

Induksi Kalus Eksplan daun Tanaman Anggur (*Vitis vinifera* L.) dengan Aplikasi 2,4-D Secara *in Vitro*

ROLIANA VITASARI PURBA
HESTIN YUSWANTI*)
I NYOMAN GEDE ASTAWA

PS Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman Denpasar 80231 Bali
*)Email: hestin.yuswanti@yahoo.com

ABSTRACT

Induction can Callus Eksplan the Vine (*Vitis vinifera* L.) With The Application 2,4-D in *In Vitro*

This research aims to find the influence of the provision of 2,4-D concentration on the growth of the explant callus of *grapevine* leaves by *in vitro* treatment and to know how much the concentration of the provision of 2,4-D needed to the shape and growth of explant callus of vine leaves. This research was conducted in April until August 2016 in the Laboratory of Plant Tissue Culture, Program Study Agroekoteknologi, Faculty of Agriculture, Udayana University. The method used was Complete Random Method (CRM). The variable observed in this research was when the explant got curvy, the total percentage of the curving explant, when the explant got swollen, percentage of the swollen up explant and the percentage of brownish explant. Influence of the ZPT 2,4-D provision gives real influence to the observed variable to the variable when the explant got curvy and the percentage of brownish explant, affects really real to the total percentage of the curved explant.

MS + 1,5 ppm 2,4-D treatment gives the best growth seen at the variable when the explant curves the fastest (2,4 days), the highest percentage of the curved explant (93,3%) and the highest percentage of the swollen explant (20,0%). This treatment which successfully creates is 1,5 ppm 2,4-D treatment.

Keywords: *callus eksplan, grapevine, 2,4-D*

1. Pendahuluan

1.1 Latar belakang

Tanaman anggur (*Vitis vinifera* L.) termasuk kedalam keluarga *Vitaceae* merupakan tanaman buah dengan habitus perdu merambat. Buah anggur dikenal karena banyak mengandung senyawa polipenol dan resveratol yang berperan aktif

dalam berbagai metabolisme tubuh, mampu mencegah terbentuknya sel kanker dan berperan sebagai senyawa antioksidan yang mampu merangkal radikal bebas (Bagchi, *et al.*, 2000; Lange, *et al.*, 2004). Tanaman anggur dapat tumbuh dan berkembang dengan baik di kawasan tropis, seperti Indonesia dengan sentra terdapat di Bali, Probolinggo dan NTT. Kabupaten Buleleng merupakan sentra perkebunan anggur di Bali. Dencarik merupakan satu Desa di Kabupaten Buleleng daerah yang mayoritas mata pencaharian masyarakatnya adalah sebagai petani perkebunan anggur (Sensus Penduduk dan monografi Desa Dencarik, 2010).

Berdasarkan data dari Sensus Penduduk dan monografi Desa Dencarik, (2010) bahwa kendala yang dihadapi oleh petani anggur adalah keterbatasan jumlah serta kualitas bibit. Dimana secara konvensional dalam pembuatan bibit anggur petani menggunakan stek dan hasilnya cukup baik, tetapi jumlah yang dihasilkan masih sedikit dibandingkan akan kebutuhan bibit tersebut. Oleh karena itu salah satu alternatif untuk pengadaan bibit anggur yang berkualitas dalam jumlah yang banyak dan waktu yang relatif singkat melalui teknik kultur *in vitro*. Metode ini menggunakan bagian kecil organ tanaman sebagai bahan awal (disebut eksplan) untuk menghasilkan anakan yang secara genetik identik dengan induknya serta dihasilkan dalam jumlah besar dan dalam waktu yang relatif singkat (Indrianto, 2002). Keuntungan dari metode ini adalah dihasilkan bibit dalam jumlah banyak dalam waktu yang singkat, bibit bebas virus serta bibit dapat disimpan lama dalam kondisi aseptik (Dijkstra, 1993 dalam Darmawati, 2013).

