

INDUKSI KALUS EKSPLAN DAUN LADA (*Piper nigrum* L.) PADA MODIFIKASI MEDIA MS DENGAN PENAMBAHAN HORMON NAA DAN BAP

Afriandi Dwi Kristianto, Titin Setyorini*

Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Stiper, Yogyakarta
Jl. Nangka II, Maguwoharjo, Depok, Sleman, Yogyakarta 55282
*E-mail korespondensi: titin@instiperjogja.ac.id

ABSTRACT

The availability of good quality of pepper seeds can be supported by plant propagation through tissue culture. The composition of the medium has a very important role in influencing the success of this method. The efficiency of Murashige and Skoog medium that was used needs to be considered to reduce the cost of pepper seed production through tissue culture hence the media needs to be modified. The addition of hormones to the medium greatly affects the growth response and development of the explants used. Hormones that are often added to culture medium were NAA (Naphthalene Acetic Acid) and BAP (Benzyl Amino Purine). The aim of the study was to determine the best modification of MS medium for the growth of pepper plant explants with the addition of NAA and BAP hormones. The research was conducted at the INSTIPER Tissue Culture Laboratory. Factorial Completely Randomized Design (CRD) was used as research design. The first factor was the modification of MS medium which consists of three levels, namely ¼ MS, ½ MS, and MS. The second factor was the combination of the ratio of the addition of NAA and BAP hormones which consists of five levels, namely 1:0, 0:1, 1:1, 1:2, and 2:1. The quantitative data obtained were analyzed statistically using the excel application and the qualitative data was analyzed descriptively. The results showed that ¼ MS, ½ MS, MS medium could induce callus from pepper leaf explants. The addition of NAA and BAP hormones with a concentration of 1-2 ppm also can stimulate callus formation. The percentage of callused explants varied from 14 – 71%. Callus was formed 3 weeks after planting. The callus texture was friable and compact. The color of the callus formed were white, yellowish white, greenish white and brownish white. The callus weight formed ranged from 0.04 to 1.73 grams.

Keywords: Callus induction, *piper nigrum*, modified MS medium, NAA, BAP

Diterima: 21 Oktober 2021

Diterbitkan: 1 Desember 2021

PENDAHULUAN

Salah satu kendala dalam usahatani lada adalah rendahnya produktivitas karena penggunaan bahan tanam yang tidak unggul yaitu bibit asalan yang berasal dari sulur gantung atau sulur cacing dari tanaman yang belum terjamin kesehatan dan kualitasnya (Suprpto & Ernawati, 2010). Hal ini disebabkan keterbatasan bahan tanam berupa bibit unggul yang tersedia terutama bagi petani.

Perbanyakan tanaman lada secara konvensional dilakukan dengan cara vegetatif melalui setek batang. Cara perbanyakan ini memiliki kekurangan yaitu untuk mendapatkan jumlah bibit yang memadai membutuhkan bahan tanaman dalam jumlah banyak dan terdapat kemungkinan membawa

sumber penyakit (Yelnititits, Bermawie, & Syafaruddin, 1999) dan (Ahmad, Abbasi, Fazal, Khan, & Afridi, 2014). Salah satu cara untuk mengatasi masalah tersebut adalah melalui perbanyakan tanaman secara in vitro atau melalui teknik kultur jaringan. Teknik kultur jaringan dapat menghasilkan bibit yang bebas dari penyakit dan bibit yang dihasilkan dalam jumlah banyak dengan waktu yang relatif singkat (Yelnititits et al., 1999). (Ahmad et al., 2014) menambahkan teknik ini dapat digunakan untuk regenerasi tanaman dari jaringan somatik, peluang untuk konservasi plasma nutfah dan menghasilkan tanaman yang stabil secara genetik.

