst

Ekplan pada semua perlakuan bertahan selama 90 hst dan belum membentuk plantlet secara sempurna. Semua perlakuan menunjukkan eksplan yang ditanam belum membentuk akar. Enam dari sembilan kombinasi perlakuan yaitu sukrosa dan glukosa + sorbitol pada semua konsentrasi menunjukkan eksplan yang ditanam telah membentuk daun. Glukosa + mannitol pada semua konsentrasi belum membentuk daun, namun eksplan-eksplan tersebut telah membentuk tunas. Penampilan eksplan saat 90 hst dapat dilihat pada Gambar 1



Gambar 1 Kondisi eksplan 90 hst berurutan dari kiri ke kanan adalah sukrosa, glukosa + sorbitol dan glukosa + mannitol. Berurutan dari atas ke bawah adalah konsentrasi 10 gl^{-1}, konsentrasi 20 gl^{-1} dan konsentrasi 30 gl^{-1}.

Bobot Segar Tunas

Hasil uji ANOVA pada semua variabel pengamatan menunjukkan tidak ada interaksi antar perlakuan. Pengaruh nyata hanya terjadi pada perlakuan sumber karbon.

Tabel 1 Pengaruh Jenis Sumber Karbon terhadap Bobot Segar Tunas Citrumelo pada Umur 90 hst

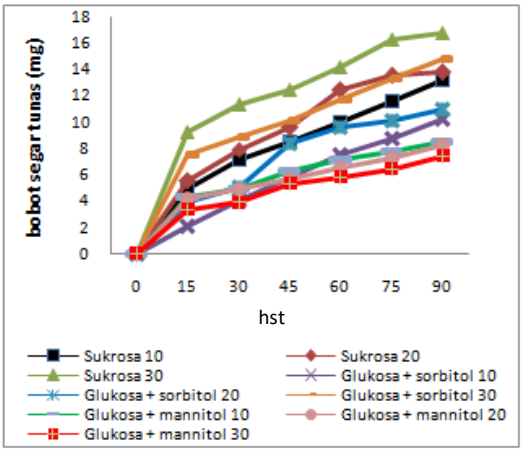
Perlakuan	BS (mg)
Sukrosa (Glukosa + Fruktosa)	14,52 b
Glukosa + Sorbitol	11,96 ab
Glukosa + Mannitol	7,99 a
KK	**28,12 %**

Keterangan : Angka yang diikuti huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji DMRT taraf 5%.

Tabel 1 menunjukkan, rerata bobot segar tunas pada sumber karbon sukrosa

lebih besar (14,52 mg) dibandingkan sumber karbon glukosa + sorbitol (11,96 mg) dan glukosa + mannitol (7,99 mg). Hal ini dikarenakan, sukrosa merupakan salah satu jenis gula yang mudah diuraikan. Jenis gula demikian akan lebih mudah diserap oleh sel tanaman sehingga sangat mendukung pertumbuhan kultur (Da Silva, 2004).

Gambar 2 menunjukkan adanya respon yang berbeda pada konsentrasi yang berbeda pada setiap sumber karbon. Sukrosa 20 gl^{-1} dan sukrosa 30 gl^{-1} sudah menunjukkan fase stasioner pada umur 75 hst, sedangkan perlakuan sukrosa 10 gl^{-1} pertumbuhan bobot segar masih meningkat. Artinya, energi dalam media sukrosa 20 gl^{-1} dan Sukrosa 30 gl^{-1} sudah tidak mampu mendukung pertumbuhan bobot segar eksplan, sehingga perlu dilakukan subkultur pada 90 hst. Pada perlakuan glukosa + sorbitol dan glukosa + mannitol, terlihat bahwa eksplan masih menunjukkan pertumbuan bobot segar yang meningkat hingga 90 hst. Pertumbuhan bobot segar glukosa mannitol lebih rendah dibanding pertumbuhan bobot segar sukrosa dan glukosa + sorbitol.



Gambar 2 Pertumbuhan Bobot Segar Tunas pada Masing-masing Perlakuan Selama Waktu Pengamatan.

Tinggi Tunas Utama

Rerata tinggi tunas utama pada sumber karbon sukrosa lebih besar dibandingkan sumber karbon glukosa + sorbitol dan glukosa + mannitol (Tabel 2). Penggunaan sorbitol dan mannitol sebagai sumber karbon menyebabkan pertumbuhan eksplan lambat dibandingkan dengan penggunaan sukrosa. Namun pertumbuhan eksplan dengan penggunaan sorbitol lebih tinggi dibanding perlakuan mannitol.

