



Kendala Induksi Kalus Tebu (*Saccharum officinarum* linn) Varietas PS 094 Pada Media Dasar Murashige dan Skoog

Siti Muflihatul Khoiriyah¹, Wiwit Budi Widyasari², dan Evi Susanti¹

Universitas Negeri Malang; Jalan Semarang No.5 Kota Malang
65145; Fax (0341)551312

¹Program Studi Bioteknologi, Universitas Negeri Malang

²Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia

e-mail: *siti.muflihatul.1903436@students.um.ac.id

Abstrak

Kesenjangan antara produksi dan kebutuhan gula dalam negeri membutuhkan upaya untuk mengatasinya. Usaha peningkatan produktivitas tebu dan perluasan area tanam terkendala pada pemenuhan bibit unggul dalam skala besar. Kultur jaringan merupakan metode alternatif yang dikembangkan untuk pemenuhan bibit unggul seperti varietas tebu PS 094 dalam jumlah banyak dengan waktu singkat. Induksi kalus merupakan tahap awal dari teknik kultur in-vitro yang bertujuan untuk menghasilkan kalus embrionik secara massal. Namun dalam pelaksanaannya terdapat beberapa kendala yang dapat menghambat keberhasilan kultur jaringan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kendala induksi kalus varietas PS 094 pada media dasar Murashige dan Skoog Secara In Vitro. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia, Pasuruan dari bulan Februari sampai Mei 2022. Penelitian terdiri dari 5 tahap yaitu Sterilisasi botol dan alat, pembuatan larutan stok, pembuatan media, sterilisasi eksplan dan tanam eksplan. Bahan tanam (eksplan) yang digunakan adalah daun muda yang masih menggulung dari pucukan tanaman tebu varietas PS 094 dan media yang digunakan adalah media MS (Murashige dan Skoog). Hasil penelitian menunjukkan induksi kalus varietas PS 094 pada media Murashige dan Skoog memiliki 3 kendala yaitu, kontaminasi, browning dan kalus bersifat non-embrionik.

Kata kunci: Induksi Kalus, PS 094, Media MS

1. PENDAHULUAN

Tebu atau *Saccharum officinarum* merupakan salah satu tanaman penting yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan berpotensi dikembangkan di negara iklim tropis seperti Indonesia. Tebu dimanfaatkan sebagai bahan baku produksi gula kristal putih [1]. Berdasarkan sumber data dari badan pusat statistika pada tahun 2020 produksi gula kristal putih Indonesia mengalami penurunan sebesar 4,52% dari produksi 2,20 juta ton pada tahun 2019 menjadi 2,13 juta ton pada tahun 2020. Penurunan produksi gula kristal putih pada tahun 2020 mengakibatkan jumlah kebutuhan konsumsi gula dalam negeri belum terpenuhi. Tercatat, konsumsi gula nasional tahun 2020 sebesar 2,66 juta ton sehingga neraca gula kristal putih Indonesia mengalami defisit sekitar 500 ribu ton. Langkah yang dapat diempuh untuk memenuhi kebutuhan gula nasional dengan meningkatkan produktivitas tebu, perluasan area tanam dan mendorong adanya investasi untuk pembangunan pabrik gula baru.

Tanaman tebu terus mengalami perkembangan baik cara perbanyakan maupun mutu varietas yang dihasilkan [2]. Pengembangan varietas terus dilakukan untuk meningkatkan mutu produktivitas tebu. Salah satu jenis varietas tebu harapan unggul P3GI adalah PS 094. Keunggulan varietas tebu PS 094 antara lain memiliki kadar sabut tinggi $13,1 \pm 0,75\%$, masak tengah lambat, pelepah mudah dikelentek, sangat tahan terhadap penyakit belendok, mempunyai daya tahan kepras yang baik, toleran terhadap drainase jelek (genangan), dan tahan terhadap perawatan minimal. Upaya pemenuhan kebutuhan gula dalam negeri melalui peningkatan produktivitas tebu dan perluasan area tanam harus diimbangi dengan penyediaan bibit unggul dalam skala besar, sekitar 1,5 sampai 2 miliar bibit per tahun [3].

