

## Pengaruh jumlah subkultur dan media sub-optimal terhadap pertumbuhan dan kemampuan regenerasi kalus tebu (*Saccharum officinarum* L.)

*Effect of repeated subcultures and sub-optimum media on the growth of sugarcane (Saccharum officinarum L.) calli*

Hayati MINARSIH<sup>1\*)</sup>, SUHARYO<sup>2)</sup>, Imron RIYADI<sup>1)</sup> & Diah RATNADEWI<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No 1, Bogor 16128

<sup>2)</sup>Departemen Biologi, FMIPA Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

Diterima tanggal 16 Desember 2015/disetujui tanggal 14 Oktober 2016

### Abstract

*Sugarcane (Saccharum officinarum L.) is an important crop for sugar production. One attempt to increase sugarcane productivity is through micropropagation and quality improvement of sugarcane seedlings in vitro. This research aimed to study the effect of repeated subcultures on callus capacity for regeneration and plant survival in acclimatization phase, as well as the influence of suboptimum media on the recovery capability of sugarcane callus to proliferate in vitro. Fourth subcultured sugarcane callus derived from young leaves were used as material in this research. Basic medium of Murashige and Skoog (MS) added with 3 mg/L 2,4-D, 10% coconut water, and 3% sucrose was used for callus initiation. For callus regeneration, the MS medium was supplemented with 2 mg/L BAP, 0.2 mg/L IAA, 10% coconut water, and 3% sucrose. Study on the effect of subculture numbers consisted of three stages, i.e. initiation, regeneration, and acclimatization, while the study the use of sub-optimum media included six treatment media and two pathways. Results showed that the fifth subcultures produced embryoid callus (91%), the highest non mucilaginous callus (97%), and the highest abnormality rate (6%). Results from the suboptimum media treatment, showed that B pathway (4 week resting phase) was better than the A pathway (8 week resting phase), based on fresh weight and callus abnormality percentage. A and B pathways indicated that the growth of callus can be recovered when it was grown back to the normal media and 1.5D-MS treatment of the resting phase showed the best growth and appearance.*

[Key words: sugarcane, subculture, sub-optimum media, in vitro culture.]

### Abstrak

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman bernilai ekonomi tinggi penghasil gula. Salah satu upaya peningkatan produktivitas tebu dilakukan dengan perbanyak dan peningkatan kualitas bibit tebu secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jumlah subkultur pada kemampuan regenerasi kalus dan ketahanan hidup tanaman pada fase aklimatisasi serta pengaruh media sub-optimal terhadap kemampuan pemulihan proliferasi kalus tebu secara *in vitro*. Daun muda menggulung dan kalus tebu subkultur keempat digunakan sebagai bahan pada penelitian ini. Media dasar yang digunakan adalah media Murashige dan Skoog (MS) dengan penambahan 2,4-D 3 mg/L, air kelapa 10%, dan sukrosa 3% untuk tahap inisiasi, MS dengan penambahan BAP 2 mg/L, IAA 0,2 mg/L, air kelapa 10%, dan sukrosa 3% untuk tahap regenerasi. Penelitian pengaruh jumlah subkultur terdiri dari 3 tahap, yaitu inisiasi, regenerasi, dan aklimatisasi, sedangkan penelitian media sub-optimal menggunakan enam media perlakuan dan dua alur subkultur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa subkultur kelima menghasilkan kalus bersifat embrioid (91%), kalus tidak berlendir tertinggi (97%), dan abnormalitas tertinggi (6%). Percobaan pemberian media sub-optimal menunjukkan bahwa alur B, yaitu pemberian fase istirahat 4 minggu lebih baik dibandingkan dengan alur A, yaitu pemberian fase istirahat 8 minggu berdasarkan bobot basah dan persentase abnormalitas kalus. Pada alur A dan B, pertumbuhan kalus dapat pulih saat ditumbuhkan kembali pada media normal dan perlakuan media sub-optimal 1,5D-MS memperlihatkan pertumbuhan dan penampilan kalus paling baik.

[Kata kunci: tebu, subkultur, medium sub-optimal, kultur *in vitro*.]

<sup>\*)</sup> Penulis korespondensi: hmiskan@yahoo.com

## Pendahuluan

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman bernilai ekonomi tinggi sebagai sumber utama penghasil gula. Selain itu, tebu juga merupakan salah satu bahan baku yang banyak digunakan sebagai bahan pembuat bioetanol (Prastowo, 2007). Dalam upaya mencapai sasaran program swasembada gula diperlukan bibit tebu unggul dalam jumlah besar. Pengadaan bibit tanaman tebu dalam jumlah besar pada waktu singkat akan sulit dicapai melalui teknik konvensional. Salah satu faktor rendahnya tingkat produktivitas tebu secara konvensional akibat proses degenerasi klonal tanaman dan berjangkitnya penyakit sistemik laten yang gejalanya sulit dideteksi. Penyakit tersebut dapat disebabkan oleh mikoplasma, bakteri, virus, jamur, dan organisme pengganggu lainnya (Naz et al., 2008a).

Teknik kultur jaringan merupakan cara perbanyak klonal tanaman yang memiliki beberapa keunggulan, diantaranya perbanyak klon secara cepat, menghasilkan keseragaman genetik (Zulkarnain, 2009), bibit yang baik dan bebas penyakit, serta dapat digunakan untuk penyimpanan plasma nutfah (Pence, 2010). Kultur jaringan dapat dilakukan melalui organogenesis maupun embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik merupakan proses dimana sel somatik berkembang membentuk tumbuhan baru melalui tahap perkembangan embrio spesifik (Hadipoentiyanti et al., 2008). Hasil penelitian menunjukkan beberapa tanaman sudah diperbanyak melalui embriogenesis somatik dan dapat tumbuh dengan baik antara lain, sagu (Sumaryono & Riyadi 2009), kelapa sawit (Sumaryono et al., 2007), dan tebu (Naz et al., 2008b; Khan et al., 2009).

Fungsi dari setiap teknik yang dirancang untuk penyimpanan plasma nutfah tanaman adalah melestarikan keanekaragaman genetik tanaman untuk digunakan di masa yang akan datang (Pence, 2010). Penyimpanan secara *in vitro* dilakukan melalui penyimpanan jangka pendek, jangka pendek dan menengah, serta jangka panjang (Bermawie & Kristina, 2003). Penyimpanan jangka pendek merupakan cara pemeliharaan dengan melakukan pemindahan tanaman (subkultur) secara rutin pada media baru agar tanaman tetap hidup. Penyimpanan jangka pendek dan menengah merupakan cara pemeliharaan dengan memperlambat pertumbuhan. Cara ini dilakukan dengan memanipulasi suhu, memberi zat penghambat tumbuh (paclobutrazol, asam absisat (ABA), ancymidol), mengurangi garam-garam anorganik (unsur makro) dan ZPT yang bersifat promotor (auksin, giberelin, sitokinin), serta menggunakan regulator osmotik (sorbitol, manitol) (Widyastuti, 2000). Cara ini tetap membutuhkan pemindahan pada media baru tetapi frekuensi pemindahannya lebih rendah di-

bandingkan dengan penyimpanan jangka pendek. Penyimpanan jangka panjang dilakukan dengan cara kriopreservasi dimana proses metabolisme dari sel, jaringan maupun organ yang disimpan dihentikan sehingga tidak ada proses pertumbuhan (Widyastuti, 2000).