Pengaturan konsentrasi sukrosa menyebabkan perlambatan pertumbuhan eksplan. Keadaan demikian ditandai dengan eksplan sukrosa pada konsentrasi 10 gl^{-1} dan 20 gl^{-1} yang lebih pendek dibanding dengan sukrosa 30 gl^{-1} (kontrol). Semakin tinggi konsentrasi sukrosa, memberikan kecenderungan pertumbuhan tinggi tunas yang semakin meningkat demikian pula dengan perlakuan glukosa + sorbitol. Hal ini sesuai dengan penelitian Adjei (2001), yang menyatakan bahwa semakin rendah konsentrasi penggunaan sukrosa pada media kultur, mampu memperlambat pembentukan jumlah tunas dan tinggi tunas. Keadaan sebaliknya ditunjukkan pada perlakuan glukosa + mannitol. Penelitian Charoensub dan Phansiri (2004), pada *Plumbago indica* menunjukkan perlakuan mannitol 20 gl^{-1} – 60 gl^{-1} sangat berpengaruh pada pengurangan tinggi eksplan sampai 93,3%. Pada penelitian ini pengurangan tinggi tunas citrumelo dengan dengan konsentrasi 10 – 30 gl^{-1} berkisar antara 7,58 – 8,75% (Tabel 6).

Tabel 2 Pengaruh Jenis Sumber Karbon terhadap Tinggi Tunas Utama Citrumelo pada Umur 90 hst

Perlakuan	TT (cm)
Sukrosa (Glukosa + Fruktosa)	1,195 b
Glukosa + Sorbitol	1,147 ab
Glukosa + Mannitol	1,097 a
KK	**5,21 %**

Keterangan : Angka yang diikuti huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji DMRT taraf 5%.

Rata-rata laju pertumbuhan eksplan selama 90 hst dapat dilihat pada Tabel 3. Laju pertumbuhan tinggi tunas paling besar yaitu 0,023 cm/hari yang ditunjukkan oleh perlakuan sukrosa 30 gl^{-1}, sedangkan laju pertumbuhan terkecil yaitu 0,0009 cm/hari yang ditunjukkan oleh perlakuan glukosa + mannitol 20 gl^{-1} dan 30 gl^{-1}. Selaras dengan

***Jurnal Produksi Tanaman**, Volume 6 Nomor 1, Januari 2018, hlm. 154 – 160*

Tabel 3 Laju Pertumbuhan Eksplan pada Jenis dan Konsentrasi Sumber Karbon Berbeda selama 9 hst

Perlakuan (gl^{-1})	BS (mg)	TT (cm)	JT	JD
S 10	0,12	0,0014	0,014	0,009
S 20	0,13	0,0019	0,015	0,013
S 30	0,16	0,0023	0,017	0,013
GS 10	0,10	0,0012	0,012	0,000
GS 20	0,10	0,0013	0,009	0,008
GS 30	0,14	0,0017	0,012	0,006
GM 10	0,08	0,0010	0,009	0,000
GM 20	0,08	0,0009	0,007	0,000
GM 30	0,07	0,0009	0,002	0,000

penelitian Dewi (2014), yang menyatakan bahwa pemberian mannitol tampak mengalami penghambatan terutama mulai terlihat pada konsentrasi 20 gl^{-1}, sebab mannitol mempunyai peran sebagai regulator osmotik yang mana semakin tinggi konsentrasi tentu akan semakin terbatas. pasokan air dan nutrisi pada eksplan dan hal ini menyebabkan viabilitas eksplan terus menurun.

Jumlah Tunas baru

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan sukrosa menghasilkan pertumbuhan jumlah tunas baru yang lebih baik dibanding dua sumber karbon lain. Konsentrasi sukrosa 30 gl^{-1} menghasilkan jumlah tunas terbanyak. Hal ini disebabkan sukrosa merupakan sumber karbon dan energi yang paling baik dan dapat dimanfaatkan semua tanaman (Javed dan Ikram, 2008). Sukrosa dapat dimanfaatkan tanaman dalam bentuk aslinya yaitu disakarida, maupun dipecah menjadi monosakarida glukosa dan fruktosa oleh enzim intervase (Suskendriyati *et al.,* 2004).

Tabel 4 Pengaruh Jenis Sumber Karbon terhadap Jumlah Tunas Baru pada umur 90 hst

Perlakuan	JT
Sukrosa (Glukosa + Fruktosa)	1,448 b
Glukosa + Sorbitol	1,273 ab
Glukosa + Mannitol	1,051 a
KK	**13,63 %**

Keterangan : Angka yang diikuti huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji DMRT taraf 5%.