Faktor yang menentukan keberhasilan teknik kultur jaringan tanaman adalah penggunaan media kultur dan penambahan zat pengatur

tumbuh atau hormone (Silva, Balzon, & Scherwinski-Pereira, 2012). Pada umumnya media dasar yang paling banyak digunakan dalam kultur jaringan adalah media Murashige dan Skoog (MS) yang mengandung hara makro dan mikro. Efisiensi penggunaan media MS merupakan hal yang perlu diperhatikan untuk menekan biaya produksi bibit atau bibit melalui kultur jaringan (Latifah, Suhermatin, & Ermawati, 2017). Kandungan garam yang tinggi dalam media tidak selalu optimal untuk pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Media $\frac{1}{2}$ MS dengan penambahan ekstrak kentang dan air kelapa muda merupakan media terbaik untuk induksi akar eksplan tanaman kentang. Media $\frac{1}{4}$ MS dan MS penuh menunjukkan hasil yang cukup baik pada parameter tinggi tanaman, jumlah akar dan jumlah tunas pada kultur jaringan tanaman kentang (Purwanto, Purwantono, & Mardin, 2007). Media $\frac{1}{2}$ MS, 50 mL.L-1 filtrat wortel dan 200 mL.L-1 air kelapa muda merupakan kombinasi media terbaik pada parameter tinggi planlet anggrek *Cattleya* (Latifah et al., 2017).

Penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) atau hormon pada media kultur jaringan sangat mempengaruhi respon pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang digunakan. Hormon sintetik yang sering digunakan adalah jenis auksin dan sitokinin. Menurut (Asra, Samarlina, & Silalahi, 2020) auksin memberikan pengaruh terhadap pembelahan dan pemanjangan sel pada bagian meristematik. Sitokinin berperan dalam meningkatkan pembelahan sel. Contoh hormon auksin adalah NAA (Nepthalene Acetic Acid). Contoh hormon sitokinin yaitu BAP (6-Benzimaminopuril). Untuk pembentukan dan pertumbuhan kalus dan akar yang digunakan adalah auksin, sedangkan dalam pembentukan dan pertumbuhan tunas yang digunakan adalah sitokinin. Perimbangan penggunaan auksin dan sitokinin dapat mengarahkan proses morfogenesis eksplan (Lestari, 2011).

Penambahan hormon auksin dan sitokinin sintetik dengan konsentrasi berbeda-beda pada media kultur jaringan lada telah banyak dilakukan oleh beberapa peneliti, diantaranya adalah (Husni & Kosmiatin, 2005)

menggunakan hormon auksin 2,4-D dan NAA serta hormon sitokinin BA pada media MS dan Gamborg B5; (Silva et al., 2012) menambahkan hormon BAP dan NAA pada media MS dan WPM (Woody Plant Medium); dan (Ahmad et al., 2014) menggunakan hormon BA, 2,4-D, NAA dan IAA pada media MS.

Efisiensi penggunaan media MS maupun hormon sintetik merupakan hal yang perlu diperhatikan untuk menekan biaya produksi bibit lada melalui teknik kultur jaringan. Dengan demikian, perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan komposisi media kultur yang lebih murah dengan mengkombinasikan kekuatan unsur hara yang terdapat dalam media MS (konsentrasi) dan kombinasi penggunaan hormon pada media kultur untuk menghasilkan bibit tanaman lada melalui teknik mikropropagasi.

Tujuan penelitian yaitu mengetahui modifikasi media MS paling optimal untuk menginduksi kalus pada eksplan tanaman lada dengan penambahan hormon NAA dan BAP sebagai langkah awal guna mendapatkan bibit lada secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Juni – September 2021 di Laboratorium Kultur Jaringan Institut Pertanian Stiper (INSTIPER) Yogyakarta.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu bibit lada berumur 3 – 5 bulan (sebagai sumber eksplan), media Murashige dan Skoog (MS), hormon (NAA/Napthalene Acetic Acid dan BAP/Banzyl Amino Purine), agar, NaCl, KOH, sukrosa, aquades, alkohol 70%, fungisida, clorox, HgCl₂ dan spritus.

Alat yang digunakan yaitu Laminar Air Flow (LAF), autoclave, kompor listrik, timbangan analitik, botol kultur, pinset, pisau scalpel, kertas saring, gelas ukur, pH indikator, spatula, kamera digital, erlenmeyer, kertas payung, pipet tetes, kertas label, tissue.

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Institut Pertanian STIPER (INSTIPER) Yogyakarta. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor. Faktor pertama yaitu modifikasi media MS yang terdiri atas tiga aras: $\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS, dan MS.

Faktor kedua adalah kombinasi perbandingan penambahan hormon NAA dan BAP yang terdiri dari lima aras yaitu: 1 ppm NAA : 0 ppm BAP (1:0), 0 ppm NAA : 1 ppm BAP (0:1), 1 ppm NAA : 1 ppm BAP (1:1), 1 ppm NAA : 2 ppm BAP (1:2), 2 ppm NAA : 1 ppm BAP (2:1). Dengan demikian terdapat 15 kombinasi perlakuan.