Metode kultur jaringan saat ini diyakini sebagai metode alternatif dalam mengatasi permasalahan produksi bibit tanaman [4]. Metode kultur jaringan dipercaya dapat menghasilkan tanaman baru dalam bentuk bibit dengan waktu relatif singkat, jumlah yang

besar, terbebas dari hama dan penyakit serta tidak bergantung dengan musim. Dasar dari metode kultur jaringan adalah teori totipotensi, yaitu kemampuan sel suatu tanaman yang dapat tumbuh menjadi tanaman sempurna apabila ditempatkan pada lingkungan yang tepat [5].

Salah satu teknik kultur jaringan yang sudah dijadikan metode baku di laboratorium kultur jaringan Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) dan pabrik gula di Indonesia adalah kultur kalus [6]. Kalus ditumbuhkan dari penanaman jaringan daun muda yang masih menggulung dari pucukan tanaman tebu umur 3 -7 bulan. Media dasar untuk pertumbuhan kalus adalah media MS dengan penambahan air kelapa 10% dan hormon 2,4D sebesar 3 ppm. Peneliti [6] mengatakan upaya pemenuhan bibit secara kultur kalus dapat terjadi apabila kalus yang dihasilkan dari eksplan mempunyai kualitas yang baik (embrionik) yaitu bertekstur kompak, berwarna putih kekuningan, dan friable, namun pada kenyataannya tidak semua varietas tebu dapat menghasilkan kalus yang bersifat embrionik jika tetap menggunakan metode baku.

Keberhasilan regenerasi tanaman tebu secara invitro tergantung pada genotipe tanaman, sumber eksplan, dan formulasi media [7]. Oleh karena itu dibutuhkan pengetahuan dan penguasaan sistem regenerasi setiap varietas tebu secara in vitro dan mengavaluasi kendala yang terjadi. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kendala yang terjadi dalam induksi kalus varietas PS 094 pada media dasar Murashige dan Skoog.

2. METODE

2.1 Bahan Percobaan

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini meliputi eksplan tebu varietas PS 094 umur 6 bulan berupa daun menggulung dari batang muda, larutan stok A-F (terdiri atas hara makro, hara mikro, vitamin, dan hormon), alkohol 70%, spirtus, agarose, gula/sukrosa, air kelapa, NaOH 1 N dan HCl 1 N, aquades, dan aluminium foil.

2.2 Alat Percobaan

Alat yang digunakan meliputi tabung kultur, *laminar air flow* (LAF), bunsen, autoklaf, *magnetic stirrer*, pH meter, gelas ukur, spatula, pipet, tissue, kapas spidol, rak kultur, peralatan direksi (pisau, scalpel), timbangan digital dan analitik.

2.3 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang harus disterilkan adalah botol kultur, scalpel, dan pinset. Alat-alat tersebut dicuci sampai bersih lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 400°C selama 2 jam dan di sterilisasi pada suhu 160°C selama 3 jam.

2.4 Pembuatan Larutan Stok

Pembuatan larutan stok diawali dengan ditimbang bahan-bahan kimia sesuai komposisi dan takaran media MS, kemudian dilarutkan dengan aquades. Larutan tersebut diaduk sampai homogen menggunakan magnetic stirrer, lalu dimasukkan dalam erlenmeyer dan disimpan dalam lemari pendingin.

2.5 Pembuatan Media MS

Media MS dibuat dengan mencampur larutan stok A-F, gula, air kelapa, dan aquades ke dalam labu takar. pH media ditepatkan 5,8 kemudian media dipadatkan dengan 8 gram agarose. Sterilisasi media dilakukan menggunakan autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 30 menit lalu disimpan di dalam ruang steril.

2.6 Sterilisasi Eksplan

Proses sterilisasi eksplan kultur jaringan dilakukan di dalam laminar air flow. Bahan tanam yang digunakan adalah daun menggulung yang berasal dari pucukan tebu varietas PS 094 umur 6 bulan. Pucukan tebu dicelupkan di dalam larutan alkohol 70% kemudian dilewatkan diatas api bunsen dan dibiarkan alkoholnya habis terbakar. Pelepah dikupas sampai terlihat daun muda yang masih menggulung, dengan diameter kurang lebih 1 cm.