Keuntungan penyimpanan secara *in vitro* antara lain menghambat pertumbuhan material tanaman sehingga frekuensi subkultur lebih jarang yang dapat menghemat biaya, waktu, dan tenaga (Wulandari & Ermayanti, 2010). Hasil penelitian menunjukkan beberapa tanaman berhasil disimpan secara *in vitro* melalui pertumbuhan minimal, yaitu jahe merah berhasil disimpan selama 5 minggu (Ermayanti et al., 2010) dan temulawak yang dapat disimpan selama 7 bulan (Syahid, 2007). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh jumlah subkultur pada kemampuan regenerasi kalus dan ketahanan hidup tanaman pada fase aklimatisasi, serta pengaruh media sub-optimal terhadap kemampuan pemulihan (*recovery*) proliferasi kalus tebu secara *in vitro*.

## Bahan dan Metode

Penelitian terdiri atas 2 kegiatan, yaitu mempelajari pengaruh jumlah subkultur terhadap kemampuan regenerasi kalus dan ketahanan hidup tanaman pada fase aklimatisasi serta pengaruh pemberian media sub-optimal terhadap kemampuan pemulihan proliferasi kalus.

### Bahan tanam

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biak Sel dan Mikropropagasi Tanaman, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Bogor. Sumber eksplan berasal dari daun tebu yang masih menggulung dari varietas PS881 yang berumur sekitar 4-6 bulan. Pucuk tebu dipotong tepat di atas meristem sepanjang 30 cm. Potongan pucuk ini disterilisasi dengan cara dicelupkan dalam alkohol 96% kemudian dilewatkan di atas nyala api.

### A. Pengaruh jumlah subkultur

#### Persiapan dan pembuatan media

Media yang digunakan disesuaikan dengan prosedur baku yang dikembangkan oleh Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI), Pasuruan. Larutan baku sesuai dengan takaran, air kelapa 100 ml, zat pengatur tumbuh (ZPT) 2,4-D 3 mg/L, dan gula pasir 30 mg/L dicampur hingga rata.

#### Inisiasi dan proliferasi kalus

Eksplan steril dengan diameter dan panjang 1 cm ditanam pada media MS dengan penambahan 2,4-D sebanyak 3 mg/L (MS 1). Eksplan dipelihara selama 4 minggu di ruang kultur tanpa cahaya

dengan suhu berkisar  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ . Setelah 4 minggu, eksplan yang tumbuh baik disubkultur pada media MS 1 baru. Setiap subkultur, sebagian kalus diteruskan ke subkultur berikutnya pada media MS 1 hingga subkultur kelima dan sebagian lainnya dilanjutkan ke tahap regenerasi kalus. Bobot basah kalus yang disubkultur ditimbang saat awal sebesar 0,05 g dan saat akhir dari subkultur. Penimbangan dilakukan secara aseptik di dalam LAF. Kalus terlebih dahulu diambil dan disisihkan dari media kemudian diletakkan dalam cawan Petri steril yang tertutup dan ditimbang di neraca yang terlebih dahulu juga disterilkan dengan alkohol. Inisiasi dan proliferasi kalus dilakukan sebanyak 3 ulangan dengan masing-masing sebanyak 30 botol.

#### Regenerasi kalus

Kalus yang berasal dari tahap proliferasi di media MS 1 kemudian dipindahkan ke media regenerasi (MS 2), yaitu media MS dengan penambahan IAA 2 mg/L dan BAP 0,2 mg/L. Kultur dipelihara di ruangan bersuhu  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , intensitas cahaya sebesar  $15 \mu\text{mol foton/m}^2/\text{detik}$  dengan periode penyinaran 12 jam selama 4 minggu. Tunas yang terbentuk selanjutnya disubkultur ke media regenerasi cair selama 4 minggu di dalam tabung untuk pemanjangan akar yang sudah terbentuk dalam media MS 2 padat. Bobot basah kalus yang disubkultur ditimbang masing-masing sebesar 0,05 g dan 4 minggu kemudian ditimbang kembali.

#### Aklimatisasi

Planlet yang diaklimatisasi adalah planlet yang telah dikulturkan pada media regenerasi cair selama 4 minggu dengan tinggi sekitar 15 cm dan pertumbuhan akar yang baik (jumlah akar lebih dari 5). Planlet ditanam pada media campuran tanah, pasir dan pupuk kandang dengan perbandingan 1:1:1 dalam *polybag*. Sebelum ditanam, planlet dicuci bersih dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan sisa-sisa media yang menempel. *Polybag* berisi planlet selanjutnya dipelihara di bawah sungkup yang ternaungi selama

2 minggu. Setelah 2 minggu, sungkup secara berangsur-angsur dibuka dan setelah itu, tanaman dapat dipindah ke lapang.

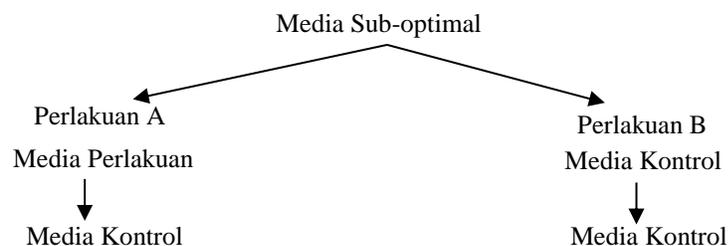
Pengamatan deskriptif pengaruh jumlah subkultur dilakukan dengan cara *random sampling* yang meliputi persentase kultur dengan kondisi kalus kering dan berlendir, kalus bersifat embrioid, abnormalitas kalus, dan warna kalus, persentase kultur yang beregenerasi, abnormalitas tunas, waktu munculnya tunas, dan warna tunas. Bobot basah kalus pada media MS 1 dan MS 2 diperoleh dari seluruh ulangan. Fase aklimatisasi diamati melalui persentase ketahanan hidup planlet.

#### B. Pengaruh media sub-optimal terhadap kemampuan kembalinya proliferasi kalus

Sebagian kalus yang telah mengalami 4 kali subkultur diberi media sub-optimal, yaitu dengan menurunkan jumlah 2,4-D dan hara makro. Perlakuan media sub-optimal yang diberikan yaitu :

- Kontrol : (3D-MS) 3 mg/L 2,4-D + hara makro
- (1,5D-MS) : 1,5 mg/L 2,4-D + hara makro
- (0D-MS) : 0 mg/L 2,4-D + hara makro
- (3D-0,5 MS) : 3 mg/L 2,4-D + 0,5 hara makro
- (1,5D-0,5 MS) : 1,5 mg/L 2,4-D + 0,5 hara makro
- (0D-0,5 MS) : 0 mg/L 2,4-D + 0,5 hara makro

Untuk mengetahui kemampuan berproliferasi kalus di media sub-optimal, sebagian kalus menjalani periode dua kali empat minggu (8 minggu) di media perlakuan yang sama, yaitu pada subkultur pertama dan kedua, kemudian kalus dipindahkan ke media kontrol pada subkultur ketiga (Perlakuan A). Sebagian lainnya menjalani periode satu kali empat minggu (4 minggu) di media perlakuan yang sama, kemudian dipindahkan ke media kontrol pada subkultur kedua dan ketiga (Perlakuan B) (Gambar 1). Kultur dipelihara di ruang gelap dengan suhu  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ . Bobot basah kalus yang disubkultur ditimbang saat awal sebesar 0,5 g dan saat akhir masing-masing subkultur dilakukan penimbangan kembali.



