

Perbanyakan tanaman kina *Cinchona ledgeriana* Moens. dan *C. succirubra* Pavon melalui penggandaan tunas aksiler

Propagation of cinchona plant Cinchona ledgeriana Moens. and C. succirubra Pavon through axillary buds multiplication

JOKO-SANTOSO¹⁾, Nurita TORUAN-MATHIUS²⁾, U. SASTRAPRAWIRA³⁾,
G. SURYATMANA³⁾ & D. SAODAH³⁾

¹⁾ Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung.

²⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia.

³⁾ Fakultas Pasca Sarjana, Universitas Padjadjaran, Bandung.

Summary

Cinchona ledgeriana (Ledger) and *C. succirubra* (Succi) were industrial commodities which their barks of the trunk contain alkaloid used as raw materials in pharmaceutical, food, drug and beverages and chemical industries. The problem faced in conventional plant propagation are incompatibilities, high numbers of death caused by transportation, limited numbers and time consume in plant materials production. These problems may be overcome by axillary buds multiplication. The aim of the experiment were to find out propagation technology of Ledger and Succi by tissue culture technique. Experiments were conducted in three consecutive steps, viz the effect of (i) BAP on multiplication and growth of axillary's bud of Ledger and Succi in vitro culture, (ii) IBA on root initiation and growth, (iii) growth medium on the growth of plantlets in acclimatization. The design of the experiments were Complete Randomized Design with 15 (i & ii) and four (iii) replications. The treatments were (i) 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 mg/L BAP, (ii) 0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; dan 2.5 mg/L IBA, and (iii) mixture of soil and rice husk charcoal (1:1), mixture of soil and compost (1:1), mixture of soil, rice husk charcoal, and compost (1:1:1). Parameters measured in the experiments were (i) the initiation of buds multiplication rate twice at axillary buds at subculture. (ii) initiation and roots vigor. (iii) numbers of survived plants and plants vigor. The explant source used derived from two-month old axillary buds cultured in

Murashige and Skoog (MS) medium without growth regulator. Results of the experiment showed that the best shoot multiplication of Ledger and Succi was obtained from the application of 3 mg/L BAP, with buds multiplication rate 7 buds/explant/month for Ledger, and 3-4 buds/explants/month for succi. The best root initiation and root growth were found from the application of 2 mg/L IBA. The highest percentage of survived plantlets (100%) in acclimatization was obtained from mixture of soil and rice husk charcoal (1:1) medium. Therefore it is concluded that tissue culture technique could be used for plantlet mass propagation of elite C. Ledgeriana and C. Succirubra through axillary bud multiplication.

[Key Words : *Cinchona ledgeriana* Moens, *C. Succirubra* Pavon, plant tissue – culture, plantlet acclimatization, axillary bud-multiplication]

Ringkasan

Tanaman kina *Cinchona ledgeriana* (Ledger) dan *C. succirubra* (Succi) merupakan tanaman industri yang mengandung alkaloid di dalam kulit batangnya dan berguna dalam bidang industri farmasi, makanan, minuman dan kimia. Kendala yang dihadapi dalam perbanyakan tanaman kina secara konvensional dengan sistem sambung adalah inkompatibilitas, kematian

akibat pengangkutan cukup tinggi, jumlah bahan tanam yang diproduksi sangat terbatas dan waktu penyediaan yang cukup lama. Masalah tersebut dapat diatasi dengan menggunakan teknik kultur jaringan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan teknologi perbanyakan tanaman kina Ledger dan Succu dengan teknik kultur jaringan. Penelitian terdiri atas (i) pengaruh BAP terhadap inisiasi dan penggandaan tunas aksilar, (ii) pengaruh IBA terhadap inisiasi serta pertumbuhan akar planlet, dan (iii) pengaruh beberapa medium terhadap pertumbuhan planlet dalam aklimatisasi. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap, masing-masing diulang 15 (i & ii) dan (iii) empat kali. Peubah yang diukur untuk percobaan (i) adalah waktu inisiasi tunas dan laju penggandaan tunas aksiler pada dua kali subkultur. (ii) Waktu inisiasi dan vigor akar. (iii) Jumlah tanaman yang bertahan hidup setelah aklimatisasi, serta vigor tanaman. Sumber eksplan yang digunakan adalah tunas aksilar dari kecambah terpilih berumur dua bulan yang dikulturkan dalam medium Murashige dan Skoog tanpa zat pengatur tumbuh. Perlakuan untuk percobaan (i) adalah 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 mg/L BAP, (ii) adalah 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 mg/L IBA, sedang (iii) adalah medium tanam tanah, tanah : arang sekam (1:1), tanah : kompos (1:1), tanah : arang sekam : kompos (1:1:1). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa konsentrasi BAP terbaik untuk inisiasi dan penggandaan tunas tanaman kina Ledger dan Succu adalah 3 mg/L BAP, dengan laju penggandaan tujuh tunas/eksplan/bulan untuk Ledger dan 3-4 tunas/eksplan/bulan untuk Succu. Sedang untuk perakaran diperoleh dari medium MS dengan penambahan 2 mg/L IBA. Persentase tertinggi planlet (100%) yang mampu bertahan hidup pada aklimatisasi diperoleh dari medium campuran tanah : arang sekam (1:1). Berdasarkan hasil tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa perbanyakan tanaman kina secara *in vitro* untuk menghasilkan bibit bermutu dapat dilakukan melalui teknik penggandaan tunas aksiler.

Pendahuluan

Di Indonesia dikenal dua jenis tanaman kina yang diusahakan dalam skala perkebunan, yaitu *Cinchona ledgeriana* Moens

(Ledger) dan *Cinchona succirubra* Pavon (Succi). Tanaman kina merupakan tanaman industri yang mengandung alkaloid di dalam kulit batangnya yang mempunyai nilai penting dan digunakan dalam bidang industri farmasi (Hay *et al.*, 1986; Brotosisworo, 1993; Raintree Nutrition, 2003) serta industri makanan dan minuman (*tonic water*) (Widayat, 2000; PT SIL, 2002). Empat jenis alkaloid utama yang mempunyai nilai ekonomi tinggi adalah kinin, sinkonin, kinidin dan sinkonidin (Brotosisworo, 1993). Selain untuk obat malaria kinin digunakan sebagai obat aritmia jantung dan hampir 50 % produksi kinin digunakan sebagai bahan tonik, yaitu *tonic water*, *bitter lemon*, dan penambah nafsu makan (Raintree Nutrition, 2003).