Setelah daun muda menggulung didapatkan, dilanjut dengan pemotongan eksplan secara horizontal dengan tebal 3 mm sebanyak 10-12 potong dan diberi goresan luka pada eksplan.

2.7 Tanam Eksplan

Eksplan daun menggulung tebal 3 mm diambil menggunakan jarum ose yang telah steril dan langsung ditanam pada media kultur. Satu tabung media tanam diisi satu potong eksplan, kemudian tabung media tanam di tutup kembali menggunakan alumunium foil dan disimpan di rak ruang gelap kultur jaringan selama 4 minggu pada suhu 200C-240C. Pada penelitian ini dilakukan 4 kali pengulang proses tanam eksplan. Tanam eksplan ulangan1 sebanyak 10 tabung, tanam eksplan ulangan 2 sebanyak 10 tabung, tanam eksplan ulangan 3 sebanyak 12 tabung dan ulangan 4 sebanyak 5 tabung.

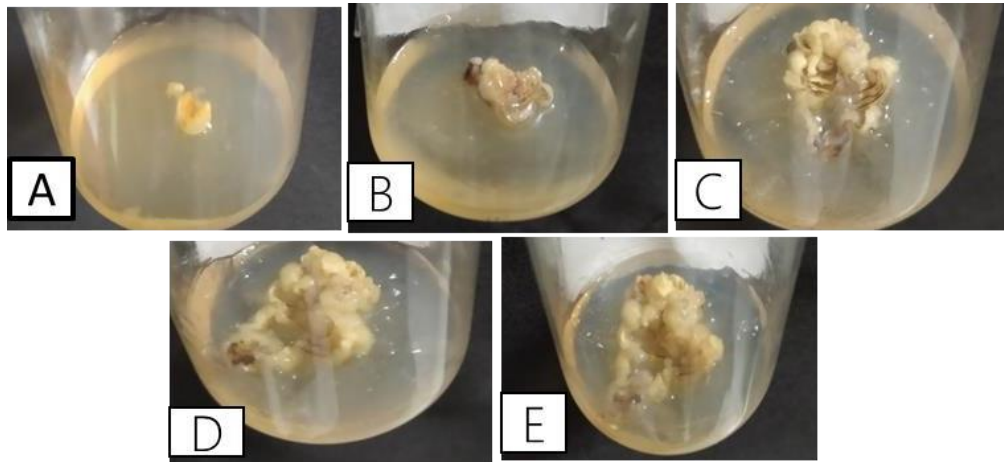
2.8 Subkultur

Subkultur dilakukan setelah eksplan ditanam selama 4 minggu. Subkultur dilakukan untuk memperbanyak jumlah eksplan. Teknik yang digunakan pada subkultur PS 094 adalah cacah. Hasil pencacahan eksplan di tanam kembali pada media MS I dengan jumlah 8 cacahan eksplan dalam 1 tabung. Lalu disimpan di rak ruang gelap kultur jaringan selama 4 minggu pada suhu 20°C-24°C. Kemudian tabung media tanam di tutup kembali menggunakan alumunium foil. Pada penelitian ini dilakukan 5 kali pengulang subkultur. Subkultur ke-1 sebanyak 6 tabung, subkultur ke-2 sebanyak 5 tabung, subkultur ke-3 sebanyak 4 tabung, subkultur ke-4 sebanyak 5 tabung dan subkultur ke 5 sebanyak 5 tabung.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