Gambar 1. Diagram alir metode pengaruh media sub-optimal terhadap kemampuan kembalinya proliferasi kalus  
 Figure 1. Pathway of the sub-optimum media effect on reactivation of callus proliferation

Pengamatan deskriptif pengaruh media sub-optimal dilakukan dengan cara *random sampling* yang meliputi persentase kultur dengan kondisi kalus kering dan berlendir, abnormalitas kalus, dan warna kalus. Bobot basah kultur diperoleh dari seluruh ulangan.

#### *Analisis data*

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Pengolahan data dilakukan dengan *analysis of variance* (ANOVA) menggunakan program *statistical product and service solutions* 16 (SPSS 16). Analisis beda nyata antar-perlakuan dilakukan dengan *Duncan's new multiple range test* (DMRT) pada taraf 5%.

### **Hasil dan Pembahasan**

#### *A. Pengaruh jumlah subkultur*

##### *Inisiasi dan proliferasi kalus*

Inisiasi dan proliferasi kalus tebu pada media MS 1 pada subkultur yang berbeda menghasilkan pertumbuhan kalus yang bervariasi (Tabel 1). Persentase kultur dengan kondisi kalus kering dan berlendir tidak berbeda nyata antar subkultur, meskipun ada kecenderungan meningkatnya subkultur akan meningkatkan persentase kalus kering (Tabel 1). Persentase kultur kalus bersifat embrioid menunjukkan hasil yang berbeda nyata antar subkultur. Persentase kultur kalus bersifat embrioid menunjukkan bahwa mulai subkultur kedua terjadi peningkatan yang besar; dan subkultur kelima memberikan hasil tertinggi, yaitu 91%. Kalus bersifat embrioid dicirikan dengan bentuk bulat, kompak, dan berwarna putih (Gambar 2a). Hal ini didasarkan pada penelitian Ho dan Vasil (1983) yang mengklasifikasikan kalus menjadi 3 tipe dengan potensi morfogenetik yang bervariasi, yaitu kalus kompak, kalus remah, dan kalus berlendir.

Selain kalus yang bersifat embrioid, terdapat juga kalus dengan kondisi yang basah atau berlendir dan berwarna kecoklatan. Pada penelitian ini, kalus jenis ini akan menghitam dan kemudian mati. Kondisi tersebut diakibatkan adanya ekskresi senyawa fenolik oleh kalus. Senyawa fenolik pada tumbuhan memiliki fungsi sebagai fungisida dan bakterisida yang melindungi tanaman dari serangan cendawan dan bakteri. Senyawa fenolik biasanya tertimbun di sekitar daerah perlukaan. Ekskresi senyawa fenolik dapat merugikan karena menghambat pembelahan sel, pembesaran sel, pertumbuhan dan perkecambahan biji (Wattimena 1988).

Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin yang umum digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus dan embriogenesis somatik

dalam kultur jaringan (Wattimena, 1988). Hasil penelitian lainnya menunjukkan bahwa penggunaan konsentrasi 2,4-D sebesar 3 mg/L menghasilkan induksi kalus yang baik pada tanaman tebu varietas HSF-243 dan HSF-245 (Naz et al., 2008b), serta varietas THATTA-10 (Khan et al., 2009). Dalam penelitian ini terlihat bahwa penggunaan ZPT 2,4-D sebesar 3 mg/L berpengaruh dalam penggandaan kalus dan kalus yang bersifat embrioid serta pembentukan kalus abnormal.

Hasil penelitian ini menunjukkan hingga subkultur kelima, persentase kultur dengan kondisi kalus kering dan kalus yang bersifat embrioid mengalami peningkatan. Akan tetapi, abnormalitas kalus yang dihasilkan juga meningkat yaitu mencapai 6% pada subkultur ke-5. Kalus abnormal pada penelitian ini ditandai dengan tumbuhnya jaringan menyerupai bakal tunas atau bakal akar yang tidak semestinya di permukaan kalus tersebut (Gambar 2b). Kemampuan kalus maupun tunas untuk beregenerasi berbeda-beda bagi setiap tanaman. Pada tanaman jeruk adanya subkultur berulang tidak mengurangi kemampuan proliferasi kalus serta morfologinya (Wulansari et al., 2015). Sementara itu pada tanaman pisang, daya multiplikasi tunas saat disubkultur cenderung meningkat hingga subkultur ke-6 (Semarayani & Dinarti, 2012). Zulkarnain (2009) menyatakan bahwa penggunaan 2,4-D dalam kultur *in vitro* meningkatkan peluang terjadinya variasi genetik dan menghambat tanaman untuk beregenerasi yang salah satunya disebabkan oleh subkultur berulang. Variasi genetik yang terjadi dapat berupa variasi somaklonal yang dapat menghasilkan keragaman yang diwariskan, yaitu yang dikendalikan secara genetik, dan keragaman yang tidak diwariskan, atau epigenetik (Yunita, 2007).

Rata-rata bobot basah kultur menunjukkan hasil yang berbeda nyata antar subkultur. Rata-rata bobot basah kalus paling tinggi diperoleh pada subkultur kedua, yaitu sebesar 2,48 gram. Gambar 3 menunjukkan rata-rata bobot basah kalus meningkat pada subkultur kedua, tetapi mengalami penurunan pada subkultur berikutnya.

##### *Regenerasi kalus*

Sebagian kalus dipindahkan ke media regenerasi (MS 2). Jumlah subkultur memberikan hasil bervariasi terhadap tingkat regenerasi kultur (Tabel 2). Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase kultur yang mampu beregenerasi sama pada setiap subkultur, kecuali pada subkultur kedua terdapat kalus yang tidak dapat beregenerasi sebesar 16%. Waktu kemunculan tunas berkisar antara satu hingga tiga minggu, dan pertumbuhan tunas tercepat terjadi pada subkultur pertama, yaitu minggu pertama setelah subkultur. Tahap awal

munculnya tunas ditandai dengan bintik merah keunguan pada kalus, kemudian berubah menjadi warna hijau hingga terbentuk tunas. Pada umumnya setelah tunas terbentuk kemudian disertai tumbuhnya akar.

Persentase abnormalitas tunas paling tinggi pada subkultur kelima, yaitu sebesar 30%, sedangkan persentase terendah terlihat pada subkultur pertama, yaitu sebesar 4%. Hal ini menunjukkan semakin banyak jumlah subkultur, frekuensi dan jumlah tunas yang bulai (berwarna putih) meningkat. Tunas yang bulai dikatakan sebagai abnormal (Gambar 4). Tunas bulai tersebut tidak dipindahkan ke media regenerasi cair. Kalus pada fase regenerasi dari tiap subkultur menghasilkan tunas berwarna hijau.

Rata-rata bobot basah kultur pada akhir tiap-tiap subkultur menunjukkan bahwa yang tertinggi terjadi saat subkultur pertama sebesar 2,5 g (Gambar 3), lalu menurun pada subkultur kedua, kemudian

meningkat lagi pada subkultur berikutnya. Pada saat subkultur, tunas berakar yang tumbuh baik pada MS 2 padat dipindahkan ke media MS 2 cair untuk pemanjangan akar. Tunas pada subkultur keempat dan kelima tidak dipindahkan ke media MS 2 cair karena setelah empat minggu, pertumbuhannya masih lambat. Selanjutnya, jumlah kultur berakar terbesar pada MS 2 cair yang layak dipindahkan ke fase aklimatisasi dihasilkan pada subkultur pertama, yaitu 94%, sedangkan pada subkultur kedua dan ketiga sebesar 91% dari jumlah seluruh kultur berakar di setiap tahap subkultur tersebut.