Salah satu upaya meningkatkan peranan kina adalah melalui perluasan areal pertanaman secara bertahap pada skala perkebunan dari 5.000 menjadi 10.000 ha pada tahun 2008 (Santoso *et al.*, 2000) dan mengembangkan kina rakyat, seperti halnya di Jawa Barat sebagai propinsi penghasil kina terbesar di Indonesia tersedia 32.000 ha untuk tanaman kina (Dinas Perkebunan Propinsi Jawa Barat, 2002). Jenis kina Ledger mempunyai kadar kinin mencapai 17 % (Astika, 1975), tetapi tidak tahan penyakit akar dan kanker batang (Sukasmono, 1990). Oleh karena itu, penanaman kina dilakukan dengan penyambungan dengan kina Ledger sebagai batang atas dan kina Succu sebagai batang bawah. Jenis kina Succu mempunyai kadar kinin rendah kurang dari 5 %, tetapi mempunyai perakaran kuat dan tahan terhadap penyakit akar sehingga pada penyambungan digunakan sebagai batang bawah.

Kendala yang dihadapi dalam penyediaan bibit secara konvensional a.l. dengan stek sambung memerlukan waktu cukup lama yaitu 10 – 12 bulan, dengan kematian mencapai 20 % - 30 %. Beberapa faktor

penyebabnya adalah inkompatibilitas sambungan, kualitas bahan tanam, teknik penyambungan yang memerlukan keahlian khusus. Selain itu, dengan teknik pembibitan secara konvensional pemenuhan kebutuhan bibit jarak jauh juga menjadi kendala, kematian akibat pengangkutan cukup tinggi, yaitu mencapai 50 %, dengan kapasitas angkut yang sangat terbatas (Sukasmono *et al.*, 1980). Salah satu cara untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah menggunakan teknik kultur jaringan dengan perbanyakan klonal atau mikropropagasi.

Teknik kultur *in vitro* telah dikenal lama dan merupakan alat yang efisien untuk multiplikasi klonal secara cepat (Rout & Das, 2002). Salah satu cara perbanyakan *in vitro* yang banyak digunakan untuk penyediaan bibit skala komersial adalah dengan penggandaan tunas aksiler. Regenerasi tanaman melalui meristem aksiler menjamin bibit yang *true-to-type* dan mempunyai resiko kecil yang mengarah ketidakstabilan genetik (Cassels & Curry, 2001; Veshney *et al.*, 2001). Tahapan perbanyakan melalui penggandaan tunas aksiler adalah inisiasi dan penggandaan tunas, perakaran dan aklimatisasi (George & Sherrington, 1984).

Sampai sejauh ini perbanyakan tanaman kina dengan kultur jaringan masih dalam tahap penelitian. Penelitian tersebut umumnya menggunakan eksplan yang berasal dari kecambah yang tumbuh dari biji aseptik (Hunter, 1979; Krikorian *et al.*, 1981; Chung & Staba, 1984; Hunter, 1988; Delima, 1995).

Untuk memenuhi permintaan akan kina yang mengalami peningkatan, pemerintah merencanakan perluasan areal tanam mencapai 10.000 ha sampai tahun 2008. Untuk keperluan tersebut diperkirakan membutuhkan bibit sebanyak 50 juta bibit atau 10 juta bibit per tahun. Penyediaan bibit secara konvensional (bibit setek sambung) tidak mampu untuk memenuhi kebutuhan

tersebut. Salah satu alternatif adalah menggunakan teknologi kultur jaringan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menetapkan (i) konsentrasi BAP yang optimum untuk penggandaan tunas, (ii) konsentrasi IBA yang optimum untuk pertumbuhan akar, dan (iii) medium yang terbaik untuk aklimatisasi. Dari hasil penelitian ini diharapkan diperoleh teknik perbanyakan tanaman kina melalui multiplikasi tunas aksiler.

Bahan dan Metode

Sumber aksplan yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari benih tanaman kina Ledger klon QRC dan kina Succi, yang diperoleh dari Kebun Percobaan Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung. Penelitian mencakup tiga percobaan, yaitu untuk menetapkan: (i) konsentrasi BAP yang optimum untuk penggandaan tunas aksiler, (ii) konsentrasi IBA yang optimum untuk pengakaran planlet, dan (3) medium terbaik untuk aklimatisasi.

Sterilisasi dan perkecambahan benih

Benih kina Ledger dan Succi yang sudah diseleksi di masukkan ke dalam kain kasa steril, direndam dalam alkohol 70% selama satu menit dalam 30% Natrium hipoklorit dengan nama dagang bayclean selama 5 -10 menit. Benih yang sudah dicuci dengan akuades steril 3 - 4 kali dikecambahkan dalam cawan Petri yang diberi kertas saring dan dilembabkan dengan medium MS₀ (Murashige & Skoog, 1962) cair. Cawan Petri berisi benih ditutup dengan selotip bening untuk mencegah penguapan dan kontaminasi, kemudian diletakkan dalam ruang kultur. Setelah benih berkecambah lebih kurang 21 hari, dilakukan seleksi berdasarkan morfologi yang normal dan pertumbuhan yang seragam. Kecambah dikulturkan dalam botol kultur yang berisi medium padat MS₀,

masing-masing berisi lima kecambah dan diinkubasi dalam ruang kultur.

(i) *Pengaruh BAP terhadap pengendalian dan pertumbuhan tunas aksiler*

Eksplan berupa potongan satu nodus batang berukuran 2 cm berasal dari kecambah terpilih kina Ledger dan Succi berumur satu bulan yang dikulturkan secara *in vitro*. Sebanyak empat potongan nodus dikulturkan dalam botol kultur yang berisi medium MS (Murashige & Skoog, 1962), dengan penambahan 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 mg/L BAP. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan ulangan 15 kali. Pengamatan yang dilakukan meliputi waktu inisiasi pertumbuhan, pengendalian tunas, jumlah tunas terbentuk, dan tinggi tunas. Pengamatan dilakukan pada subkultur 1, 2, dan 3 dengan lama waktu tiap subkultur empat minggu. Analisis data dilakukan dengan analisis varian dan uji beda nyata Duncan 5 %.

(ii) *Pengaruh IBA terhadap inisiasi serta pertumbuhan akar planlet*

Potongan sepanjang tiga ruas dari pucuk tunas Ledger dan Succi hasil percobaan di atas dikulturkan dalam medium B5 (Gamborg *et al.*, 1968) dengan penambahan zat pengatur tumbuh IBA dengan konsentrasi yaitu 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 mg/L IBA. Eksplan dikulturkan pada botol kultur sebanyak empat eksplan per botol kultur.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan ulangan 15 kali. Pengamatan dilakukan terhadap waktu inisiasi akar, jumlah akar, dan panjang akar. Untuk memperoleh konsentrasi IBA terbaik dilakukan dengan uji varian dengan uji beda nyata Duncan 5 %.

Kondisi ruang kultur

Inkubasi kultur dari percobaan pengendalian benih, (i) sampai dengan (ii) dilakukan dalam ruang kultur dengan kelembaban nisbi udara 80-90%, suhu 24 – 25°C dan diberi penyinaran selama 12 jam per hari.