Penelitian diawali dengan kegiatan sterilisasi peralatan menggunakan autoclave. Langkah selanjutnya adalah pembuatan media kultur. Media MS yang digunakan dalam penelitian disesuaikan dengan perlakuan yang kemudian ditambah sukrosa 30 g.L⁻¹ dan agar 12 g.L⁻¹. Eksplan yang digunakan berupa daun yang diambil dari bibit tanaman lada. Sterilisasi eksplan menggunakan fungisida 1 g.100 mL⁻¹, HgCl₂ 10 ppm dan sodium hypochloride 20%. Penanaman eksplan pada media kultur dilakukan di dalam alat Laminar Air Flow.

Parameter pengamatan antara lain: persentase eksplan berkalus, waktu muncul kalus, tekstur kalus, warna kalus, dan berat kalus. Data pada parameter tekstur kalus, warna kalus, dan berat kalus diambil 6 minggu setelah tanam. Data kuantitatif yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan aplikasi excel dan data kualitatif dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara umum hampir semua kombinasi perlakuan media kultur mampu menginduksi kalus.

Tabel 1 terlihat bahwa semua kombinasi perlakuan media dapat menginduksi kalus dari eksplan daun lada kecuali perlakuan ¼ MS + 1 ppm NAA + 0 ppm BAP. Persentase eksplan yang berkalus bervariasi mulai dari 14 – 71%. Kombinasi media kultur yang dapat menginduksi kalus dengan persentase tertinggi (71%) adalah ½ MS + 2 ppm NAA + 1 ppm BAP, ½ MS + 1 ppm NAA + 2 ppm BAP, MS + 1 ppm NAA + 0 ppm BAP, MS + 1 ppm NAA + 1 ppm BAP, dan MS + 1 ppm NAA + 2 ppm BAP.

Media MS yang dikurangi konsentrasinya menjadi ¼ MS atau ½ MS maupun penuh (MS) dapat digunakan untuk menginduksi kalus dari eksplan daun lada. Media MS mengandung hara makro, hara mikro, dan vitamin yang lengkap yang dibutuhkan oleh tanaman (Thorpe, 1981). Untuk menekan

biaya produksi perbanyak dengan cara kultur jaringan, efisiensi penggunaan media MS dapat dilakukan (Latifah et al., 2017), antara lain dengan cara mengurangi konsentrasinya ataupun dengan penambahan bahan organik atau bahan substitusi nutrisi tanaman yang lain. Hal serupa pernah dilakukan oleh (Purwanto, Purwantono, Mardin, et al., 2007) untuk menumbuhkan eksplan kentang dan (Latifah et al., 2017) untuk menumbuhkan eksplan anggrek. Hasil penelitian tersebut menyampaikan bahwa media MS dengan beberapa konsentrasi berbeda yaitu ¼ MS, ½ MS dan MS memberikan respon terhadap pertumbuhan eksplan yang digunakan.

Kombinasi media dasar MS dengan penambahan hormon NAA dan BAP dengan konsentrasi berbeda dapat menginduksi kalus eksplan lada, baik hormon tersebut diberikan terpisah maupun bersamaan. Penambahan hormon pada media dasar MS yang perlu diperhatikan adalah ketepatan memilih jenis dan konsentrasi yang sesuai dengan jenis tanaman dan kondisi fisiologis dari eksplan atau jaringan yang ditumbuhkan. Hal ini dikarenakan setiap jenis dan jaringan tanaman yang diberi perlakuan menunjukkan respon berbeda (Lestari, 2011) (Munarti & Kurniasih, 2014).

Hasil penelitian (Swandari & Setyorini, 2018) menyatakan bahwa media kultur ¼ MS yang ditambah hormon NAA dan BAP dapat menginduksi kalus dari eksplan daun tanaman *Gerbera jamesonii*. Hasil penelitian serupa juga dilaporkan (Abbasi, Ahmad, Fazal, & Mahmood, 2010) yang menyampaikan bahwa eksplan daun lada yang ditanam dalam media MS dengan penambahan IAA dan BAP 1 µM menghasilkan kalus friable (remah) berwarna putih krem sampai hijau pucat dan (Ahmad et al., 2014) yang menyatakan bahwa penambahan beberapa hormon pada media MS dapat memacu induksi kalus dan pembentukan organ pada eksplan daun lada. Konsentrasi hormon NAA yang digunakan 0.25 – 2 mg.L⁻¹, sedangkan hormon BAP 0.5 – 2 mg.L⁻¹.