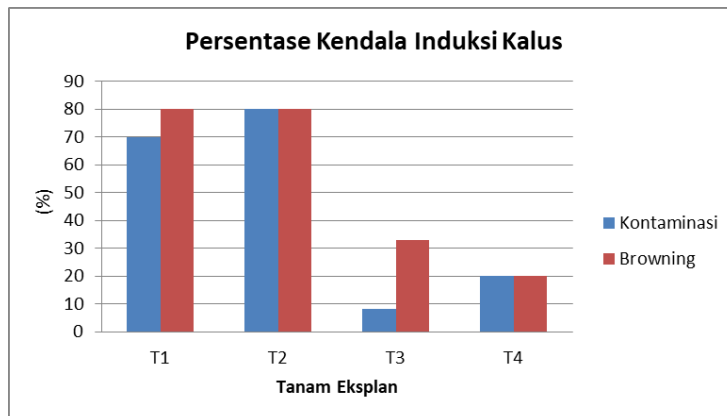
Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah irisan daun muda yang masih menggulung dari pucukan tanaman tebu varietas PS 094 yang berumur 6 bulan. Munculnya kalus pada eksplan merupakan salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur in-vitro [8]. Kalus merupakan proliferasi massa sel yang belum terdiferensiasi dan terdiri dari sel yang tidak teratur. Induksi kalus merupakan tahap penting untuk membentuk massa sel yang aktif membelah dalam jumlah yang tidak terbatas [9]. Induksi kalus diawali dengan membukanya daerah pelukaan yang disertai dengan pembengkakan akibat respons dari eksplan terhadap zat pengatur tumbuh yang terdapat dalam media [1]. Peneliti [11] bahwa pembengkakan pada eksplan terjadi karena adanya pengaruh pemberian 2,4-D yang memacu pembelahan dan perbanyak sel akibat penyerapan air, nutrisi dan zat pengatur tumbuh dari media.

Kalus umumnya muncul pada permukaan eksplan berbentuk bulat/globular. Berdasarkan warna dan tekstur yang menggambarkan penampilan visual dan kuantitas kalus dibedakan menjadi kalus embrionik dan kalus non-embrionik. Kalus embrionik dicirikan dengan tekstur kering, remah, dan berwarna putih susu atau krem, sedangkan non embrionik dicirikan dengan struktur kalus kompak, basah (berair), dan berwarna bening kecoklatan [12] dalam [1]. Hasil induksi kalus varietas PS 094 pada media MS memiliki ciri basah (berair) dan berwarna bening kecoklatan atau bersifat non embrionik, seperti yang terlihat pada Gambar 3.1. Kalus seperti ini tidak dapat beregenerasi menjadi tanaman lengkap meskipun ditumbuhkan pada media differensiasi [6].

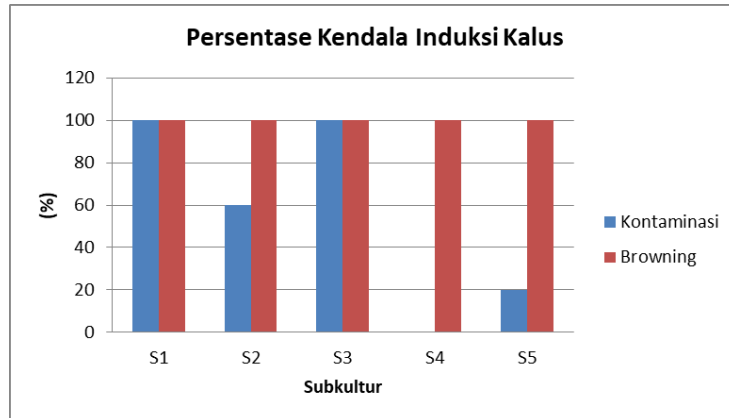


Gambar 3.1 Eksplan PS 094 menghasilkan kalus yang bersifat non-embrik. (A = Minggu ke-0, B= Minggu ke-1, C= Minggu ke-3, dan D=Minggu ke-4)

Selain terkendala kalus yang dihasilkan bersifat non-embrik, induksi kalus varietas PS 094 yang dilakukan dengan 4 kali pengulangan tanam eksplan dan 5 kali subkultur juga mengalami kendala kontaminasi dan *browning*. Persentase tingkat kontaminasi dan *browning* dari masing-masing pengulangan tanam eksplan dan subkultur pada minggu ke-4 setelah tanam, seperti yang terlihat pada Gambar 2 dan 3.