Waktu kemunculan tunas tercepat terjadi pada subkultur pertama, yaitu minggu pertama setelah subkultur. Pada subkultur keempat dan kelima tunas mengalami pertumbuhan lambat pada media MS 2 padat sehingga tidak dipindahkan ke media MS 2 cair untuk pemanjangan akar. Pertumbuhan dan perkembangan dapat dipengaruhi oleh interaksi dan

Tabel 1. Pertumbuhan kalus pada fase inisiasi dan proliferasi kalus pada media MS 1

Table 1. Callus growth of initiation and proliferation phases on MS1 media

Subkultur ke- <i>No of Subculture</i>	Kultur dengan kondisi kalus (%) <i>Culture with callus condition (%)</i>		Kultur kalus bersifat embrioid (%) <i>Embryogenic Callus culture (%)</i>	Abnormalitas kalus (%) <i>Callus abnormality (%)</i>	Warna kalus <i>Callus colour</i>
	Kering <i>Dry</i>	Berlendir <i>Slimy</i>			
1	90 a*	10 a	18 a	12:00 AM	Putih kekuningan
2	92 a	8 a	62 b	1 ab	Putih
3	92 a	8 a	76 b	3 abc	Putih
4	94 a	6 a	85 b	3 abc	Putih
5	97 a	3 a	91 b	6 c	Putih

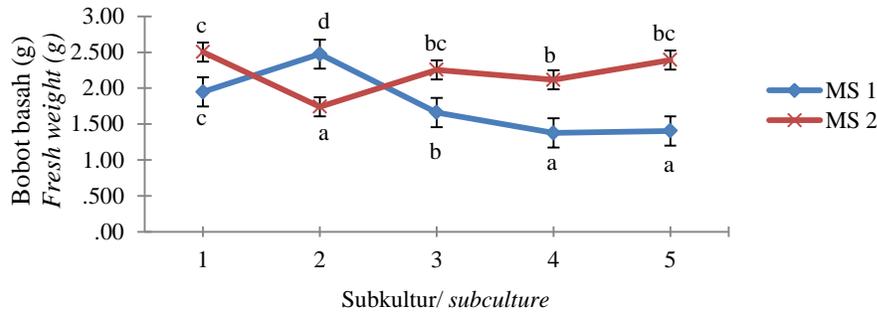
\* Angka pada kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%

\*) Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P= 0.05.

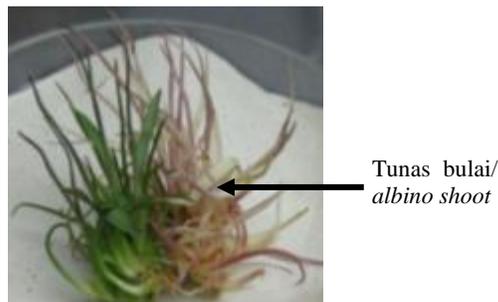


Gambar 2. Morfologi kalus pada fase inisiasi dan proliferasi pada media MS 1 (a) kalus bersifat embrioid, (b) kalus abnormal yang ditumbuhi jaringan menyerupai bakal tunas.

Figure 2. Callus morphology at the initiation and proliferation stages on MS1 media (a) embryogenic calli, (b) abnormal calli growth with shoot-like tissue.



Gambar 3. Rata-rata bobot basah kalus tebu pada media MS 1 dan MS 2 dengan jumlah subkultur yang berbeda.  
 Figure 3. Average fresh weight of sugarcane callus on MS1 and MS2 media with different numbers of subculture.



Gambar 4. Tunas abnormal pada tahap regenerasi pada media MS 2.  
 Figure 4. Abnormal shoots at regeneration phase on MS2 media.

Tabel 2. Fase regenerasi pada MS 2 padat dari kalus di MS 1  
 Table 2. Regeneration phase on solid MS2 from MS1 media

Dari subkultur pada MS 1 <i>From subculture on MS 1</i>	Kultur yang beregenerasi (%) <i>Regenerated culture (%)</i>	Munculnya tunas (minggu) <i>Shoots emerged (week)</i>	Tunas abnormal (%) <i>Abnormal shoots (%)</i>	Warna kalus <i>Callus colour</i>
1	100	1	4 a <sup>*)</sup>	Hijau
2	84	3	8 ab	Hijau
3	100	2	9 ab	Hijau
4	100	3	11ab	Hijau
5	100	2	30 b	Hijau

<sup>\*)</sup>Angka dalam kolom yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan,  $\alpha = 0,05$ .

<sup>\*)</sup>Means on column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$ .

keseimbangan antara ZPT eksogen dengan ZPT yang diproduksi secara endogen. Nisbah penggunaan auksin dan sitokinin memiliki peran dalam pengaturan pembelahan, pemanjangan, dan diferensiasi sel serta pembentukan organ (Zulkarnain, 2009). Keseimbangan penggunaan auksin dan sitokinin merupakan kunci keberhasilan perbanyak tanaman secara *in vitro*.

**Aklimatisasi**

Planlet yang diaklimatisasi adalah planlet yang telah dikulturkan pada media MS 2 cair selama 4

minggu dengan tinggi sekitar 15 cm dan memiliki perakaran yang baik (akar lebih dari 5). Planlet yang berhasil diaklimatisasi hanya planlet yang berasal dari subkultur pertama hingga ketiga. Hasil aklimatisasi menunjukkan persentase ketahanan hidup yang kurang lebih sama pada masing-masing subkultur yang diamati selama empat minggu dalam fase aklimatisasi, yaitu berkisar 54% hingga 58% (Tabel 3).

Aklimatisasi merupakan suatu upaya penyesuaian fisiologis atau adaptasi suatu organisme terhadap lingkungan baru melalui

campur tangan manusia dalam mengarahkan proses penyesuaian tersebut (Zulkarnain, 2009). Persentase hidup tanaman tertinggi didapat pada subkultur pertama, yaitu 58% dari 153 planlet. Kematian planlet saat aklimatisasi dapat disebabkan oleh faktor lingkungan, yaitu kelembaban udara, suhu, dan intensitas cahaya. Kelembaban yang rendah dapat mengakibatkan kematian pada planlet.

*B. Pengaruh media sub-optimal terhadap kemampuan proliferasi kalus*

Metode kultur jaringan selain dapat menunjang produksi bibit juga dapat dimanfaatkan untuk penyimpanan dan pelestarian plasma nutfah. Melalui kultur jaringan, penyimpanan dapat dilakukan secara *in vitro* dengan biaya yang relatif rendah dan risiko kepunahan akan lebih kecil karena kondisi lingkungan dapat dikendalikan (Darwis *et al.*, 1991). Penyimpanan secara *in vitro* dipengaruhi oleh media tanam yang digunakan, lingkungan tumbuh dan periode subkultur (Bermawie & Kristina, 2003).