(iii) *Pengaruh medium terhadap pertumbuhan planlet dalam aklimatisasi*

Pengujian aklimatisasi menggunakan planlet dari hasil percobaan perakaran yang terbaik. Empat medium yang diuji terdiri atas tanah (tunggal), tanah : arang sekam (1:1), tanah : kompos (1:1), tanah: arang sekam : kompos (1:1:1). Jenis tanah yang digunakan adalah tanah *top soil* Andosol Gambung, sedangkan jenis kompos adalah kompos campuran pupuk kandang. Planlet yang telah berakar dipindahkan ke media aklimatisasi yang telah disterilkan lebih dulu. Sterilisasi media dilaksanakan dengan menggunakan fungisida Dithane M-45 5 g/L air. Medium perlakuan ditempatkan dalam bak plastik dengan ukuran 40 x 50 cm dan ketebalan media sekitar 10 cm. Selanjutnya planlet ditanam dengan jarak tanam 5 x 5 cm dan ditutup dengan plastik transparan untuk menjaga kelembaban udara agar tetap tinggi, yaitu di atas 70%. Bak plastik tersebut kemudian disusun dan ditempatkan pada naungan kolektif yang terbuat dari bambu di dalam sungkup dengan cahaya matahari tidak langsung masuk lebih kurang 30% (Pusat Penelitian Teh dan Kina, 1995).

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan dan ulangan empat kali. Peubah yang diukur adalah jumlah tanaman yang bertahan hidup satu bulan setelah aklimatisasi, pertumbuhan perakaran di pembibitan yang meliputi jumlah dan panjang akar. Pengamatan juga dilakukan

sampai tanaman berumur dua bulan di lapang mencakup jumlah daun dan tinggi tanaman.

Hasil dan Pembahasan

(i) Pengaruh BAP terhadap inisiasi tunas aksiler

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa jumlah tunas aksilar yang terbentuk dari eksplan kina Ledger dan Succi pada berbagai konsentrasi BAP dalam medium MS berbeda nyata antar perlakuan (Tabel 1). Tampak bahwa inisiasi tunas Ledger paling efektif diperoleh dari 3 mg/L BAP yaitu pada umur tujuh hari setelah kultur. Sedangkan pada perlakuan konsentrasi 1, 2, 4, dan 5 mg/L BAP inisiasi efektif terjadi pada umur 14 hari setelah kultur. Pada konsentrasi 3 mg/L memberikan persentase jumlah eksplan bertunas tertinggi, yaitu 22,7 % dan berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Pada umur 14 hari semua tingkat konsentrasi yang diberikan berpengaruh nyata terhadap jumlah eksplan bertunas. Perlakuan 4 dan 5 mg/L BAP memberikan jumlah eksplan bertunas tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya masing-masing sebanyak 73,2 dan 78,4%. Secara kumulatif pada umur 14 hari setelah kultur jumlah eksplan bertunas telah mencapai lebih dari 50% dari populasi eksplan yang ditanam, tampak bahwa pada umur 14 hari eksplan bertunas secara serempak. Pada umur 21 hari eksplan yang bertunas mulai menurun dan diperoleh jumlah eksplan bertunas pada perlakuan konsentrasi 1 mg/L BAP tertinggi dan berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Pada kina Succi inisiasi tunas terjadi pada umur kultur tujuh hari dengan hasil tertinggi yaitu 31,6% eksplan bertunas diperoleh dari medium yang mengandung

4 mg/L BAP (Tabel 1). Pada umur 14 hari, seluruh perlakuan konsentrasi BAP berpengaruh nyata terhadap jumlah eksplan bertunas, efek perlakuan tertinggi diperoleh dari 1mg/L BAP dengan jumlah eksplan bertunas sebanyak 86,6%. Secara kumulatif semua eksplan yang dikulturkan telah bertunas mencapai lebih dari 50% dari populasi eksplan yang dikulturkan. Pada umur 21 hari, jumlah eksplan yang bertunas menurun untuk semua perlakuan.

Waktu inisiasi tunas kedua jenis tanaman kina di atas menunjukkan kesamaan respons, yaitu terjadi pada umur tujuh hari setelah kultur. Namun kecepatan pembentukan tunas berbeda pada tiap tingkat konsentrasi BAP. Pada kina Ledger umur tujuh hari persentase jumlah tunas tertinggi yaitu 22,7% diperoleh dari medium dengan penambahan 3 mg/L BAP, sedang untuk Succi konsentrasi BAP terbaik adalah 4 mg/L dengan persentase bertunas 31,6 % (Tabel 1). Tampak bahwa semakin tinggi konsentrasi BAP dan semakin lama pengkulturan, jumlah tunas yang dibentuk semakin menurun.

Pengaruh BAP terhadap jumlah dan tinggi tunas

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tingkat konsentrasi BAP yang diuji memberikan hasil berbeda nyata baik untuk tinggi maupun jumlah tunas pada setiap selang waktu pengamatan, dengan konsentrasi BAP yang optimum adalah 3 mg/L (Tabel 2 & Gambar 1). Tampak bahwa semakin tinggi konsentrasi BAP yang ditambahkan ke dalam medium terjadi penghambatan terhadap penggandaan tunas demikian juga terhadap tinggi tunas. Menurut Tripepi (1997) hal ini kemungkinan berhubungan dengan kemampuan sel dalam mencapai batas optimum konsentrasi zat pengatur tumbuh untuk memacu diferensiasi

Tabel 1. Pengaruh konsentrasi BAP terhadap jumlah eksplan Ledger dan Succi bertunas yang dikulturkan dalam medium S pada 7, 14, dan 21 hari setelah kultur.

Table 1. The effect of BAP concentrations on the number of Ledger and Succi explants have buds cultured on MS medium at 7, 14, and 21 days after cultured.

Konsentrasi Concentrations BAP mg/L	Jumlah eksplan Ledger bertunas Numbers of explants Ledger have buds			Jumlah eksplan Succi bertunas Numbers of explants Succi have buds		
	7	14	21	7	14	21
	Hari			(Days)		
0	2,1 a*	5,8 a	8,5 a	2,4 a	4,2 a	2,0 a
1	2,1 a	51,1 b	30,8 c	12,0 b	86,0 d	3,0 a
2	4,3 b	60,2 c	24,7 b	17,4 c	68,4 b	14,2 c
3	22,7 d	58,7 c	16,5 b	26,0 d	70,0 b	4,0 a
4	8,2 c	73,2 d	13,4 b	31,6 e	62,0 a	6,4 b
5	5,4 b	78,3 d	13,0 b	17,6 c	78,4 c	4,0 a

* Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut uji jarak berganda Duncan, $P < 0,05$.

* Figure in the same column followed by the same letter is not significantly different according to Duncan multiple range test, $P < 0.05$

tunas sehingga eksplan mempunyai batas fisiologi untuk dapat berdiferensiasi.