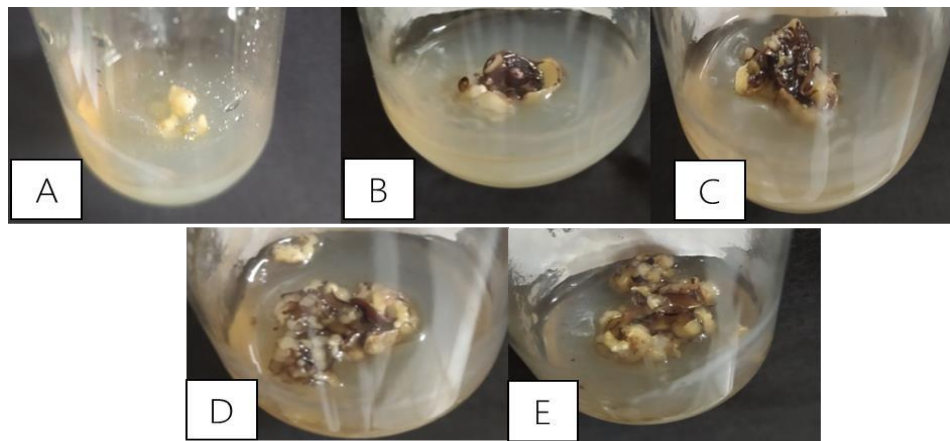


Gambar 3.2 Persentase kontaminasi dan *browning* tanam eksplan PS 094 pada 4 minggu setelah tanam. T1 = Tanam eksplan ke-1, T2 = Tanam eksplan ke-2, T3 = Tanam eksplan ke-3, T4 = Tanam eksplan ke-4.

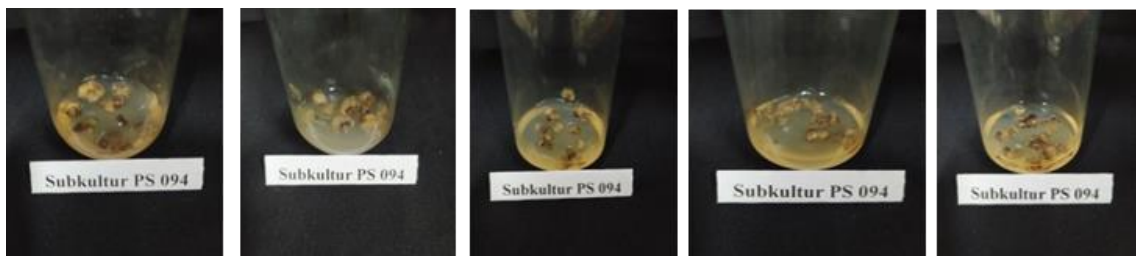


Gambar 3.3 Persentase kontaminasi dan *browning* subkultur PS 094 pada 4 minggu setelah subkultur. S1 = Subkultur ke-1, S2 = Subkultur ke-2, S3 = Subkultur ke-3, S4 = Subkultur ke-4, dan S5 = Subkultur ke-5.

Dari Gambar 3.2 terlihat bahwa tingkat *browning* pada tanam eksplan ulangan ke-1 dan ke-2 mencapai 80% dari total 10 tabung eksplan pada masing-masing tanam. Tingkat *browning* mulai menurun pada ulangan ke-3 dan 4 yang menunjukkan angka 33% dari total 12 tabung eksplan dan 20% ulangan ke-4 dari total 5 tabung eksplan. Dari sajian Gambar 3.3 tingkat *browning* dari subkultur ulangan ke-1 sampai ke-4 mencapai 100%. Kondisi eksplan yang mengalami *browning* seperti yang terlihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4 Perkembangan eksplan yang disertai *browning* pada minggu ke-0 sampai minggu ke-4. (A = Minggu ke-0, B= Minggu ke-1, C= Minggu ke-3, dan D=Minggu ke-4)



Gambar 3.5 Subkultur PS 094 yang mengalami *browning*.