Pada subkultur pertama, persentase kultur dengan kondisi kalus kering pada media perlakuan 0D-MS (100%) menunjukkan hasil berbeda nyata dibandingkan dengan media perlakuan 3D-0,5MS (33,3%) dan 1,5D-0,5MS (33,3%) (Tabel 4 dan 5). Abnormalitas kalus pada penelitian ini adalah kalus yang ditumbuhi jaringan menyerupai bakal tunas atau bakal akar. Kalus yang membentuk jaringan menyerupai bakal tunas tertinggi diperoleh pada media perlakuan 3D-MS (kontrol) sebesar 50%, sedangkan jaringan yang menyerupai bakal akar hanya terbentuk pada media perlakuan 0D-MS (100%) (Gambar 5c) dan 0D-0,5MS (100%)

(Gambar 5f). Pada penelitian ini, media MS menghasilkan abnormalitas tunas lebih besar dibandingkan dengan media 0,5 MS, media tanpa 2,4 D (0D) menghasilkan persentase kalus kering yang lebih besar, tetapi abnormalitas tunas dan terutama akar juga lebih besar. Abnormalitas kalus diduga diakibatkan oleh adanya variasi genetik yang disebut variasi somaklonal. Yunita (2009) mengemukakan bahwa variasi somaklonal yang terjadi dalam kultur jaringan merupakan hasil kumulatif dari mutasi genetik pada eksplan dan yang diinduksi pada kondisi *in vitro*.

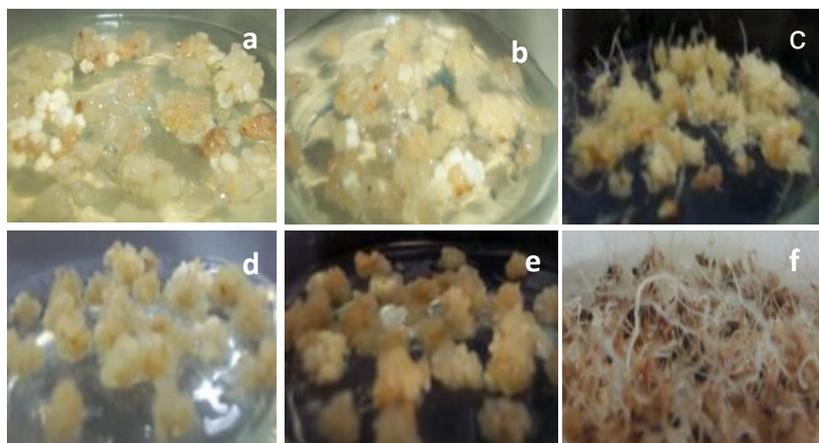
Tabel 3. Persentase ketahanan hidup tanaman saat aklimatisasi

Table 3. Percentage of survival plantlets after acclimatisation

Sub-kultur	Jumlah planlet yang di aklimatisasi	Ketahanan hidup (%)
Sub-culture	Number of acclimatized plantlets	Survival (%)
1	153	58
2	41	54
3	49	57
4	Td/nd*	Td/nd*
5	Td/nd*	Td/nd*

\* td = Tidak dilakukan aklimatisasi karena pada MS 2 padat tunas tumbuh lambat (belum berakar)

\* nd = acclimatization are not done because shoots grown slowly on solid MS2 medium (not yet rooted)



Gambar 5. Morfologi kalus subkultur pertama pada berbagai media perlakuan (a) 3D-MS, (b) 1,5D-MS, (c) 0D-MS, (d) 3D-0,5MS, (e) 1,5D-0,5MS, (f) 0D-0,5MS.

Figure 5. Morphology of calli of the first subculture on various treated media (a) 3D-MS, (b) 1.5D-MS, (c) 0D-MS, (d) 3D-0.5MS, (e) 1.5D-0.5MS, (f) 0D-0.5MS.

Tabel 4. Alur A pengaruh hara makro dan 2,4-D terhadap persentase penampilan kalus dan abnormalitas kultur pada berbagai media perlakuan dan tahapan subkultur

Table 4. Pathway A the effect of macro nutrients and 2,4-D on percentage callus performance and culture abnormality on various treated media and subculture stages

Subkultur Subculture	Perlakuan Treatment	Kultur dengan kondisi kalus (%) Culture with callus condition (%)		Abnormalitas kalus (%) Callus abnormality (%)		Warna Colour	
		Kering Dry	Berlendir Slimy	Tunas Shoot	Akar Root		
1	3D-MS	66,7 ab*	33,3 ab	50	0	Kuning	
	1,5D-MS	50 ab	50 ab	16,7	0	Kuning	
	0D-MS	100 b	0 a	33,3	100	Kuning	
	3D-0,5MS	33,3 a	66,7 b	0	0	Kuning	
	1.5D-0,5MS	33,3 a	66,7 b	0	0	Kuning	
	0D-0,5MS	83,3ab	16,7 ab	16,7	100	Kecoklatan	
2	A	3D-MS	83,3 a	16,7 a	50	0	Kuning
		1,5D-MS	83,3 a	16,7 a	33,3	0	Kuning
		0D-MS	83,3 a	16,7 a	0	33,3	Coklat
		3D-0,5MS	50 a	50 a	0	0	Kuning
		1,5D-0,5MS	50 a	50 a	0	0	Kuning
		0D-0,5MS	83,3 a	16,7 a	0	50	Hitam
3	A	3D-MS	66,7 a	33,3 a	50	0	Kuning
		3D-MS	66,7 a	33,3 a	0	0	Kuning
		3D-MS	83,3 a	16,7 a	0	50	Hitam
		3D-MS	66,7 a	33,3 a	0	0	Kuning
		3D-MS	66,7 a	33,3 a	50	0	Kuning
		3D-MS	83,3 a	16,7 a	0	50	Hitam

\*Angka dalam kolom yang sama pada masing-masing kelompok dan diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada  $\alpha = 0,05$ .

\*) Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$ .

Kalus yang diberikan fase istirahat diharapkan pertumbuhannya tidak terlalu cepat yang dicerminkan dengan perubahan bobot basah yang rendah. Pertumbuhan yang lambat menyebabkan kandungan unsur hara pada media tumbuh tidak cepat menurun sehingga subkultur dapat dilakukan lebih lama (Megia et al., 2008).

Pada perlakuan A, subkultur kedua dan ketiga menghasilkan persentase kultur dengan kondisi kalus kering dan persentase kultur dengan kondisi kalus berlendir yang tidak berbeda nyata antar perlakuan (Tabel 4). Pada subkultur kedua dan ketiga, persentase abnormalitas kalus yang menyerupai jaringan bakal tunas pada media perlakuan 3D-MS tidak mengalami perubahan, yaitu masing-masing sebesar 50%. Pada subkultur kedua, persentase abnormalitas kalus yang menyerupai bakal akar pada media perlakuan 0D-MS dan 0D-0,5MS mengalami penurunan menjadi 33% dan 50%. Pada subkultur ketiga, persentase abnormalitas kalus yang menyerupai bakal akar meningkat pada media perlakuan 0D-MS menjadi 50% dan tetap pada media 0D-0,5MS. Kalus pada

semua media perlakuan menunjukkan warna yang sama, yaitu kuning, kecuali pada kalus yang berasal dari media perlakuan 0D-MS (Gambar 5c dan 6c) dan 0D-0,5MS (Gambar 5f dan 6f) yang berwarna kecoklatan hingga hitam.