Jumlah daun

Tabel 5 menunjukkan bahwa perlakuan sukrosa berbeda nyata terhadap perlakuan glukosa + mannitol dan glukosa + sorbitol. Sedangkan perlakuan glukosa + mannitol tidak berbeda nyata dengan

perlakuan glukosa + sorbitol. Rerata jumlah tunas baru pada sumber karbon sukrosa lebih besar dibandingkan sumber karbon glukosa + sorbitol dan glukosa + mannitol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan mannitol menyebabkan pertumbuhan kultur yang sangat lambat, sehingga belum membentuk daun hingga akhir pengamatan. Diduga bahwa pemberian manitol sebagai sumber karbon belum cukup mendukung pertumbuhan daun selama 90 hst (Tabel 6). Dewi (2014), menggunakan mannitol taraf 0 gl^{-1}, 20 gl^{-1}, 40 gl^{-1} dan 60 gl^{-1} menunjukkan bahwa jeruk pamelo yang dibiakkan tidak membentuk daun selama masa pengamatan 3 bulan.

Tabel 5 Pengaruh Jenis Sumber Karbon terhadap Jumlah Daun Citrumelo pada Umur 90 hst

Perlakuan	JD
Sukrosa (Glukosa + Fruktosa)	1,311 b
Glukosa + Sorbitol	0,903 a
Glukosa + Mannitol	0,728 a
KK	**18,30 %**

Keterangan : Angka yang diikuti huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji DMRT taraf 5%.

Tabel 6 Persentase Penurunan Pertumbuhan Citrumelo pada Jenis dan Konsentrasi Sumber Karbon yang Berbeda pada Umur 90 hst

Perlakuan	BS (mg)	TT (cm)	JT	JD
	.....Penurunan Pertumbuhan (%).....			
S 10	-31,14	-5,62	-33,06	-40,51
S 20	-21,87	-2,92	-6,61	-5,06
S 30 (kontrol)	0	0	0	0
GS 10	-52,36	-6,93	-79,34	-91.14
GS 20	-40,32	-6,77	-65,29	-82,28
GS 30	-17,47	-5,28	-23,14	-64,56
GM 10	-51,67	-7,58	-64,46	-100
GM 20	-54,14	-8,48	-69,42	-100
GM 30	-59,89	-8,74	-92,56	-100

Keterangan : Tanda (-) menunjukkan pertumbuhan menurun dalam %.

Perlakuan sorbitol mampu tumbuh lebih baik dibanding mannitol, sebab sorbitol mampu diubah menjadi monosakarida yang lebih mudah diserap oleh tanaman lain yaitu fruktosa, sedangkan mannitol diubah menjadi manosa. Penyerapan manosa oleh tanaman lebih sulit dibanding penyerapan fruktosa (Laisina, 2009). manosa akan diserap oleh tanaman setelah dihidrolisis menjadi fruktosa. Pada perlakuan glukosa + mannitol menunjukkan bahwa pertumbuhan pada perlakuan tersebut paling rendah dibanding dua jenis sumber karbon lain. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka pertumbuhan semakin lambat, respon serupa terjadi pada eksplan jeruk pamelo (Dewi,2014). Hal ini dikarenakan, mannitol merupakan gula alkohol yang berperan sebagai regulator osmotik pada taraf yang tinggi. Sebagai regulator osmotik, manitol dapat meningkatkan osmolaritas media atau potensial osmotik media sehingga nutrisi yang mengalir ke dalam jaringan tanaman berjalan lambat. Lambatnya aliran nutrisi tersebut dapat menyebabkan penghambat-an terhadap pertumbuhan kultur (Dewi, 2014). Bahkan selama masa pengamatan, eksplan yang ditumbuhkan pada media yang mengandung mannitol belum mampu membentuk daun dan hanya sedikit membentuk tunas (Tabel 4). Hal ini sesuai dengan penelitian Da Silva (2004), yang menunjukkan bahwa penggunaan manitol menyebabkan pertumbuhan kultur yang sangat lambat sehingga hanya sebagian kecil kultur yang tumbuh membentuk daun baru. Selain itu, diduga mannitol endogen pada eksplan hanya tersedia dalam jumlah yang sedikit. Sedangkan mannitol eksogen yang diberikan tidak mampu dipecah dengan baik menjadi bentuk yang tersedia bagi tanaman, sehingga tanaman tumbuh dengan lambat (Kadota *et al.,* 2001). Mannitol mampu dipecah menjadi monosakarida manosa oleh enzim *mannose -6-phosphate reductase* (Loescher,1987). Sumber karbon dalam bentuk manosa kurang efektif mendukung pertumbuhan eksplan (Laisina, 2009).