Salah satu cara pengadaan bibit secara *in vitro* adalah kultur kalus. Kalus adalah kumpulan sel yang belum terdiferensiasi. Secara teori, semua jaringan tanaman yang sel-selnya masih hidup dapat membentuk kalus secara *in vitro*. Akan tetapi jaringan tanaman yang masih muda (belum ada lignifikasinya pada dinding selnya), atau jaringan muda yang bersifat meristematik akan lebih mudah menghasilkan kalus. Kalus akan terbentuk jika eksplan ditanam pada media kultur yang mengandung auksin dan sitokinin dengan rasio yang sama atau media yang mengandung 2,4-D (Dichlorophenoxyacetic acid) (Dwiyani, *et al.*, 2014). Zat pengatur tumbuh ini bersifat stabil karena tidak mudah mengalami kerusakan oleh cahaya maupun pemanasan pada waktu sterilisasi (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Darmawati (2013), konsentrasi 2,4-D 1 ppm dan 2 ppm memberikan hasil terbaik untuk pembentukan kalus pada mikropropagasi tanaman stroberi. Yuyun (2010), konsentrasi 2,4-D 0,5-1,0 ppm paling efektif membentuk kalus dari eksplan daun nilam. Berdasarkan uraian tersebut di atas maka penelitian mengenai pengaruh 2,4-D dalam menginduksi kalus sangat perlu dilakukan sebagai salah satu cara untuk menghasilkan bibit anggur. Selain itu, penelitian tentang kalus menggunakan daun anggur belum ada yang melakukan sebelumnya sehingga peneliti tertarik untuk melakukan penelitian ini.

1.2 Tujuan

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian 2,4-D terhadap pertumbuhan kalus eksplan daun tanaman anggur secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui konsentrasi 2,4-D yang tepat dalam menginduksi pertumbuhan kalus eksplan daun anggur.

1.3 Hipotesis

1. Pemberian 2,4-D pada media kultur dapat menginduksi pembentukan kalus secara *in vitro*.
2. Zat pengatur tumbuh 2,4-D dengan konsentrasi 1,5 ppm dapat memberikan pengaruh terbaik terhadap terbentuknya kalus.

2. Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Udayana jl. Pulau Moyo Denpasar. Penelitian dilaksanakan dari Bulan April - Agustus 2016. Bahan tanam yang digunakan daun tanaman anggur, yang dikarantina terlebih dahulu dengan perlakuan penyemprotan fungisida, bakterisida dan *growmore* 2g/l satu kali dalam seminggu. Formulasi media dasar yang digunakan media Murashige dan Skoog (MS), derajat keasaman media diatur pada pH 5,6-5,8. Bahan sterilan (*Detergent*, Dithane, Benlate, Clorox dan alkohol). Suhu ruangan berkisar antara 26-30° C.

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) perlakuan yakni D0 = MS + 0 ppm 2,4-D, D1 = MS + 1 ppm 2,4-D, D2 = MS + 1,5 ppm 2,4-D, D3 = MS + 2 ppm 2,4-D dan D4 = MS + 2,5 ppm 2,4-D dengan 5 perlakuan di ulang sebanyak 5 kali, sehingga diperoleh 25 unit percobaan. Setiap unit percobaan ditanam 3 eksplan.

Pengamatan dilakukan setiap hari, variabel yang diamati adalah saat pelengkungan, saat pembengkakan, persentase pelengkungan, persentase pembengkakan, persentase pencoklatan, saat muncul kalus dan morfologi kalus.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Hasil

Saat pelengkungan eksplan diamati setiap hari setelah tanam dan diamati hari beberapa terjadi pelengkungan eksplan. Waktu pelengkungan tercepat diperoleh pada konsentrasi 1,5 ppm (D2) 2,4-D yaitu 2,4 hari, sedangkan waktu pelengkungan yang lama diperoleh pada konsentrasi 0,0 ppm (D0) yaitu 6,4 hari (Tabel 1).

Persentase eksplan melengkung dihitung dari jumlah eksplan yang melengkung. Perlakuan D2 (93,3%) dan D1 (73,3%) memberikan rata-rata persentase eksplan melengkung tertinggi, sedangkan perlakuan D0 (40,0%), D3 (66,6%) dan D4 (46,6%) menunjukkan persentase eksplan melengkung terendah (Tabel 1).