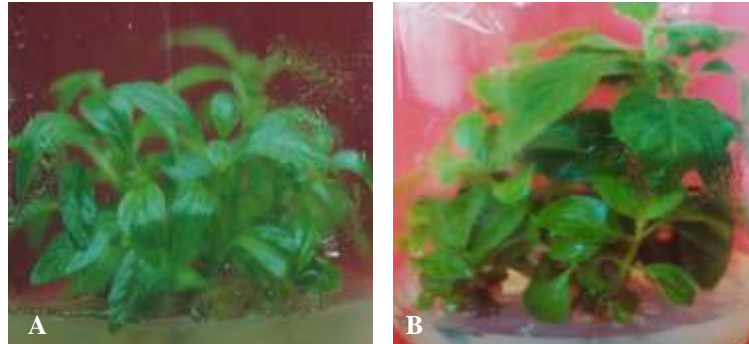
Pada kina Succi, efek BAP terhadap jumlah tunas baru terlihat pada umur 16 dan 24 minggu (Tabel 2). Pada umur 16 minggu setelah kultur, jumlah tunas lebih banyak diperoleh pada medium dengan penambahan 3 dan 4 mg/L dan berbeda nyata dengan konsentrasi lainnya. Sedangkan untuk tinggi tunas terbaik yaitu 49,75 mm diperoleh dari perlakuan 3 mg/L BAP.

Hasil yang sama diperoleh pada umur 24 minggu, respons terbaik untuk jumlah tunas dan tinggi tunas diperoleh pada konsentrasi 3 dan 4 mg/L BAP dan tidak berbeda nyata antar keduanya. Pertimbangan secara ekonomis konsentrasi 3 mg/L BAP lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi 4 mg/L BAP. Pada konsentrasi yang lebih tinggi dari 3 mg/L BAP dari perlakuan yaitu konsentrasi 4 dan 5 mg/L BAP telah terjadi pertumbuhan yang

menurun, sebagaimana halnya yang terjadi pada kina Ledger. Dari data pertambahan tunas (Tabel 1) diperoleh laju penggandaan tunas adalah tujuh tunas per eksplan per bulan untuk kina Ledger dan 3-4 tunas per eksplan per bulan untuk kina Succi. Delima (1995) berhasil memperoleh laju penggandaan tunas aksiler pada tanaman kina Ledger sebanyak tiga tunas per eksplan per bulan dalam medium MS dengan penambahan 5 mg/L BAP.

Untuk pembentukan dan penggandaan tunas dari eksplan nodus tunggal kecambah *in vitro*, spesies sangat mempengaruhi laju penggandaan tunas. Duran-Vila *et al.* (1989) menemukan untuk *Citrus sinensis*, *C. Medica* dalam medium MS dengan penambahan 3 mg/L BAP mampu menghasilkan 0-7 tunas per eksplan per bulan. Sedang untuk *C. Aurantifoliodus* hanya 1-2 tunas per eksplan per bulan dalam medium yang sama. Kristina & Bernawie (1999)

Perbanyak tanaman kina *Cinchona ledgeriana* Moens. dan *C. succirubra* Pavon ...



Gambar 1. Keragaan planlet Ledger (A) dan Succir (B) pada medium MS dengan penambahan BAP 3 mg/L pada umur empat bulan setelah dikulturkan.

Figure 1. Performance of Ledger (A) and Succir (B) plantlets on MS medium with the addition of 3 mg/L BAP, four-month-old culture.

Tabel 2. Pengaruh Konsentrasi BAP terhadap jumlah dan tinggi tunas kina Ledger dan Succir pada umur 16 dan 24 minggu setelah tanam.

Table 2. Effect of BAP concentrations on number and height of Ledger and Succir buds at 16- 24-week after culture.

Konsentrasi Concentrations BAP (mg/L)	Ledger				Succir			
	16		24		16		24	
	Minggu (Weeks)							
	Jumlah tunas Buds number	Tinggi tunas Buds height (mm)	Jumlah tunas Buds number	Tinggi tunas Buds height (mm)	Jumlah tunas Buds number	Tinggi tunas Buds height (mm)	Jumlah tunas Buds number	Tinggi tunas Buds height (mm)
0	3,5 a	10,3 a	5,8 a	12,5 a	2,6 a	9,8 a	4,3 a	9,7 a
1	6,2 b	30,7 bc	20,6 b	36,7 bc	3,0 a	16,7 b	10,5 a	24,9 a
2	6,7 b	34,9 c	22,1 b	45,4 c	5,5 b	26,1 c	19,2 c	33,9 b
3	13,2 d	44,8 d	45,0 c	58,3 d	8,1 c	49,7 d	25,5 d	64,7 c
4	10,6 c	30,0 b	31,8 bc	42,0 c	7,3 c	42,0 d	24,3 d	54,6 c
5	17,5 e	19,3 a	23,7 b	28,9 b	5,2 b	22,8 b	15,7 bc	34,2 b

* Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut uji jarak berganda Duncan, $P < 0,05$.

* Figure in the same column followed by the same letter is not significantly different according to Duncan multiple range test at, $P < 0,05$.

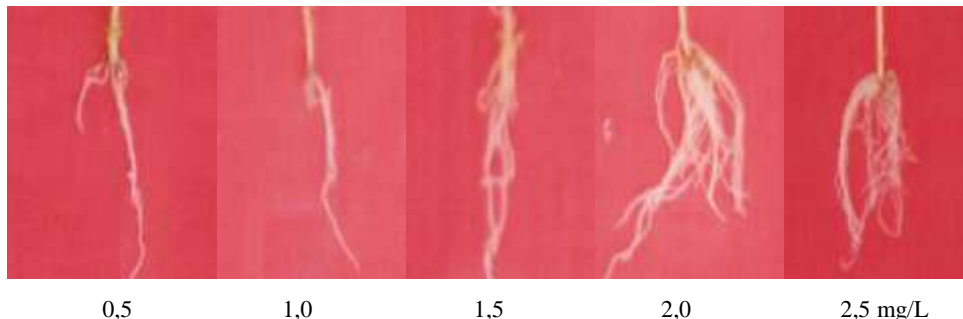
Tabel 3. Pengaruh konsentrasi IBA terhadap rata-rata planlet Ledger dan Succi berakar yang dikulturkan dalam medium B5 pada 21 dan 28 hari setelah kultur.

Table 3. Effect of IBA concentrations on the average of rooting of Ledger and Succi cultured on B5 medium, 21 and 28-days after cultured.