Tabel 6 menunjukkan bahwa terjadi penurunan pertumbuhan pada semua perlakuan yang bernilai negatif terhadap kontrol (sukrosa 30 gl^{-1}). Penurunan pembentukan daun terbesar terjadi pada perlakuan glukosa + mannitol, yaitu sebesar 100% yang artinya perlakuan tersebut belum membentuk daun. Secara visual eksplan pada perlakuan glukosa + mannitol 30 gl^{-1} terlihat seperti kondisi pada awal tanam.

KESIMPULAN

Penggunaan sumber karbon dan pengaturan konsentrasinya efektif dalam mendukung *slow growth* citrumelo sebagai upaya konservasi *in vitro*. Penurunan konsentrasi sukrosa dan glukosa + sorbitol dapat menghambat pertambahan bobot segar, jumlah tunas, jumlah daun dan tinggi tunas. Meningkatnya konsentrasi glukosa + mannitol menurunkan bobot segar, jumlah tunas, jumlah daun dan tinggi tunas. Glukosa + mannitol 10 – 30 gl^{-1} diketahui dapat digunakan dalam mendukung *slow growth* citrumelo secara efektif dalam penelitian ini. Perlakuan ini mampu

memperpanjang masa subkultur hingga 6 bulan dibandingkan perlakuan kontrol (sukrosa 30 gl^{-1}).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Balitjestro (Balai Penelitian Jeruk dan Buah Subtropika), Malang atas kerjasamanya dalam memfasilitasi tempat dan materi penelitian yang diberikan kepada penulis.

DAFTAR PUSTAKA

Adjei, P.Y. 2001. Effect of Carbon Source (Sucrose) on The Morphogenesis of Pineapple (Ananas comosus L. Merr) Cultured In Vitro. Departement of Holticulture. *Journal of the Kwame Nkrumah University of Science and Technology*. Kumasi. Ghana. 21(1): 29-32.

Chaorensub, R., S. Phansiri. 2004. In vitro conservation of rose coloured leadwort: Effect of mannitol on growth of plantlets. *Journal of Natural Science*. 38(5): 97-102.

Da Silva, J.A.T. 2004. The Effect of Carbon Source on In Vitro Organogenesis of Chrysanthemum Thin Cell Layers. *Bragantia, Campinas*. 2(63):165-177.

Dewi, I.S., Gani J., Ika R., M. Sabda., Bambang S.P., Widianti H.A. 2010. Konservasi In Vitro Tanaman Jeruk Besar (Citrus maxima (Burm) Merr.) Kultivar Srinyonya Menggunakan Osmotikum dan Retardan. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. *Jurnal Agrobiogen.* 6(2):84-90.

Dewi, I.S., Gani S.J., Bambang S.P., dan M. Sabda. 2014. Respon Pertumbuhan Kultur In Vitro Jeruk Besar (Citrus maxima (Burm.) Merr.) cv. Nambangan terhadap Osmotikum dan Retardan. *Jurnal Hortikulturan Indonesia.* 5(1):21-28.

Javed, F., S. Ikram. 2008. Effect of sucrose induced osmotic stress on callus growth and biochemical aspect of two wheat genotypes. *Pakistan Journal of Botany*. 40(4):1487-1495.

Kadota, M., K. Imizu and T.Hiranu. 2001. Double phase In vitroculture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. *Scientia Horticulturae*. 89(3): 207-215.

Laisina, J.K. 2009. Pelestarian Secara In Vitro Melalui Metode Pertumbuhan Minimal Pada Beberapa Genotipe Ubi Jalar (Ipomea batatas (L) Lam). Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Loescher, W.H. 1987. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiologia Plantarum*. 70(3):553-557.

Ray, P.K. 2002. Breeding Tropical and Subtropical Fruits. Associate Profesor. Departemen of Horticulture. Rajendra Agricultural University. India.

Suskendriyati, H., Solichatun, dan A.D. Setyawan. 2004. Pertumbuhan dan Poduksi Saponin Kultur Kalus Talinum paniculatum Gaertn. dengan Variasi Pemberian Karbon. *BioSmart* 6(1):19-23.

Thorpe, T., C. Stasolla, E.C. Yeung, G.J. de Klerk, A. Roberts, and E.F. George. 2008. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. The University of Calgary. Canada.

Totok, A.D.H., dan A.Y. Rahayu. 2004. Analisis Efisiensi Serapan N, Pertumbuhan, dan Hasil Be-berapa Kultivar Kedelai Unggul Baru dengan Cekaman Kekeringan dan Pemberian Pupuk Hayati. *Agrosains*. 6(2):70-74.

Tyas, K.N., Slamet S., Dewi I.S., dan Nurul K. 2013. Konservasi In VitroPamelo (Citrus maxima (Burm.) Merr.) melalui Pertumbuhan Lambat. Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor. *Jurnal Agronomi. Indonesia* 41(1):32-39.