Tabel 1. Saat eksplan melengkung dan persentase eksplan melengkung.

Perlakuan	Saat Eksplan Melengkung (HST)	Persentase Eksplan Melengkung (%)
D0	6,4	40,0
D1	3,2	73,3
D2	2,4	93,3
D3	4,8	66,6
D4	5,6	46,6

3.1.1 Saat eksplan membengkak (HST)

Saat pembengkakan eksplan diamati setiap hari setelah tanam sampai terjadi pembengkakan dan diamati hari keberapa terjadi pembengkakan eksplan. Eksplan yang membengkak paling cepat dicapai pada media D1 (5,0 HST) sedangkan kecenderungan paling lama pada media D2 (9,8 HST), namun pada media D0 dan D4 tidak ada eksplan yang mengalami pembengkakan (Tabel 2).

Tabel 2. Saat eksplan membengkak, persentase eksplan membengkak dan persentase pencoklatan.

Perlakuan	Saat Eksplan Membengkak (HST)	Persentase Eksplan Membengkak (%)	Persentase Pencoklatan (%)
D0	0	0	80,0
D1	5,0	13,3	59,9
D2	9,8	20,0	46,6
D3	5,4	6,7	73,3
D4	0	0	86,6

Persentase eksplan membengkak dihitung setelah eksplan mengalami pembengkakan. Kecenderungan persentase eksplan yang membengkak tertinggi pada perlakuan D2 (20,0 %), sedangkan perlakuan D3 (6,7 %) menunjukkan persentase eksplan yang membengkak terendah (Tabel 2).

Tabel 3. Saat tumbuhnya kalus pada berbagai perlakuan.

Perlakuan	Saat Tumbuhnya Kalus (HST)
D0	Belum Tumbuh
D1	Belum Tumbuh
D2	56
D3	Belum Tumbuh
D4	Belum Tumbuh

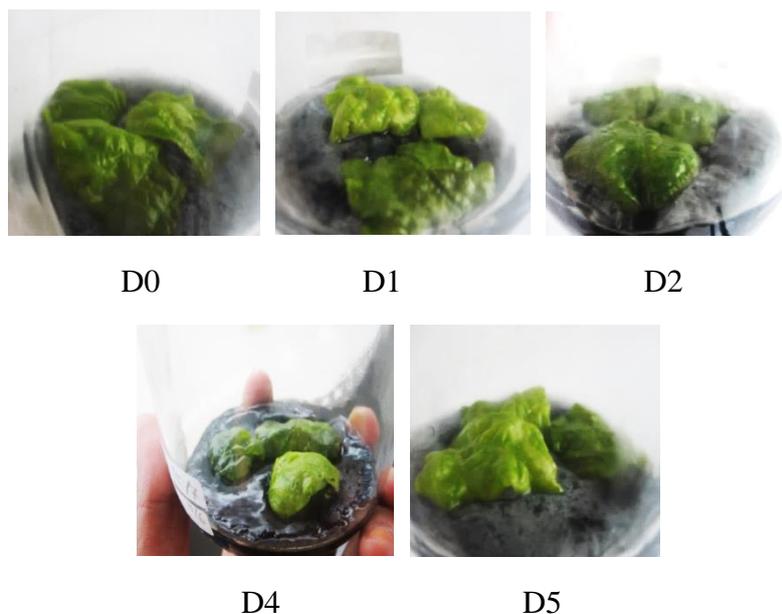
Pengamatan saat muncul kalus dilakukan setiap hari dalam satu sampai dua minggu setelah tanam. Dari banyak eksplan yang ditumbuhkan hanya ada satu eksplan yang tumbuh kalus, sehingga saat muncul kalus tidak dapat di uji statistik.

Persentase pencoklatan dihitung pada umur 1 minggu setelah tanam (MST). Perlakuan D4 (86,6 %) menunjukkan kecenderungan persentase pencoklatan tertinggi dan perlakuan D2 (46,6 %) menunjukkan kecenderungan persentase pencoklatan terendah (Tabel 2).