Kondisi kalus dan tingkat abnormalitas kalus perlakuan B menunjukkan hasil yang bervariasi (Tabel 5). Akan tetapi dari hasil terlihat bahwa pengurangan 50% dosis 2,4-D tidak berpengaruh secara nyata terhadap terbentuknya kalus kering (normal) dan basah. Sedangkan tanpa ZPT 2,4-D terlihat terbentuknya tunas dan akar abnormal memiliki persentase tertinggi, Kalus yang dihasilkan pada semua media perlakuan menunjukkan warna yang sama, yaitu kuning, kecuali pada kalus yang berasal dari media perlakuan 0D-MS (Gambar 7c dan 8c) dan 0D-0,5MS (Gambar 7f dan 8f) yang berwarna kecoklatan hingga hitam. Pada perlakuan B, media MS lebih banyak menghasilkan abnormalitas tunas dibandingkan dengan media 0,5 MS, setidaknya pada subkultur 1 dan 2. Media 0D cenderung menghasilkan abnormalitas akar lebih besar.

Tabel 5. Perlakuan B, pengaruh hara makro dan ZPT 2,4-D terhadap persentase penampilan kalus dan abnormalitas kultur pada berbagai media perlakuan dan tahapan subkultur

Table 5. Treatment B, the effect of macro nutrients and 2,4-D on percentage callus performance and culture abnormality on various treated media and subculture stages

Subkultur Subculture	Perlakuan Treatment	Kultur dengan kondisi kalus (%) *		Abnormalitas kalus (%)		Warna Colour	
		Culture with callus condition (%)		Callus abnormality (%)			
		Kering Dry	Berlendir Slimy	Tunas Shoot	Akar Root		
1	3D-MS	66,7 ab	33,3 ab	50	0	Kuning	
	1,5D-MS	50 ab	50 ab	16,7	0	Kuning	
	0D-MS	100 b	0 a	33,3	100	Kuning	
	3D-0,5MS	33,3 a	66,7 b	0	0	Kuning	
	1.5D-0,5MS	33,3 a	66,7 b	0	0	Kuning	
	0D-0,5MS	83,3ab	16,7 ab	16,7	100	Kecoklatan	
2	B	3D-MS	100 b	0 a	50	0	Kuning
		3D-MS	83,3 ab	16,7 ab	33,3	0	Kuning
		3D-MS	66,7 ab	33,3 ab	0	16,7	Kecoklatan
		3D-MS	33,3 a	66,7 b	16,7	0	Kuning
		3D-MS	66,7 ab	33,3 ab	16,7	0	Kuning
		3D-MS	83,3 ab	16,7 ab	0	33,3	Hitam
3	B	3D-MS	100 a	0 a	0	0	Kuning
		3D-MS	66,7 a	33,3 a	0	0	Kuning
		3D-MS	66,7 a	33,3 a	0	0	Kuning
		3D-MS	50 a	50 a	0	0	Kuning
		3D-MS	50 a	50 a	0	0	Kuning
		3D-MS	83,3 a	16,7 a	0	33,3	Hitam

\*Angka dalam kolom yang sama pada masing-masing kelompok dan diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan,  $\alpha = 0,05$ .

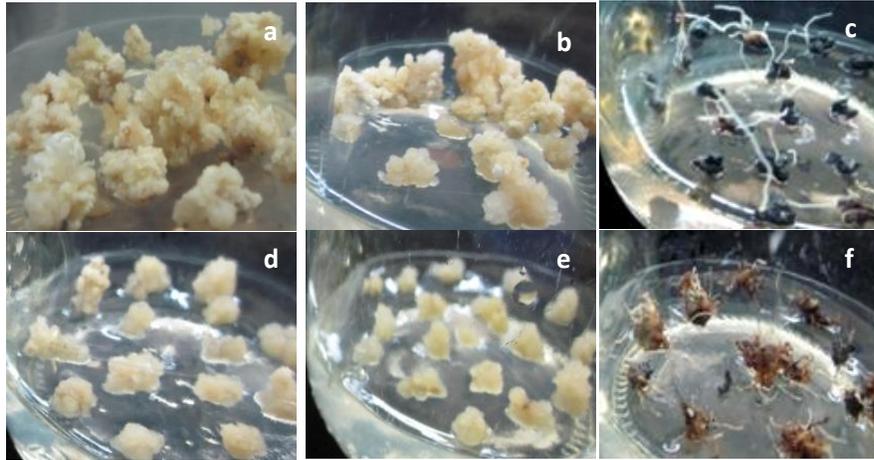
<sup>a)</sup>Means on column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at  $P = 0.05$ .

Perlakuan media yang diberikan setelah fase istirahat berpengaruh nyata terhadap rata-rata bobot basah kultur. Gambar 9 menunjukkan bahwa bobot basah kultur perlakuan A pada beberapa media perlakuan menurun saat subkultur kedua, kecuali pada media perlakuan 3D-MS (kontrol) yang semakin besar bobot basahnya, yaitu berturut-turut dari 2,11 g, 3,18 g, serta 3,71 g. Bobot basah kultur meningkat setelah ditumbuhkan kembali ke media normal pada subkultur ketiga, kecuali pada media yang berasal dari 0D dengan MS dan 0,5 MS.

Pada subkultur kedua, bobot basah kultur perlakuan B meningkat pada semua media perlakuan, kecuali pada media perlakuan 0D-0,5MS. Pada subkultur ketiga, bobot basah kalus masih meningkat, tetapi kultur dari media perlakuan 0D-MS dan 0D-0,5MS mengalami penurunan bobot basah kultur (Gambar 10). Bobot basah kultur yang diperoleh berbeda nyata antar perlakuan. Bobot basah kultur tertinggi dari subkultur pertama hingga ketiga diperoleh dari

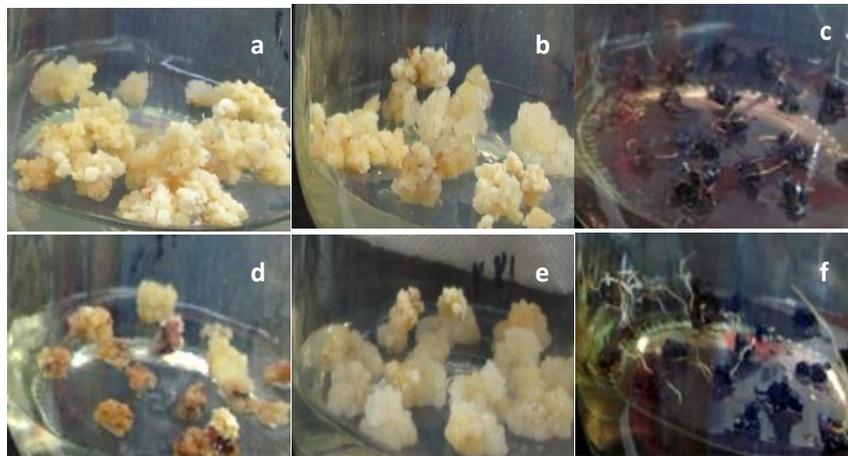
media perlakuan 3D-MS (kontrol) masing-masing sebesar 2,11 g, 3,12 g, serta 3,50 g.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar media perlakuan yang diberikan pada perlakuan A dan B memiliki rata-rata bobot basah kultur yang mengalami peningkatan setelah ditumbuhkan kembali pada media normal. Perlakuan B lebih baik dibandingkan dengan perlakuan A berdasarkan bobot basah kultur dan abnormalitas kalus, sedangkan pada persentase penampilan kalus dengan kondisi kering dan berlendir, perlakuan A dan B menunjukkan hasil yang relatif sama. Hal ini menunjukkan kalus dapat pulih kembali setelah diberi fase istirahat. Pada kedua perlakuan subkultur, kalus dari perlakuan media sub-optimal 1,5D-MS, 3D-0,5MS, dan 1,5D-0,5MS menunjukkan pemulihan pertumbuhan terbaik ditinjau dari bobot basah. Namun bila dilihat dari penampilan kalus, perlakuan 1,5D-MS lebih kering (tidak berlendir) sehingga dapat diharapkan kalus tersebut kemudian akan mampu beregenerasi kembali menjadi tanaman utuh.