Konsentrasi IBA (mg/L)	Jumlah planlet berakar (%) Numbers of plantlet have root (%)			
	Ledger		Succi	
	21	28	21	28
	Hari (Days)			
0,0	8,10 a	4,30 a	18,40 a	2,50 a
0,5	50,0 e	6,2 a	75,8 d	5,4 b
1,0	40,0 d	16,3 c	72,2 d	4,0 a
1,5	18,7 b	12,3 b	51,3 b	9,2 c
2,0	12,5 a	12,0 b	58,6 c	4,4 a
2,5	33,3 c	15,5 c	34,5 a	3,0 a

* Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut uji jarak berganda Duncan, $P < 0,05$.

* Figure in the same column followed by the same letter is not significantly different according to Duncan multiple range test, $P < 0.05$.



Gambar 2. Keragaan akar planlet Ledger pada medium B5 dengan penambahan 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/L IBA, berumur satu bulan setelah kultur.

Figure 2. Root Performance of Ledger plantlet on B5 medium with the addition of 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 mg/L IBA, one-month-old culture.

melaporkan bahwa pada *Pelargonium graveolens* dan *P. Tomentosum* konsentrasi BAP untuk menginduksi dan penggandaan tunas aksiler, masing-masing 3 dan 5 mg/L dengan laju penggandaan 2-4 dan 2 tunas per eksplan per bulan. Mittal *et al.* (1989) mampu menghasilkan 2-3 tunas per eksplan

per bulan dari tunas aksiler yang berasal dari kecambah *in vitro* *Acacia auriculiformis* dalam basal medium B5 (Gamborg *et al.*, 1968) dengan penambahan 2,25 mg/L BAP dan 5-10% air kelapa. Raha & Roy (2001) melaporkan bahwa induksi tunas aksiler terbaik pada *Holarrhena antidysenterica*

terjadi pada 10-12 hari dari medium yang mengandung 3,5 mg/L BAP. Harada & Murai (1996) memperoleh medium optimum untuk proliferasi tunas *Prunus mume* Sieb. Et Zucc atau aprikot Jepang pada konsentrasi 5 mg/L BAP dengan inisiasi tunas terjadi pada umur 30 hari setelah induksi, sedangkan tingkat konsentrasi tidak berpengaruh pada tinggi tunas.

Inisiasi dan Pertumbuhan Akar

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa waktu inisiasi akar pada berbagai konsentrasi IBA dengan medium dasar B5 telah mulai terjadi pada hari ke-7 dan meningkat pada hari ke-14 dan tertinggi pada hari ke-21 kemudian menurun pada hari ke-28 hari setelah kultur (Tabel 3).

Pada umur 14 hari setelah kultur jumlah planlet berakar meningkat dan terdapat perbedaan secara nyata pada masing-masing tingkat konsentrasi. Konsentrasi 2,0 mg/L IBA memberikan jumlah planlet berakar tertinggi yaitu 62,5 % dibandingkan dengan konsentrasi yang lainnya. Pada umur 21 hari setelah kultur jumlah planlet berakar tertinggi yaitu 94,6% diperoleh pada konsentrasi 0,5 mg/L IBA. Sedangkan pada umur 28 hari jumlah planlet berakar mengalami penurunan dan dari jumlah planlet yang berakar hasil tertinggi diperoleh pada konsentrasi 1,0 mg/L dan 2,5 mg/L. Pada umur planlet 14 dan 21 hari setelah kultur menunjukkan respons berakar paling tinggi, dan menurun drastis pada hari ke 28 (Tabel 2 dan Gambar 3).

Pada kina Succi inisiasi akar mulai terjadi pada hari ke - 7 dan secara serempak planlet berakar pada hari ke -21 dan setelah 28 hari jumlah planlet berakar mulai menurun. Respons planlet berakar paling baik terjadi pada konsentrasi 2,5 mg/L IBA dengan jumlah planlet yang hari ke -14 yaitu 41,2 %. Secara kumulatif pada konsentrasi tersebut planlet berakar mencapai

62,5 % dari populasi. Pada umur 21 hari setelah kultur jumlah planlet berakar yang tinggi terdapat pada konsentrasi 0,5 mg/L dan 1,0 mg/L pada umur tersebut seluruh perlakuan telah memberikan respons planlet berakar mencapai lebih dari 50 % (Tabel 2, Gambar 3).

Pengaruh IBA terhadap jumlah dan panjang akar planlet

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa adanya pengaruh konsentrasi IBA yang nyata terhadap jumlah akar dan panjang akar pada kina Ledger, dengan konsentrasi optimum adalah 2 mg/L IBA dengan jumlah akar tertinggi mencapai 7,20 buah (Tabel 4). Hasil yang sama diperlihatkan pada analisis data panjang akar pada perlakuan konsentrasi 2,0 mg/L memberikan panjang akar tertinggi, yaitu 6,0 mm dan berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Secara morfologis akar Ledger pada medium B5 + 2,0 mg/L IBA menunjukkan tampilan yang lebih panjang dan lebat dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Rata-rata jumlah akar dari berbagai konsentrasi IBA yang diberikan menunjukkan pengaruh yang nyata. Pada perlakuan 2,0 mg/L IBA menghasilkan jumlah akar terbanyak yaitu 8,2 buah per planlet dan panjang akar 7,6 mm terbaik dan berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 2,0 mg/L IBA yang ditambahkan pada medium dasar B5 sangat efektif pada planlet kina jenis Succi (Tabel 4, Gambar 2). Secara morfologis perakaran planlet Succi pada medium B5 + 2,0 mg/L IBA menunjukkan tampilan yang lebih panjang dan lebat dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Menurut Marks *et al.* (2000) dan Howard (1996) kemampuan planlet untuk membentuk akar dipengaruhi oleh beberapa

faktor termasuk perbedaan genotipnya, tingkat kematangan jaringan, dan karakter fisiologis. Oleh karena itu planlet memberikan respons berakar yang berbeda-beda. Berdasarkan sensitifitas planlet terhadap hormon perakaran Marks *et al.* (2000) mengolongkan ada tanaman yang mudah berakar dan tanaman yang sukar berakar, hal ini penting untuk menentukan respons

auksin secara eksogen. Tampaknya tanaman kina tergolong yang mudah berakar mengingat pada hari ke tujuh pengkulturan telah terjadi induksi perakaran, di samping itu pertumbuhan akarnya cukup baik. IBA sebagai hormon perakaran akan menghasilkan akar yang cepat menjadi panjang dan berbentuk akar serabut yang kuat. IBA dan NAA memiliki sifat kimia yang lebih

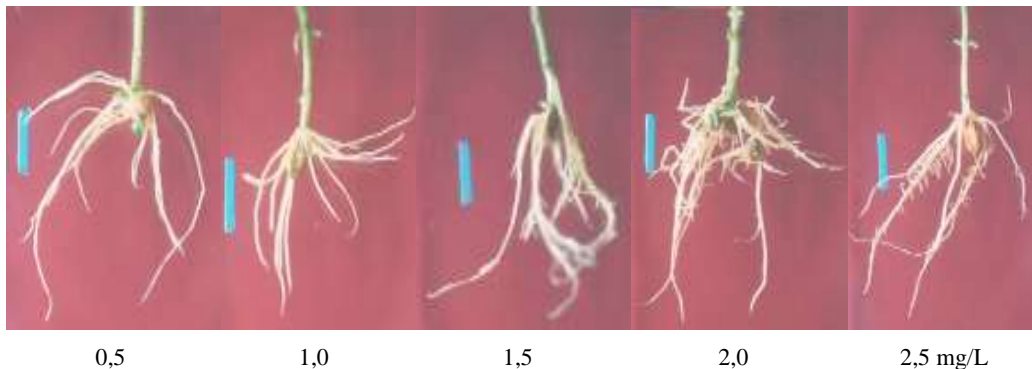
Tabel 4. Pengaruh konsentrasi IBA terhadap rata-rata jumlah dan panjang akar pada medium B5 dari planlet kina Ledger dan Succi pada empat minggu setelah kultur.