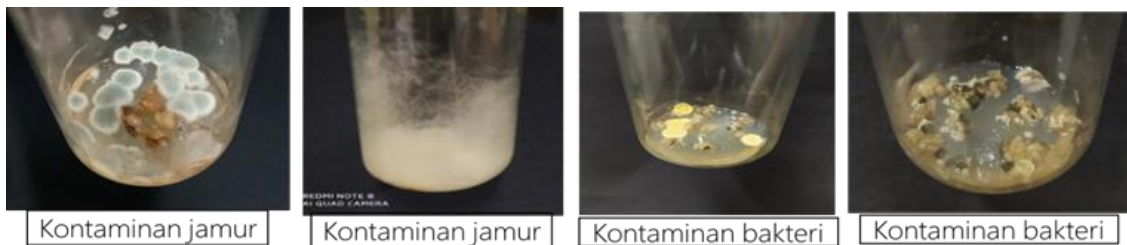
Browning merupakan berubahnya eksplan menjadi berwarna kecoklatan sesaat setelah diisolasi [12]. Perubahan warna menjadi coklat (pencoklatan) dalam kultur jaringan terjadi karena akumulasi polifenol oksidase yang dilepas atau disintesis jaringan dalam kondisi teroksidasi ketika sel dilukai. Luka pada jaringan tumbuhan memacu stres dan menyebabkan peningkatan aktivitas enzim fenilalanin amonia liase (PAL) yang merupakan enzim kunci dalam pembentukan senyawa fenolik. Hal ini mengakibatkan terakumulasinya senyawa fenolik

pada bagian terluka, yang kemudian akan teroksidasi oleh enzim polifenol oksidase dan menghasilkan senyawa fenilpropanoid yang menyebabkan pencoklatan.

Proses pencoklatan atau *browning* dapat menghambat terjadinya pembentukan organ tunas dan akar dari kalus [6]. Menurut Tang dan Newton pencoklatan jaringan sangat menurunkan regenerasi secara in vitro dari kultur kalus pada beberapa tanaman berkayu, khususnya regenerasi tanaman melalui jalur organogenesis. Berdasarkan Penelitian [12] pencoklatan pada kultur jaringan dapat dihindari dengan beberapa cara, antara lain menghilangkan produksi senyawa fenol, modifikasi potensial redoks, penghambatan aktivasi enzim fenol oksidase, penurunan aktivitas fenolase, dan ke-tersediaan substrat.

Selain *browning*, kontaminasi juga menjadi kendala yang sering mengganggu proses induksi varietas PS 094. Dari Gambar 2 tingkat kontaminasi tanam eksplan ke-1 mencapai 80% dari total 10 tabung eksplan. Pada ulangan ke-2 tingkat kontaminasi naik menjadi 100% dari total 10 tabung eksplan. Naiknya tingkat kontaminasi dapat disebabkan oleh faktor suhu yang tidak stabil pada masa inkubasi eksplan. Pada ulangan ke-3 tingkat kontaminasi sebesar 8,30% dari total 12 tabung, dan 20% untuk tanam eksplan ulangan ke- 4 dari total 5 tabung eksplan.

Kendala kontaminasi juga kembali terjadi tahap subkultur. Dari total 6 tabung subkultur ulangan ke-1 dan 4 tabung eksplan ulangan ke-3 memiliki tingkat kontaminasi sebesar 100%. Tingkat kontaminasi mulai menurun pada subkultur ulangan ke-2 yang memiliki persentase 60% dari total 5 tabung subkultur dan 20% pada subkultur ulangan ke-5 dari total 5 tabung. Tingkat kontaminasi terendah terdapat subkultur ulangan ke-4 dengan persentase sebesar 0% (tidak ada yang mengalami kontaminasi). Kontaminasi yang terjadi pada eksplan seperti yang terlihat pada Gambar 3.6.



Gambar 3.6 Eksplan yang mengalami kontaminasi akibat jamur dan bakteri.

Jenis kontaminan yang ditemukan adalah jamur dengan hifa yang berwarna putih, jamur dengan hifa yang berwarna hitam, jamur yang berwarna hijau kehitaman, bakteri berwarna putih susu, dan bakteri berwarna kuning susu. seperti yang terlihat pada Gambar 3.5. Kontaminan yang paling banyak ditemukan pada induksi kalus tebu varietas PS 094 adalah jamur hifa putih yang menempel pada tabung kultur. Dari keempat jenis kontaminan yang didapatkan, jamur yang berwarna hijau kehitaman adalah kontaminan yang paling cepat merusak kultur. Perkembangbiakan dan pertumbuhan jamur ini sangat cepat dengan membentuk spora- spora berwarna hijau gelap yang mampu menutupi seluruh permukaan media kultur. Akibatnya eksplan tidak mampu tumbuh dan bersaing, yang akhirnya akan mati. Ada beberapa faktor yang menyebabkan kontaminasi antara lain (a) bahan eksplan yang digunakan masih mengandung mikroorganisme patogen, (b) sterilisasi yang kurang sempurna terhadap eksplan (c) waktu sterilisasi yang kurang optimal, dan (d) kurang cermat pada saat penanaman eksplan [13]