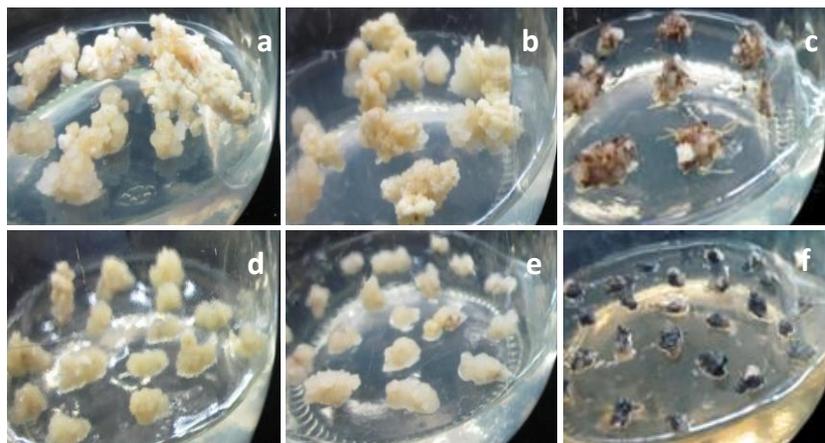
Gambar 6. Morfologi kalus tebu perlakuan A pada subkultur kedua di berbagai media perlakuan (a) 3D-MS, (b) 1,5D-MS, (c) 0D-MS, (d) 3D-0,5MS, (e) 1,5D-0,5MS, (f) 0D-0,5MS.

Figure 6. Treatment A the effect of macro nutrients content and 2.4-D on resting phase treatment on percentage callus performance and culture abnormality on various treated media and subculture stages



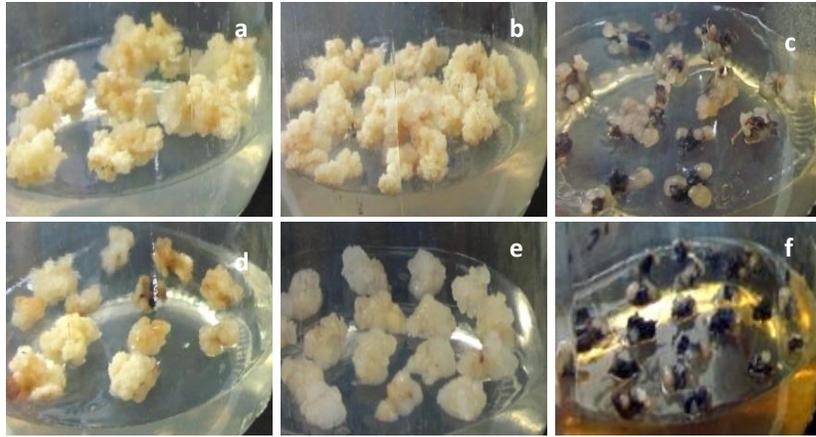
Gambar 7. Morfologi kalus perlakuan A pada subkultur ketiga di berbagai media perlakuan (a) 3D-MS, (b) 1,5D-MS, (c) 0D-MS, (d) 3D-0,5MS, (e) 1,5D-0,5MS, (f) 0D-0,5MS.

Figure 7. Calli morphology of treatment A on 3<sup>rd</sup> subculture on various treated media (a) 3D-MS, (b) 1.5D-MS, (c) 0D-MS, (d) 3D-0.5MS, (e) 1.5D-0.5MS, (f) 0D-0.5MS.



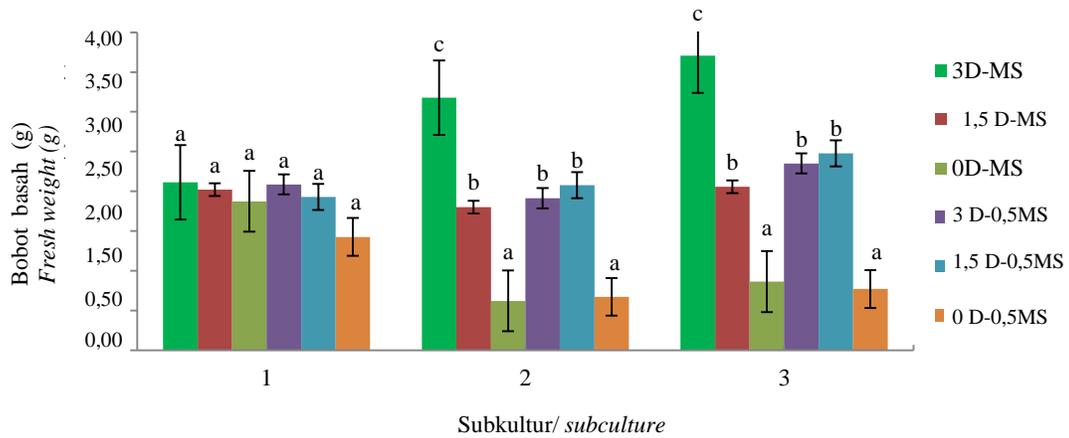
Gambar 8. Morfologi kalus tebu perlakuan B pada subkultur kedua di berbagai media perlakuan (a) 3D-MS, (b) 1,5D-MS, (c) 0D-MS, (d) 3D-0,5MS, (e) 1,5D-0,5MS, (f) 0D-0,5MS.

Figure 8. Calli morphology of treatment B on 2<sup>nd</sup> subculture on various treated media (a) 3D-MS, (b) 1.5D-MS, (c) 0D-MS, (d) 3D-0.5MS, (e) 1.5D-0.5MS, (f)



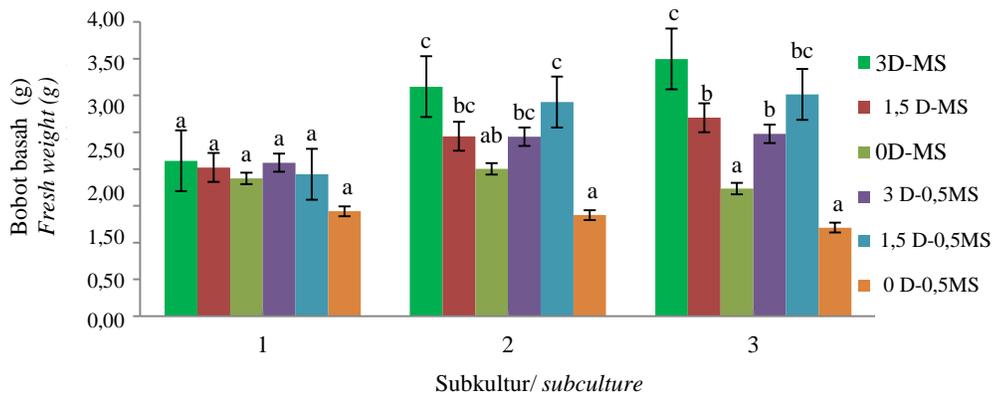
Gambar 9. Morfologi kalus tebu perlakuan B pada subkultur ketiga di berbagai media perlakuan (a) 3D-MS, (b) 1,5D-MS, (c) 0D-MS, (d) 3D-0,5MS, (e) 1,5D-0,5MS, (f) 0D-0,5MS.