Table 4. Effect of IBA concentration on the average of root number and length on B5 medium of Ledger and Succi plantlet, four-week after cultured.

Konsentrasi IBA (mg/L)	Jumlah akar Root number	Panjang akar Root length (mm)	Jumlah akar Root numbers	Panjang akar Root length (mm)
0,0	2,1 a	1,8 a	2,5 a	2,3 a
0,5	2,6 a	3,3 a	2,9 a	5,0 b
1,0	2,8 a	3,7 a	3,1 a	5,4 b
1,5	3,8 b	4,5 b	4,8 b	6,9 c
2,0	7,2 d	6,0 d	8,2 c	7,6 d
2,5	5,3 c	5,4 c	4,2 b	6,8 c

* Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut uji jarak berganda Duncan, $P < 0,05$.

* Figure in the same column followed by the same letter is not significantly different according to Duncan multiple range test, $P < 0,05$.



Gambar 3. Keragaan perakaran planlet Succi pada medium B5 dengan penambahan 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; dan 2,5 mg/L IBA, berumur satu bulan.

Figure 3. Root performance of Succi plantlet on B5 medium with the addition of 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5 mg/L IBA, one-month-old.

stabil dibandingkan dengan IAA dan tidak mudah teroksidasi (Tamas, 1995; Baraldi *et al.*, 1995; De Klerk *et al.*, 1995) salah satu kelebihan metode kultur jaringan adalah dapat dimanfaatkannya untuk mempelajari ragam aspek perakaran, yang dapat menambah pemahaman tentang metabolisme IBA dan waktu induksi perakaran. Di samping itu IBA paling efektif dan murah dibandingkan dengan jenis zat pengatur tumbuh lainnya (Wattimena *et al.*, 1992). Respons jenis tanaman terhadap perakaran berbeda pada konsentrasi IBA, sebagaimana telah ditemukan oleh beberapa peneliti di antaranya pada *Centella asiatica* (L) dengan medium MS+ 2,46 μ M IBA (Tiwari *et al.*, 2000), pada Enset (*Ensete ventricosum* Welw. Chersman) dengan medium MS $\frac{1}{2}$ + 5 μ M IBA + 1 g/L arang aktif + 1 μ M BAP (Neglash *et al.*, 2000) dan pada *Anthemis nobilis*, L dengan medium MS + 0,5 μ M IBA (Echeverrigaray *et al.*, 2000).

Menurut Salisbury & Ross (1992) IBA memegang peranan penting pada proses pembelahan dan pembersan sel, terutama di awal pembentukan akar. Selanjutnya Zaer & Mapes (1985) menyatakan bahwa yang diabsorpsi tanaman akan tergantung pada konsentrasi yang diberikan dan akan menentukan pembelahan sel. Jika IBA yang akan diabsorpsi tinggi, proses pembelahan sel akan berlangsung cepat sehingga pembentukan kalus akan lebih cepat dan luas. Semakin luas bagian yang membentuk kalus, berarti makin banyak primordia akar yang terbentuk, sehingga inisiasi akar lebih banyak. Hal ini mengakibatkan pertumbuhan akar pada perlakuan dengan konsentrasi IBA tertentu lebih baik jika dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi IBA yang lebih rendah. Pada konsentrasi B5+2,0 mg/L IBA, tampilan pertumbuhan dan perkembangan akar paling baik dibandingkan dengan konsentrasi IBA yang lainnya (Gambar 3).

Pengaruh medium tanam terhadap pertumbuhan planlet Ledger dan Succu dalam aklimatisasi

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa adanya pengaruh yang sangat nyata antar media aklimatisasi dengan jumlah planlet yang bertahan hidup. Medium aklimatisasi yang paling baik adalah campuran tanah : arang sekam (1:1) untuk Ledger dan Succu (Tabel 5). Setelah 2 bulan aklimatisasi rata-rata tinggi tanaman Ledger dan Succu di lapang, masing-masing 5,6 cm dan 3,9 cm. Jumlah daun untuk Ledger 4,0, sedang jumlah daun Succu 4,5 (Gambar 4). Medium tanah dan arang sekam memberikan nilai sifat sarang tanah yang lebih baik dibandingkan dengan medium tanah (*top soil*) tanpa campuran, hal ini sangat diperlukan untuk perkembangan akar tanaman. Di samping memberikan kondisi sarang tanah yang baik, arang sekam bersifat (i) menyerap dan menyimpan air cukup baik sehingga planlet tidak kekeringan selama aklimatisasi, (ii) menekan pertumbuhan mikroba patogen jamur maupun bakteri. Keadaan yang diciptakan oleh arang sekam ini membuat akar tanaman selama aklimatisasi dapat tumbuh dengan baik. Perakaran yang baik sangat menentukan dalam aklimatisasi, oleh karena fungsi akar untuk menyerap nutrisi dan air sehingga upaya untuk mengubah sifat heterotropik planlet ke arah autotropik secara bertahap selama aklimatisasi akan tercapai.

Perlakuan medium yang menggunakan kompos tingkat kematiannya lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Penggunaan kompos pada medium tumbuh planlet yang masih sangat muda diduga masih menimbulkan suhu relatif tinggi dibandingkan dengan tanpa kompos karena masih adanya pengaruh proses dekomposisi kompos. Di samping itu kelembaban yang tinggi merangsang tumbuhnya jamur patogen yang berasal dari kompos.

Perbanyakan tanaman kina *Cinchona ledgeriana* Moens. dan *C. succirubra* Pavon ...