Tabel 1. Pengaruh modifikasi media MS dengan penambahan hormon NAA dan BAP dengan perbandingan berbeda terhadap pertumbuhan eksplan daun lada

Perlakuan	Persentase eksplan berkalus (%)	Waktu muncul kalus (MST)	Tekstur kalus
¼ MS + NAA:BAP (1:0)	0	-	-
¼ MS + NAA:BAP (0:1)	29	4	Remah - Kompak
¼ MS + NAA:BAP (1:1)	43	3	Remah
¼ MS + NAA:BAP (2:1)	57	4	Remah - Kompak
¼ MS + NAA:BAP (1:2)	29	3	Remah - Kompak
½ MS + NAA:BAP (1:0)	14	3	Kompak
½ MS + NAA:BAP (0:1)	43	4	Kompak
½ MS + NAA:BAP (1:1)	43	3	Remah - Kompak
½ MS + NAA:BAP (2:1)	71	3	Kompak
½ MS + NAA:BAP (1:2)	71	4	Kompak
MS + NAA:BAP (1:0)	71	7	Remah - Kompak
MS + NAA:BAP (0:1)	57	4	Kompak
MS + NAA:BAP (1:1)	71	4	Kompak
MS + NAA:BAP (2:1)	43	3	Kompak
MS + NAA:BAP (1:2)	71	3	Kompak

MST = Minggu Setelah Tanam

Tabel 1 juga menunjukkan bahwa waktu pembentukan kalus bervariasi mulai dari 3 – 7 minggu setelah tanam (MST). Secara umum pertumbuhan kalus dipacu oleh penambahan hormon auksin dan sitokinin dengan konsentrasi relatif tinggi. Penelitian (Puteri, Ratnasari, & Isnawati, 2014) melaporkan hal serupa bahwa pemberian berbagai kombinasi NAA dan BAP berpengaruh terhadap kecepatan dan viabilitas kalus daun sirsak pada media MS.

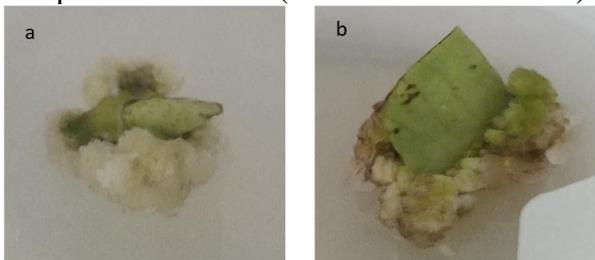
Auksin dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel, pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas (karena auksin mengeluarkan H⁺ ke dalam dinding sel dan menyebabkan pH dinding sel

menurun sehingga terjadi pelonggaran struktur dinding sel), mengembangkan dinding sel, dan terjadi pertumbuhan. Penambahan sitokinin dapat meningkatkan pembelahan sel karena sitokinin berperan dalam pembentukan benang gelendong pada tahap metaphase (Mahadi, Syafi'i, & Sari, 2016).

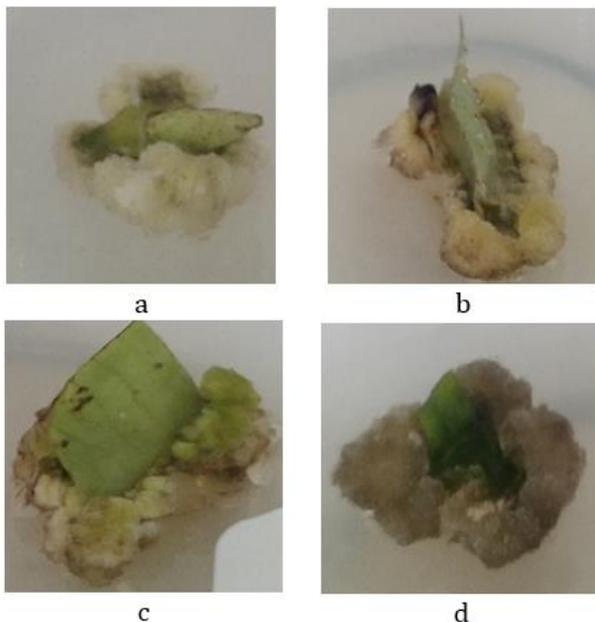
Laju pertumbuhan kalus yang berbeda dari hasil penelitian selain dipengaruhi oleh peningkatan kecepatan pembelahan sel akibat pemberian hormon auksin dan sitokinin, juga dapat dipengaruhi oleh faktor genetik, umur jaringan, jenis tanaman, faktor lingkungan (cahaya, kandungan O₂, suhu, kelembaban udara), serta kemampuan jaringan untuk menyerap zat-zat hara yang tersedia (yang dipengaruhi oleh aerasi pada media dan tekstur kalus yang dihasilkan) (Mahadi et al., 2016).