3.2 Pembahasan

Kalus merupakan sumber bahan tanam yang penting untuk meregenerasi tanaman baru. Keberhasilan dalam penumbuhan kalus juga dipengaruhi oleh perbandingan zat pengatur tumbuh yang sesuai sebab dalam tanaman zat pengatur tumbuh dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. Pada penelitian ini digunakan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin yaitu 2,4-D. Pembentukan kalus dari jaringan eksplan yang dikultur melalui teknik *in vitro* melibatkan perkembangan sel yang berlangsung secara acak dan tidak merata.

Level konsentrasi 2,4-D berpengaruh sangat nyata pada variabel persentase eksplan melengkung. Perlakuan D2 (93,3%) memberikan nilai persentase pelengkungan tertinggi dibandingkan perlakuan yang lain, dan pelengkungan tercepat dicapai oleh perlakuan D2 (2,4 HST) (Tabel 1) pelengkungan eksplan dapat dilihat pada Gambar 1. Perbedaan yang terjadi dikarenakan adanya perbedaan jumlah konsentrasi yang diberikan. Hidayat (2009) menyatakan bahwa pengaruh pemberian suatu konsentrasi zat pengatur tumbuh berbeda-beda untuk setiap tanaman, jenis tanaman bahkan berbeda pula antar varietas dalam suatu spesies. Pelengkungan terjadi 2-6 HST dikarenakan zpt 2,4-D mempengaruhi permeabilitas sel sehingga air masuk secara osmosis ke dalam sel dan menyebabkan kekakuan pada bagian daun yang mengalami perlakuan (Yuyun, 2010).



Gambar 1. Eksplan mengalami pelengkungan (2 - 6 HST)

Makin tinggi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan, induksi kalus makin terhambat. Penggunaan 2,4-D konsentrasi rendah akan lebih baik dalam menginduksi kalus dibanding konsentrasi tinggi (Hadipoentyanti dkk, 2008). Hal ini disebabkan karena 2,4-D mempunyai sifat fitotoksitas yang sangat tinggi, bila konsentrasinya berlebihan dalam tanaman. Zat pengatur tumbuh ini bersifat stabil karena tidak mudah mengalami kerusakan oleh cahaya maupun pemanasan pada waktu sterilisasi (Hendrayono dan Wijayani, 1994). Penambahan 2,4-D dalam media kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus (Bekti dkk, 2003).

Pembengkakan tercepat dicapai pada perlakuan D1 (5,0 HST) sedangkan persentase pembengkakan tertinggi D2 (20,0%) (Tabel 2) saat eksplan membengkak dapat dilihat pada Gambar 2. Eksplan pada media perlakuan D1, D2 dan D3 rata-rata mulai terjadi pembengkakan 14-21 HST. Pembengkakan yang terjadi karena adanya pengaruh pemberian 2,4-D pada eksplan merupakan suatu proses pertumbuhan setelah terjadinya proses pelengkungan akibat penyerapan air dan nutrisi dari media yang selanjutnya disertai dengan tahap perbanyakan sel. Proses ini menerangkan bahwa sel tumbuhan memiliki kemampuan untuk menyerap air dan unsur hara sehingga menyebabkan terjadinya pertambahan ukuran dan jumlah sel yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya pembengkakan jaringan. Pembengkakan eksplan ditandai dengan perubahan pada bekas pelukaan yang menebal dikarenakan terjadinya penambahan ukuran dan jumlah sel-sel eksplan di daerah tersebut (Hendrayono dan Wijayani, 1994). Auksin jenis 2,4-D dapat meningkatkan pemanjangan sel, pembengkakan sel dan pembentukan akar adventif.



Gambar 2. Pembengkakan eksplan daun anggur umur 14-21 HST

Melalui kultur kalus akan diperoleh dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali atau steril, namun salah satu permasalahan yang menghambat keberhasilan kultur jaringan adalah adanya kontaminasi dan browning. Selain kontaminasi, eksplan juga mengalami mati fisiologis. Ciri kultur mati fisiologis diawali dengan pencoklatan (*browning*). Browning merupakan suatu karakter munculnya warna coklat atau hitam yang sering kali membuat pertumbuhan dan perkembangan eksplan terhambat dan mengakibatkan kematian pada jaringan.