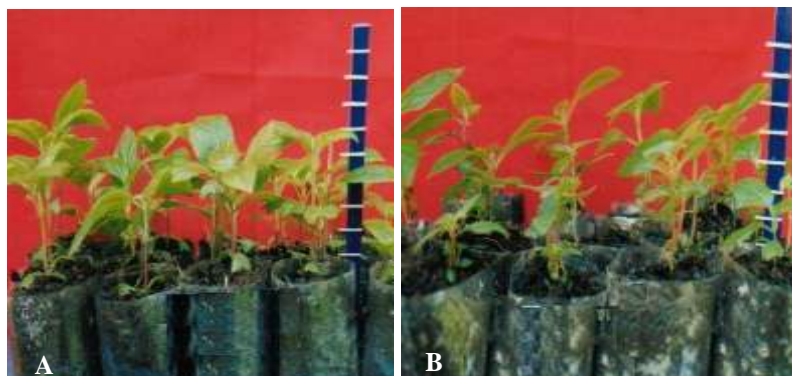
Tabel 5. Pengaruh medium aklimatisasi terhadap jumlah tanaman kina Ledger dan Succi yang bertahan hidup (%) pada umur satu bulan setelah aklimatisasi.

Table 5. Effect of acclimatization medium on the number of survived Ledger and Succi plant (%) one-month after acclimatization.

Medium aklimatisasi <i>Acclimatization medium</i>	Jumlah planlet hidup <i>Plantlet survived (%)</i>	
	Ledger	Succi
Tanah : arang sekam : kompos <i>Top soil : rice husk charcoal : manure (1:1:1)</i>	57,8 a*	62,1 a*
Tanah: arang sekam (<i>Top soil : rice husk charcoal</i>) (1:1)	77,8 c	95,5 c
Tanah : kompos (<i>Top soil : manure</i>) (1:1)	59,9 ab	67,4 ab
Tanah (<i>Top soil</i>)	67,0 b	73,2 b

* Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut uji jarak berganda Duncan, $P < 0,05$.

* *Figure in the same column followed by the same letter is not significantly different according to Duncan multiple range test, $P < 0.05$.*



Gambar 4. Keragaan tanaman kina Ledger (A) dan Succi (B) hasil aklimatisasi berumur dua bulan setelah aklimatisasi pada medium Tanah : arang sekam (1:1).

Figure 4. Performance *Cinchona Ledger* (A) and *Succi* (B) two-month after acclimatization in soil: *rice husk charcoal (1:1) medium*.

Hartmann & Kester (1983) dan Huylenbroek & Debergh (1996) menyatakan bahwa salah satu faktor yang menentukan keberhasilan aklimatisasi adalah medium tanam. Medium yang dikehendaki bersifat gembur, memiliki aerasi dan drainase baik untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan akar. Tedesse *et al.* (2000) menyatakan bahwa kematian planlet dalam

aklimatisasi karena fase perpindahan dari *in vitro* ke *ex vitro* merupakan kejadian traumatik bagi planlet terhadap perubahan kondisi fisiologis. Preece & Sutter (1991) menyatakan bahwa kematian planlet akibat aklimatisasi sekitar 10-20 % merupakan masa kritis planlet. Untuk menekan kematian planlet, proses aklimatisasi dapat dimulai pada kondisi *in vitro* yaitu dengan

memindahkan planlet ke medium tanpa hormon, menggunakan medium aklimatisasi yang mampu merangsang pertumbuhan akar, meningkatkan intensitas cahaya dengan cara membuka tutup kultur sedikit demi sedikit selama beberapa hari sebelum pemindahan tanaman. Brand (1992) menyatakan bahwa penanganan yang tidak hati-hati juga dapat menyebabkan kegagalan berupa kematian bibit. Kegagalan aklimatisasi dapat dikurangi dengan membuat kondisi lingkungan aklimatisasi yang berkelembaban udara tinggi ($> 50\%$) selama 2-3 minggu pertama sehingga tanaman terhindar dari kekeringan. Pemberian naungan sampai 50% untuk mengurangi cahaya matahari langsung juga perlu dilakukan. Peningkatan gradual suhu lingkungan menunjang pertumbuhan tunas dari planlet yang diakarkan pada kondisi *in vitro*.

Kesimpulan

Tanaman kina Ledger dan Succi dapat diperbanyak dengan teknik kultur jaringan melalui penggandaan tunas aksiler, di dalam medium MS dengan penambahan 3 mg/L BAP. Laju penggandaan tunas adalah sebanyak tujuh tunas/eksplan/bulan untuk Ledger, dan 3-4 tunas/eksplan/bulan untuk Succi. Perakaran planlet untuk kedua jenis kina yang diuji, yang terbaik diperoleh dalam medium B5 dengan penambahan 2 mg/L IBA. Medium campuran top soil arang sekam 1:1 (vol/vol) menghasilkan 100% tanaman yang mampu bertahan hidup, dengan vigor yang baik.

Daftar Pustaka

- Astika, W. (1975). Klon QRC, Asal-usul dan daya produksinya. *Warta BPTK*, **1** (2,3), 175 - 192.
- Baraldi R, G. Bertazza, A.M. Bregoli, F. Fasola, A. Rotondi, S. Predieri, D. Serafini-Fraccasini, J.P. Slovin & J.D. Cohen (1995). Auxin and polyamines in relation to differential *in vitro* root induction on microcutting of two pear cultivars. *J. Plant Growth Regul.*, **14**, 49-59.
- Brand, M.H. (1992). *Tissue Culture Variations Problems*. American Nurseryman, Mart 1. 1992.
- Brotosisworo, S. (1993). Efek garam anorganik tertentu terhadap pertumbuhan dan kandungan alkaloid kultur jaringan tanaman Cinchona. Yogyakarta. Universitas Gadjah Mada, *Ringkasan Disertasi*. (Tidak dipublikasikan).
- Cassels, A.C. & R.F. Curry (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: Implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **64**,145-157.
- Chung, C.T. & E.J. Staba (1984). Separation and quantitation of Cinchona major alkaloids by high performance liquid chromatography. *J. Chrom.*, **261**, 276-281.
- De Klerk, G. J., M. Keppel, J. T. Brugge & H. Meekes (1995). Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcutting. *J. Exp. Bot.*, **46**, 965- 972.
- Delima, R.M.T. (1995). Pengaruh komposisi media, konsentrasi BAP dan IBA terhadap pertumbuhan dan perkembangan kina ledger (*Cinchona ledgeriana* Moens) pada kultur in vitro. Bogor, Jurusan Budidaya Pertanian IPB. 56pp. (Tidak dipublikasikan).
- Dinas Perkebunan Propinsi Jawa Barat (2002). *Peta Potensi Lahan dan Tanaman Kina*. Bandung, Pusat Penelitian Teh dan Kina. Gambung, Rapat Kina Indonesia.
- Duran-Vila, N., V. Ortega & L. Navaro (1989). Morphogenetic and tissue culture of three citrus species. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **16**,123-133.