Berdasarkan Tabel 1 dan Gambar 1 terlihat bahwa kalus yang terbentuk memiliki tekstur remah – kompak. Tekstur kalus dibedakan menjadi tiga macam yaitu kompak (non-friable, intermediate dan remah (friable). Tekstur kalus remah mengalami pembelahan sel yang lebih cepat jika dibandingkan dengan tekstur kalus kompak. Menurut (Sari, Kusumawati, Saleh, Kustiawan, & Sukartingsih, 2018), kalus dengan tekstur remah terbentuk melalui pertumbuhan sel dengan ukuran yang kecil dan interaksi sel longgar yang diakibatkan oleh adanya auksin. Hormon auksin dapat merangsang pemanjangan sel dengan meningkatkan plastisitas dinding sel menjadi longgar dan menyebabkan air mudah mengalir ke sel bagian dalam dengan osmosis. Oleh karena itu, kalus yang remah mengandung banyak air karena dinding sel belum mencapai lignifikasi dan kelompok sel dapat dengan mudah dipisahkan. Menurut (Mahadi et al., 2016), tekstur kalus kompak terjadi karena kalus mengalami pembentukan lignifikasi sehingga kalus memiliki tekstur yang keras yang juga merupakan efek dari sitokinin yang berperan dalam transport unsur hara. Hasil penelitian (Setyorini, 2021) menunjukkan hasil serupa yaitu penambahan hormon NAA dan BAP pada media MS menghasilkan kalus yang bertekstur remah dan kompak.

Salah satu indikator pertumbuhan ekplan pada kultur jaringan berupa warna dan tekstur kalus yang menggambarkan penampilan visual kalus sehingga diketahui kalus yang memiliki sel-sel aktif untuk membelah atau telah mati. Suatu jaringan kalus dari ekplan biasanya menghasilkan warna kalus yang berbeda yang mempunyai ciri-ciri warna dan tekstur kalus yang sesuai dengan metabolit sekunder yang diinginkan (Indah & Ermavitalini, 2013). Secara umum warna kalus yang terbentuk adalah putih, ada yang kemudian putih kekuningan, putih kehijauan dan putih kecoklatan (Tabel 2 dan Gambar 2).



Gambar 1. Tekstur kalus yang terbentuk: (a) Remah, (b) Kompak



Gambar 2. Warna kalus yang terbentuk: (a) Putih, (b) Putih kekuningan, (c) Putih kehijauan, (d) Putih kecoklatan

Menurut (Sari et al., 2018), variasi warna kalus yang terbentuk terjadi karena perbedaan jenis hormon dan besarnya konsentrasi yang diberikan pada media kultur. Kombinasi hormon auksin dan sitokinin dapat menghasilkan warna kalus yang lebih hijau

disebabkan oleh sitokinin yang cenderung mendorong pembentukan klorofil. Warna putih dan kuning pada kalus menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus baik. Warna hijau disebabkan kalus mengandung klorofil. Perubahan warna kalus menjadi putih kehijauan akibat sel kalus sudah mulai terbentuk klorofil sebagai reaksi pencahayaan sehingga kloroplast melakukan fotosintesis (Mahadi et al., 2016). Selain itu, warna kalus yang terbentuk juga dapat disebabkan oleh adanya pigmentasi, pengaruh cahaya, dan bagian tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan (Sari et al., 2018).