Pada percobaan ini persentase kultur browning terbesar diperoleh pada D4 yaitu 86,6% dan yang terendah diperoleh pada D2 yaitu 46,6%. Pada penelitian ini browning terjadi karena daun yang digunakan yaitu jaringan dewasa dan tindakan sterilisasi yang berlebihan. Menurut Santosa dan Nursandi (2003) browning dapat disebabkan oleh penggunaan bahan tanam yang tidak meristematik atau jaringan dewasa, tindakan sterilisasi yang berlebihan, media yang tidak cocok atau lingkungan yang tidak mendukung.

Pada penelitian ini digunakan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin yaitu 2,4-D. Kalus yang terbentuk pada permukaan eksplan disebabkan karena adanya rangsangan luka yang menyebabkan kesetimbangan dinding sel berubah arah, sebagian protoplas mengalir keluar sehingga mulai terbentuk kalus (Zulkarnain dan Lizawati, 2011). Dalam kultur jaringan, kalus dapat dihasilkan dari potongan organ yang telah steril, kemudian organ tersebut ditanam di dalam media yang mengandung auksin dan sitokinin. Kalus merupakan kumpulan dari massa sel yang belum terdiferensiasi. Kalus mempunyai pertumbuhan yang abnormal dan berpotensi untuk berkembang menjadi akar, tunas dan embrioid yang nantinya akan berkembang menjadi plantlet (Fatmawati dkk, 2010).

Hasil pengamatan kultur kalus pada eksplan daun anggur menunjukkan bahwa perlakuan yang paling baik untuk induksi kalus pada eksplan daun anggur yaitu pada perlakuan D2 dengan kombinasi media MS dan pemberian 2,4-D 1,5 ppm dengan waktu terbentuknya kalus 56 hari, sedangkan pada perlakuan D0, D1, D3 dan D4 2,4-D belum terbentuk kalus pada permukaan eksplan (Gambar 3). Hal ini diduga terjadi karena beberapa faktor, yaitu faktor eksplan itu sendiri dan faktor peneliti. Pada konsentrasi D0, D1, dan D4 2,4-D diduga hormon eksogen belum mampu menginduksi hormon endogen sehingga tidak terbentuk kalus, selain itu juga dikarenakan kondisi eksplan yang sudah mulai menurun atau hampir layu sehingga untuk membentuk kalus membutuhkan waktu yang relatif lambat. Faktor dari peneliti dapat disebabkan karena kurang teliti dalam mengamati terbentuknya kalus pada permukaan eksplan sehingga pada konsentrasi tersebut tidak ditemukan kalus pada permukaan eksplan (*human error*).

Kalus yang muncul pada permukaan eksplan dengan pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D 1,5 ppm dapat menginduksi kalus lebih cepat daripada konsentrasi lainnya. Hal ini terjadi karena zat pengatur tumbuh yang dibutuhkan eksplan untuk menginisiasi kalus cukup tinggi, sehingga pada konsentrasi 1,5 ppm 2,4-D sudah mampu menginisiasi terbentuknya kalus. Sesuai dengan penelitian Mustafa dan Khan (2012), yang menyatakan bahwa konsentrasi paling baik untuk menginduksi kalus pada tanaman tebu adalah 1,5 ppm 2,4-D. Pembentukan kalus terjadi melalui tiga tahap perkembangan yaitu induksi, pembelahan sel, dan diferensiasi sel (Zulkarnain dan Lizawati, 2011). Kalus tumbuh disekitar irisan daun. Kalus yang terbentuk pada eksplan disebabkan karena sel-sel yang kontak dengan medium menjadi meristematik dan menjadi aktif membelah seperti jaringan penutup luka sebagai respon terhadap pelukaan (Desriatin, 2010). Mula-mula terjadi pembentangan

dinding sel dan terjadi penyerapan air sehingga sel akan membengkak selanjutnya terjadi pembelahan sel dan terbentuk kalus (Sitorus dkk, 2011).