Figure 9. Calli morphology of treatment B on 3<sup>rd</sup> subculture on various treated media (a) 3D-MS, (b) 1.5D-MS, (c) 0D-MS, (d) 3D-0.5MS, (e) 1.5D-0.5MS, (f) 0D-0.5MS.



Gambar 10. Rata-rata bobot basah kultur pada perlakuan A.

Figure 10. Average of culture fresh weight on treatment A



Gambar 11. Rata-rata bobot basah kultur pada perlakuan B.

Figure 11. Average of fresh weight culture on treatment B

Secara teori, multiplikasi dapat dilakukan terus menerus selama kondisi eksplan masih baik. Akan tetapi secara sistematis, aplikasi fitoregulator dapat memiliki efek represif sebagai contoh sitokinin, yakni penghambatan pertumbuhan (*growth retardation*), mempercepat proses penuaan dan menurunkan tingkat regenerasi sel (Putranto, komunikasi personal). Siklus pembelahan sel terbagi menjadi empat fase yaitu fase S (sintesis), M (mitosis), G1 (diantara mitosis dan memulai fase S), serta G2 (diantara replikasi dan mitosis) (Perrot-Rechenmann, 2010). Dalam hal ini auksin diketahui berperan penting dalam proses induksi pembelahan sel dan pengendalian siklus sel serta siklus CDK (*cycle dependant kinase*). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa suspensi sel yang tidak diberi auksin mengakibatkan berhentinya pembelahan sel selama beberapa waktu (Perrot-Rechenmann, 2010). Hasil penelitian di atas juga menunjukkan bahwa penghilangan auksin pada media tumbuh berpengaruh dalam penggandaan kalus dan kalus yang bersifat embrioid serta pembentukan kalus abnormal.

### Kesimpulan

Jumlah subkultur mempengaruhi pertumbuhan kalus tebu. Sampai subkultur kelima, persentase kultur dengan kondisi kalus kering, kalus yang bersifat embrioid dan abnormalitas kalus yang dihasilkan meningkat. Sampai subkultur ketiga, pertumbuhan kalus tebu yang dihasilkan masih baik. Pada fase regenerasi, tingkat abnormalitas tunas meningkat sejalan dengan bertambahnya jumlah subkultur. Sedangkan pada fase aklimatisasi tidak menunjukkan perbedaan sampai dengan subkultur ke-3. Setelah kultur pada media suboptimal, pertumbuhan kalus pada alur B (4 minggu fase istirahat) lebih baik jika dibandingkan dengan alur A (8 minggu fase istirahat) berdasarkan bobot basah dan persentase abnormalitas kalus. Rata-rata bobot basah kultur pada perlakuan A dan B menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus dapat pulih lebih cepat saat ditumbuhkan kembali pada media normal. Perlakuan 1,5D-MS menunjukkan pertumbuhan dan penampilan kalus paling baik setelah dipindahkan ke medium normal baik di alur A maupun alur B.

### Daftar Pustaka

- Bermawie N & NN Kristina (2003). Penyimpanan *in vitro* tanaman obat potensial. *Perkemb Tekno TRO* 15,51-60.
- Darwis SN, I Mariska I & Hobir (1991). Kultur jaringan tanaman industri. *Seminar Bioteknologi*

*Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer untuk Industri*; Bogor, 10-11 Des 1991. Bogor: Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor. p.150-160.

- Ermayanti TM, EA Hafiizh, & BW Hapsari (2010). Kultur jaringan jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc.) pada media sederhana sebagai upaya konservasi secara *in vitro*. *Berk Penel Hayati* 4,83-89.
- Hadipoentyanti E, Amalia, Nursalam, Hartati SY, & Suhesti S (2008). Perakitan varietas untuk ketahanan nilam terhadap penyakit layu bakteri. Di dalam: *Industri Minyak Atsiri yang Berkelanjutan: Peluang dan Tantangan*. Prosiding Konferensi Nasional Minyak Atsiri; Surabaya, 2-4 Des 2008. Surabaya: Departemen Perindustrian. P. 17-28.
- Ho WJ & Vasil IK (1983). Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) I. the morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 118,169-180.
- Khan S, A Ather, A Rehman & M Nazir (2009). Optimization of the protocol for callus induction, regeneration, and acclimatization of sugarcane cultivar THATTA-10. *Pak J Bot* 41,815-820.
- Megia R, I Darwati, I Roostika & Juliarni (2008). Konservasi *In Vitro* Tanaman Obat Langka Asli Indonesia *Pimpinella pruatjan* Moik. Secara Pertumbuhan Minimal dan Kriopreservasi untuk Protokol Standar di Bank Gen. [Laporan Penelitian]. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Naz S, A Ali, AF Siddique & J Iqbal (2008a). Rapid clonal multiplication of sugarcane (*Saccharum officinarum*) through callogenesis and organogenesis. *Pak J Bot* 40,123-138.
- Naz S, A Ali & A Siddique (2008b). Somatic embryogenesis and plantlet formation in different varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) HSF-243 and HSF-245. *Sarhad J Agric* 24,593-598.
- Pence VC (2010). The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. *KEW Bull* 65,539-547.
- Perrot-Rechenmann C (2010). Cellular responses to auxin: Division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001446.
- Prastowo B (2007). Potensi sektor pertanian sebagai penghasil dan pengguna energi terbarukan. *Perspektif* 6(2), 84-92.

- Semarayani CIM & D Dinarti (2012). Subkultur berulang tunas *in vitro* pisang kapok unti sayung pada beberapa komposisi media. Pros. Symposium dan Seminar Bersama PERAGI-PERHORTI-PERIPI-HIGI. p. 388-393.
- Sumaryono & I Riyadi (2009). Pengaruh interval dan lama perendaman terhadap pertumbuhan dan pendewasaan embrio somatik tanaman sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.). *Menara Perkebunan* 77,101-110.
- Sumaryono, I Riyadi, PD Kas & G Ginting (2007). Pertumbuhan dan perkembangan kalus embriogenik dan embrio somatik kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) pada sistem perendaman sesaat. *Menara Perkebunan* 75,32-42.
- Syahid SF (2007). Pengaruh retardan paclobutrazol terhadap pertumbuhan temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) selama konservasi *in vitro*. *J Littri* 13,93-97.
- Wattimena GA (1988). *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Widyastuti N (2000). Pelestarian tanaman pangan dengan teknik kultur *in vitro*. *J Tekno Ling* 1, 206-211.
- Wulandari DR & TM Ermayanti (2010). Konservasi *in vitro* nilam (*Pogostemon cablin*, Benth.) dengan perlakuan paclobutrazol. *Berk Penel Hayati* 44,71-76.
- Wulansari A, A Purwito, A Husni, & E Sudarmonowati (2015). Kemampuan regenerasi kalus embriogenik asal nuselus jeruk siam serta variasi fenotipe tunas regeneran. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon.* 1(1),97-104.
- Yunita R (2009). Pemanfaatan variasi somaklonal dan seleksi *in vitro* dalam perakitan tanaman toleran cekaman abiotik. *Jurnal Litbang Pertanian* 28(4), 142-148.
- Zulkarnain (2009). *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta: PT Bumi Aksara.