- Echeverrigaray, S., F. Fracaro, L.B. Andrade, S. Biasio & L. Atti-Serafini (2000). *In vitro* shoot regeneration from leaf explants of roman chamomile. *Plant Cell. Tiss. & Org. Cult.*, **60**, 1-4.
- Gamborg O.L., R.A. Miller & K. Ojima (1968). Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, **50**, 151-158.
- George, E.F. & Sherrington (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture*. England, Exegetics Ltd.
- Harada, H. & Y. Murai (1996). Micropropagation *Prunus mume* Sieb. Et Zucc. *Plant Cell. Tiss. & Org. Cult.*, **46**, 265-267.
- Hartmann, H.T & D.E. Kester (1983). *Plant Propagation Principles and Practices*. New Jersey, Prentice Hall Inc.
- Hay, C.A., L.A. Anderson, M.F. Roberts & J.D. Phillipson (1986). *In Vitro* culture of *Cinchona* species precursor feeding of *C. ledgeriana* root organ suspension cultures with L-Tryptophan *Plant Cell Rep.*, **5**, 1-4.
- Howard, B.H. (1996). Relationships between shoot growth and rooting of cuttings in three contrasting species of ornamental shrub. *J. Hort. Sci.*, **71**, 591-605.
- Hunter, C.S. (1979). *In vitro* culture of *Cinchona ledgeriana*, *L. Hort. Sci.*, **54** (2), 111-114.
- Hunter, C.S. (1988). *Cinchona* Spp: Micropropagation and the *in vitro* production of quinine and quinidine. In Y.P.S. Bajaj (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 4. *Medical and Aromatic Plants I*. Berlin, Springer-Verlag.
- Huylenbroeck, J.M. Van & P.C. Debergh (1996). Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. *Plant Cell. Tiss. & Org. Cult. and Biotechnol.*, **2** (3) 136-141.
- Krikorian, A., D.M. Singh & C.E. Quinn (1981). Aseptic micropropagation of *Cinchona* : Prospects and Problem. In *Proc. Costed Symp. on Tissue Culture of Economically Important Plants*. Singapore, Nasional University.
- Kristina, N.N. & N. Bermawie (1999). Pengaruh subkultur dan lama periode kultur pada daya multiplikasi tunas lada (*Piper nigrum* L) asal biji varietas Petaling I. *Jurnal Litri.*, **5** (3), 36-42.
- Marks, R. Tim & S. E. Simpson (2000). Interaction of explant type and indole-3-butyric acid during rooting *in vitro*. In a range of difficult and easy -to -root woody plant. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **62**, 65- 74.
- Mittal, A., R. Agarwal & S.C. Gupta (1989). *In vitro* development leguminous tree from axillary buds of *Accacia auriculiformis* a leguminous tree. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **19**,65-67.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Neglash, A., K. Puite, J. Schaart, B.V. & F. Krens (2000). *In vitro* regeneratio and micropropagation on enset from Southwestern Ethiopia. *Plant Cell. Tiss. & Org. Cult.*, **62**, 153-158.
- Preece, J.E & E.G. Sutter (1991). *Acclimatization of micropropagated plants to the green house and field*. In P.C. Debergh & R.H. Zimmerman (eds.) *Micropropagation Technology and Application*. Netherlands, Kluwer Acad. Publ. p. 71 -93.
- PT. SIL. (2002). *Kebijakan pemasaran dan pengembangan kina dunia*. Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung. Rapat Kina Indonesia. Bandung.
- Pusat Penelitian Teh dan Kina (1995). *Petunjuk kultur teknis tanaman kina*. Bandung, Pusat Penelitian Perkebunan. Gambung, 130pp.

- Raha, S & S.C. Roy (2001). *In vitro* plant regeneration in *Holarrhena antidy sentericawall*, through high frequensi axillary shoot proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **37**, 232 – 236.
- Raintree Nutrition. (2003). *Tropical plant database. Database File For: Quinine (Cinchona offinalis)*. Raintree Nutrition Inc., Austin, Texas 78758. All right reversed. File://C:\MyDocumens\ Quinine Bark-Cinchona-Database entry for-Quinine Bark - Cinchona –quinine Bark. Htm.
- Rout. G.R. & G. Das (2002). An assessment of genetic integrity of micropropagated plants of *Plumbago zeylanica* by RAPD markers. *Biol. Plant*, **45**(1),27-32.
- Salisbury, F.B & C.W. Ross (1992). *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 3. Edisi Bahasa Indonesia. Bandung, Penerbit ITB Press.
- Santoso, I., A. Halik & A. Aminudin (2000). Keragaan dan potensi pengembangan kina di PT. Perkebunan Nusantara VIII. *Dalam* Martanto M. *et al.* (eds.) *Prosiding Seminar Sehari Pengembangan Kina Nasional*. Bandung, 3 Agustus 2000. Bogor, Assosiasi Penelitian Perkebunan Indonesia, p. 1-3.
- Sukasmono, M. Suhawijaya & A. L. Supartoyono (1980). Setek sambungan kina hasil pengujian di lapangan. *Warta BPTK*, **6**(1/2), 105-109.
- Sukasmono (1990). Kinidine. *Warta Teh dan Kina* **1**(1), 8-9.
- Tamas, I.A. (1995). Hormonal regulation of apical dominance. *In* P.J. Davies (ed.) *Plant Hormons Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht, Kluwer Academic Publ. p 572-597.
- Tedesse, M., W.J.M. Lommen & P.C. Struik (2000). Effects of *in vitro* treatments on leaf area growth of potato transplants during acclimatization. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **61**, 59-67.
- Tiwari, K.N., N. C. Sharma, N. Tiwari & B. D. Sigh. (2000). Micropropagation on *Centella asiatica* (L). a valuable medicinal Herb. *Plant Cell. Tiss. & Org. Cult.*, **63**, 179-185.
- Tripepi, R.R. (1997). Adventitious shoot regeneration. *In* R.I. Gereve *et al.* (eds.) *Biotechnology of Ornaments Plants*. USA, CAB. International. p 112 – 121.
- Veshney, A., M. Lakshmikumaran, P.S. Sri Vastava & D. Vibha (2001). Establishment of genetic fidelity of *in vitro* rised lillium bulblets trough RAPD markers. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **37**,227-231.
- Wattimena, G.A. & N.A. Mattjik. (1992). Pemuliaan tanaman secara *in vitro*. *Dalam* A.S. Abidin (ed.) *Bioteknologi Tanaman*. Bogor, PAU Institut Pertanian Bogor.
- Widayat, W. (2000). Peluang pasar dan perkembangan industri kina Indonesia *Dalam* Martanto M. *et al.* (eds.) *Prosiding Seminar Seharui Pengembangan Kina Nasional*. *Bandng*, 3 Agustus 2000. Bogor, Asosiasi Penelitian Perkebunan Indonesia, p. 4-10.
- Zaer, J.B & M.O. Mapes (1985). *Action of growth regulators. Tissue Culture in Forestry*. Netherland, Durzan Martinus Nijhoff Publ.