Tabel 2. Pengaruh modifikasi media MS dengan penambahan hormon NAA dan BAP pada perbandingan berbeda terhadap warna dan berat kalus yang terbentuk

Perlakuan	Warna kalus	Berat kalus (g)
¼ MS + NAA:BAP (1:0)	-	-
¼ MS + NAA:BAP (0:1)	Putih kecoklatan	-
¼ MS + NAA:BAP (1:1)	Putih kecoklatan	1.01
¼ MS + NAA:BAP (2:1)	Putih kecoklatan	1.73
¼ MS + NAA:BAP (1:2)	Putih kecoklatan	1.25
½ MS + NAA:BAP (1:0)	Putih kehijauan	0.04
½ MS + NAA:BAP (0:1)	Putih kehijauan, Putih kecoklatan	-
½ MS + NAA:BAP (1:1)	Putih kehijauan, Putih keccoklatan	0.72
½ MS + NAA:BAP (2:1)	Putih, Putih kehijauan, Putih kecoklatan	0.80
½ MS + NAA:BAP (1:2)	Putih kehijauan, Putih kecoklatan	0.38
MS + NAA:BAP (1:0)	Putih kecoklatan	-
MS + NAA:BAP (0:1)	Putih kekuningan, Putih kehijauan, Putih kecolatan	-
MS + NAA:BAP (1:1)	Putih kehijauan, Putih kecoklatan	0.71
MS + NAA:BAP (2:1)	Putih kehijauan, Putih kecolatan	0.56
MS + NAA:BAP (1:2)	Putih kehijauan, Putih kecoklatan	0.49

Untuk parameter berat kalus tidak semua kalus yang terbentuk ditimbang beratnya karena belum dilakukan kegiatan sub kultur atau dalam perkembangannya kalus yang terbentuk kemudian mengalami kecoklatan (browning) kemudian mati.

Tabel 2 terlihat bahwa berat kalus bervariasi mulai dari 0.04 – 1.73 g. Penambahan berat kalus dikarenakan terjadi pembelahan pada kalus sehingga jumlah selnya bertambah. Berat kalus juga sangat tergantung pada kondisi morfologi kalus, kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan membesarnya kalus. Auksin yang diberikan memberikan pengaruh terhadap perkembangan sel karena dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel. Sitokinin yang diberikan berfungsi dalam pembelahan sel dan sintesis protein yang menyebabkan sel berproliferasi sehingga volume sel bertambah dan berakibat menambah berat kalus yang dihasilkan (Latunra, 2017).

KESIMPULAN

Kesimpulan dari hasil penelitian antara lain: (1) Media MS yang dimodifikasi kekuatannya menjadi $\frac{1}{4}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS dan MS yang ditambah dengan hormon NAA dan BAP konsentrasi 1 – 2 ppm dapat menginduksi kalus dari eksplan daun lada, (2) Persentase eksplan yang berkalus sebanyak 14 – 71%, (c) Kalus terbentuk mulai 3 minggu setelah tanam, (d) Tekstur kalus yang terbentuk yaitu remah dan kompak, (e) Warna kalus yang terbentuk bervariasi mulai dari putih, putih kekuningan, putih kehijauan dan putih kecoklatan, (f) Berat kalus sebesar 0.04 – 1.73%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada semua staf laboratorium Kultur Jaringan Tanaman INSTIPER untuk dukungan dan bantuan fasilitas selama penelitian. Penelitian ini mendapatkan dana dari INSTIPER melalui hibah dana penelitian LPPM untuk dosen.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbasi, B. H., Ahmad, N., Fazal, H., & Mahmood, T. (2010). Conventional and Modern Propagation Techniques in Piper nigrum. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(1), 007–012. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/270744867_Conventional_and_modern_propagation_techniques_in_Piper_nigrum
- Ahmad, N., Abbasi, B. H., Fazal, H., Khan, M. A., & Afridi, M. S. (2014). Effect of reverse photoperiod on in vitro regeneration and piperine production in Piper nigrum L. *Comptes Rendus Biologies*, 337(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2013.10.011>
- Asra, R., Samarlina, R. A., & Silalahi, M. (2020). *Hormon Tumbuhan*. Jakarta: UKI Press.
- Husni, A., & Kosmiatin, M. (2005). Seleksi In Vitro Tanaman Lada untuk Ketahanan terhadap Penyakit Busuk Batang. *Jurnal AgroBiogen*, 1(1), 13–19.
- Indah, P. N. (Putri), & Ermavitalini, D. (Dini). (2013). Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum Inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 2(1), 15928. <https://doi.org/10.12962/J23373520.V2I1.2571>
- Latifah, R., Suhermiatin, T., & Ermawati, N. (2017). Optimasi Pertumbuhan Plantlet *Cattleya* Melalui Kombinasi Kekuatan Media Murashige-Skoog dan Bahan Organik. *Agriprima : Journal of Applied Agricultural Sciences*, 1(1), 59–62. <https://doi.org/10.25047/AGRIPRIMA.V1I1.20>
- Latunra, A. I. (2017). Induksi Kalus Pisang Barangan Merah *Musa acuminata* Colla dengan Kombinasi Hormon 2,4-D dan Bap Secara In Vitro. *Jurnal Ilmu Alam Dan Lingkungan*, 8(1). <https://doi.org/10.20956/JAL.V8I1.3925>
- Lestari, E. G. (2011). Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyakkan Tanaman melalui Kultur Jaringan. *Jurnal*