Gambar 3. Kalus dari daun anggur pada perlakuan D2

Salah satu fase untuk mendapatkan individu baru pada teknik kultur jaringan tanaman adalah kalogenesis. Kalogenesis merupakan respon awal yang ditandai dengan terbentuknya kalus pada bagian tepi eksplan (bagian pelukaan) bagian atas maupun bagian bawah yang bersentuhan dengan media. Kalus akan lebih cepat terbentuk pada bagian abaksial daun, hal ini berkaitan dengan proses pengambilan nutrisi medium oleh eksplan. Penyerapan unsur hara akan lebih baik karena terjadi kontak secara langsung antara media dengan bagian abaksial daun (Nisak dkk, 2012). Kalus yang muncul pada bagian yang terluka terjadi akibat rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi lukanya. Morfologi kalus merupakan bentuk fisik kalus yang dihasilkan dalam setiap perlakuan yang diamati berdasarkan bentuk, warna, dan tekstur kalus. Kalus yang dihasilkan eksplan konsentrasi D2 berwarna putih, berstruktur dan kompak.

Tekstur kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya berbeda-beda. Menurut Turhan (2004) tekstur kalus dibedakan menjadi tiga macam yaitu kompak (*non friable*), intermediet, dan remah (*friable*). Banyak faktor yang mempengaruhi pembentukan tekstur kalus antara lain jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi media, zat pengatur tumbuh, dan kondisi lingkungan (Pierik, 1987). Kalus tidak tumbuh pada semua perlakuan.

Warna kalus digunakan sebagai salah satu indikator baik tidaknya kualitas kalus. Kualitas kalus yang baik memiliki warna yang hijau, sedangkan warna yang terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik (Andaryani, 2010). Berdasarkan pengamatan yang dilakukan warna kalus yang dihasilkan dari induksi eksplan daun anggur adalah putih (Gambar 3). Kalus ini memiliki kualitas yang cukup baik walaupun tidak berwarna hijau masih termasuk warna yang cerah. Warna dan tekstur kalus merupakan indikasi awal dimulainya respon organogenesis. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi (Turo, 1998). Menurut Wiendi dkk, (1991) dan Purnamaningsih (2002), Kalus yang bersifat embriogenik adalah kalus yang memiliki sel berukuran kecil, sitoplasma padat, inti besar, vakuola kecil dan mengandung butiran pati.

4. Kesimpulan dan Saran

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Induksi kalus yang terbaik terdapat pada perlakuan D2 (MS + 1,5 ppm 2,4-D) hal ini terlihat pada variabel saat eksplan melengkung tercepat (2,4 hari), persentase eksplan melengkung terbanyak (93,3%), dan persentase eksplan membengkak tertinggi (20,0%).
2. Perlakuan yang sudah berhasil memnginduksi kalus yaitu perlakuan D2 = 1,5 ppm 2,4-D.

4.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat disarankan sebagai berikut:

1. Perlu dikaji metode sterilisasi untuk meminimalisasi kontaminasi dan browning pada eksplan daun anggur.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap penggunaan ZPT 2,4-Dichlorophenoxyaceticacid pada kultur secara umum tanaman daun anggur.

Daftar Pustaka

- Andaryani, S. 2010. *Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) secara In Vitro*. Skripsi. Fakultas Pertanian. Surakarta : Universitas Sebelas Maret.
- Bagchi, D., Bagchi M., Stohs SJ., 2000, *Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention, Toxicol* 148(2-3):187–97.
- Bekti, R. 2003. Pengaruh asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*. 1(1) : 30.
- Darmawati, IAP. 2013. Induksi Kalus dengan 2,4-D pada Mikropropagasi Tanaman Stroberi (*Fragraria x ananassa* Duch cv. Rosalinda). *Agrotrop*.3(2) : 21-26.
- Desriatin, N. L. 2010. Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh IAA dan Kinetin terhadap Morfogenesis pada Kultur *In Vitro* Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum* L. var. *Prancak-95*). *Kultur Jaringan Tembakau*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Dijkstra, 1993. *Development of Alternative Methods for Healty Propagation of Stawberry using cuttings*. *Acta Horticulture* 348: 234-236.
- Dwiyani, R., H. Yuswanti, dan I.A.P. Darmawat. 2014. Detection of genetic variation in micropropagation of *Vanda tricolor* orchid. Makalah disampaikan pada International Conference on Bioscience and Biotechnology ke 5 di Denpasar pada 20 September 2014.