- AgroBiogen*, 7(1).
- Mahadi, I., Syafi'i, W., & Sari, Y. (2016). Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) Menggunakan Hormon 2,4-D dan BAP dengan Metode in vitro (Callus Induction of Calamansi (*Citrus microcarpa*) Using 2,4-D and BAP Hormones by in vitro Methods). *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*, Agustus, 21(2), 84–89. <https://doi.org/10.18343/jipi.21.2.84>
- Munarti, & Kurniasih, S. (2014). Pengaruh Konsentrasi IAA dan BAP Terhadap Pertumbuhan Stek Mikro Kentang Secara In Vitro, 1(1).
- Purwanto, P., Purwantono, A. S. D., & Mardin, S. (2007). MODIFIKASI MEDIA MS DAN PERLAKUAN PENAMBAHAN AIR KELAPA UNTUK MENUMBUHKAN EKSPLAN TANAMAN KENTANG. *Agriin*, 11(1), 1410–1439. <https://doi.org/10.20884/1.AGRIN.2007.11.1.62>
- Purwanto, Purwantono, A. S. D., Mardin, D. S., Budidaya, J., Fakultas, P., & Unsoed, P. (2007). Jurnal Penelitian dan Informasi Pertanian. *Agriin*, 11(1), 1410–1439.
- Puteri, R. F., Ratnasari, E., & Isnawati. (2014). Pengaruh Penambahan Berbagai Konsentrasi NAA (Naphthalene Acetic Acid) dan BAP (Benzyl Amino Purine) terhadap Induksi Kalus Daun Sirsak (*Annona muricata*) secara In Vitro. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 3(3). Retrieved from <https://jurnalmahasiswa.unesa.ac.id/index.php/lenterabio/article/view/9607>
- Sari, Y. P., Kusumawati, E., Saleh, C., Kustiawan, W., & Sukartingsih, S. (2018). Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant *Myrmecodia tuberosa*. *Nusantara Bioscience*, 10(3), 183–192. <https://doi.org/10.13057/NUSBIOSCI/N100309>
- Setyorini, T. (2021). Respon Pertumbuhan Eksplan Stek Mikro Kentang pada Media MS dengan Penambahan NAA dan BAP. *Agritech*, XXIII(1), 66–71. Retrieved from <http://jurnalnasional.ump.ac.id/index.php/AGRITECH/article/view/8564/4021>
- Silva, T. L. da, Balzon, T. A., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2012). A rapid in vitro protocol for propagation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum*, two species from Amazon region with multipurpose uses. *African Journal of Biotechnology*, 11(89), 15539–15546. <https://doi.org/10.4314/ajb.v11i89>
- Suprpto, & Ernawati. (2010). Analisis Pendapatan Pengakaran Bibit Lada Natar 1 Prima Tani Lampung Utara. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 10(2), 84–89.
- Swandari, T., & Setyorini, T. (2018). IN VITRO CALLUS INDUCTION OF *Gerbera jamesonii* WITH COMBINATION OF NAA AND BAP. *AGROISTA: Jurnal Agroteknologi*, 1(2). Retrieved from <http://36.82.106.238:8885/jurnal/index.php/AGI/article/view/117>
- Thorpe, T. A. (1981). *Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture*. USA: Academic Press, Inc.
- Yelnitits, Y., Bermawie, N., & Syafaruddin, S. (1999). PERBANYAKAN KLON LADA VARIETAS PANNIYUR SECARA IN VITRO. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*, 5(3), 109–114. <https://doi.org/10.21082/litri.v5n3.1999.109-114>