- Fatmawati, T. A., T. Nurhidayati, dan N. Jadid. 2010. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh IAA dan BAP pada Kultur Jaringan Tembakau *Nicotiana tabacum* L. VAR. Prancak 95. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Hadipoentyanti, E., Amalia, Nursalam, S.Y. Hartati dan S. Suhesti. 2008. Perakitan varietas untuk ketahanan nilam terhadap penyakit layu bakteri. Departemen Perindustrian Surabaya. hal 17-28.
- Hendrayono, D.P dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Hidayat, T. 2009. Pengantar Bioteknologi. UPI. Bandung
- Indrianto, A. 2003. Kultur jaJaringan Tumbuhan. Fakultas Biologi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. 134 hal.
- Lange DW., Wiel A van de DW., 2004, *Drink to prevent: review on the cardioprotective mechanisms of alcohol and red wine polyphenols*, *Semin Vasc Med* 4(2):173–86.
- Marlin, 2012. Inisiasi Kalus Embriogenik pada Kultur Jantung Pisang ‘Curup’ dengan Pemberian Sukrosa, BAP dan 2,4-D. *J. Agrivigor* 11(2): 276-284, Mei – Agustus 2012; ISSN 1412-2286-276
- Mustafa, G., dan M. S. Khan. 2012. Reproducible *In Vitro* Regeneration System for Purifying Sugarcane Clones. *African Journal of Biotechnology*. 11 (42) : 9961-9969. ISSN 1684-5315.
- Nisak, K., T. Nurhidayati., dan K. I. Purwani. 2012. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi ZPT NAA dan BAP pada Kultur Jaringan Tembakau *Nicotiana tabacum* var. Prancak 95. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 1 (1) : 1-6.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In Vitro Culture of Hinger Plant*. Netherlands: Martinus Nijhoff Publisher.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Bul. Agrobio*. 5(2) : 51-58.
- Santosa, U & F. Nursandi. 2003. Kultur Jaringan Tanaman. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang
- Sitorus, E. N., E. D. Hastuti., dan N. Setiari. 2011. Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) Secara *In Vitro* Pada Media Murashige & Skoog Dengan Konsentrasi Sukrosa Yang Berbeda. *Bioma*. 13 (1) : 1410-8801.
- Tsuro, M *et al.*, 1998, *Comparison Effect Of Different Types Of Cytokinin For Shoot Formation And Plant Regeneration In Leaf-Derived Callus Of Lavender, (Lavandula Vera DC)*, Laboratory Of Plant Breeding Science, Faculty Of Agriculture, Kyoto Prefecural University, Shimogamo-Handi Sakyoku, Kyoto 606-8522, Japan.
- Turhan, H. 2004. *Callus Induction and Growth in Transgenic Potato Genotype*. *African Journal of Biotechnology*. Vol 3(8). 375-378.
- Wiendi, N.A, G.A.Wattimena, dan L.W.Gunawan. 1991. Perbanyak tanaman dalam bioteknologi tanaman. PAU Bioteknologi. IPB Bogor. 507 hal.

Www.sensuspendudukdanmonografidesadencarik.com/2010/kabupatenBuleleng.
(diakses tanggal 25 januari 2016).

Yuyun, F. 2010. Teknik Sterilisasi dan Efektifitas 2,4 D Terhadap Pembentukan Kalus Eksplan Daun nilan in vitro. Universitas udayana. Denpasar

Zulkarnain, dan Lizawati. 2011. Proliferasi Kalus dari Eksplan Hipokotil dan Kotiledon Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) pada Pemberian 2,4-D. *Jurnal Natur Indonesia*. 14 (1) : 19-25. ISSN 1410-9.