Keberhasilan regenerasi tanaman secara kultur jaringan bersifat spesifik [1]. Formulasi media tanaman tertentu belum tentu dapat digunakan untuk varietas lainya [14]. Setiap genotipe memiliki respon yang berbeda di dalam kultur in vitro [15]. Setiap genotipe juga membutuhkan konsentrasi dan rasio ZPT(zat pengatur tumbuh) yang tepat untuk meningkatkan multifikasi. Hal ini juga dipertegas dalam penelitian [7] yang menyatakan bahwa keberhasilan regenerasi tanaman tebu secara in vitro tergantung dari genotipe tanaman, sumber eksplan dan formulasi media.

Kendala yang terjadi perihal tidak munculnya kalus embrionik pada varietas PS 094 diduga sejalan dengan pernyataan peneliti [6], Penelitian yang dilakukan Purnamaningsih

(2016) [14] dan Khan (2010) [16] bahwa terdapat beberapa varietas tebu komersial yang tidak dapat menghasilkan kalus embrionik, hal ini dikarenakan sifat daya produksi dan regenerasi kalus yang rendah atau disebut recalcitrant [17], sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai sumber eksplan, genotipe tanaman, formulasi media dan ZPT yang tepat untuk induksi kalus tebu varietas PS 094.

4. SIMPULAN

Induksi kalus merupakan tahap awal dari teknik kultur in vitro yang bertujuan untuk menghasilkan kalus embrionik secara massal. Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan proses induksi kalus varietas PS 094 pada media Murashige dan Skoog memiliki 3 kendala yaitu, kontaminasi, *browning* dan kalus bersifat non-embrionik. Sebagai upaya dalam mengatasi kendala *browning* disarankan untuk menghilangkan produksi senyawa fenol dan menghambat kerja enzim fenol oksidase. Hal ini dapat dilakukan melalui penambahan arang aktif pada media tanam dan EDTA. Perihal kendala kalus PS 094 bersifat non-embrionik disarankan untuk penelitian lebih lanjut mengenai genotipe, formulasi media dan zat pengatur tumbuh yang tepat untuk induksi kalus tebu varietas PS 094.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI) dan Program Studi S1 Bioteknologi Universitas Negeri Malang yang telah memfasilitasi sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Suhesti, S., Khumaida, N., Wattimena, G. A., Syukur, M., Husni, A., Hadipoentyanti, E., & Hartati, R. S. (2020). Induksi Kalus Dan Regenerasi Dua Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Secara In Vitro. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*, 21(2), 77. Retrieved from <https://doi.org/10.21082/LITTRI.V21N2.2015.77-88>.
- [2] Alfian, F. N., Restanto, D. P., & Soeparjono, S. (2015). PERTANIAN INDUKSI KALUS EMBRIOGENIK TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.) VARIETAS NXI 1-3 Induction of Embryogenic Callus of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Variety NXI 1-3. *Berkala Ilmiah Pertanian*, 1(1), 78–88.
- [3] Minarsih, H., Riyadi, I., Sumaryono, & Budiani, A. (2016). Mikropropagasi planlet tebu menggunakan sistem perendaman sesaat (SPS) Micropropagation of sugarcane plantlets using temporary immersion system (TIS). *E-Journal Menara Perkebunan*, 81(1). Retrieved 27 May 2022 from <https://doi.org/10.22302/IRIBB.JUR.MP.V81I1.53>.
- [4] Sukmadjaja, D., Supriyati, Y., & Pardal, S. J. (2016). Kultur Apeks untuk Penyediaan Bibit Unggul Tebu Varietas PS864 dan PS881. *Jurnal AgroBiogen*, 10(2), 45. Retrieved from <https://doi.org/10.21082/JBIO.V10N2.2014.P45-52>.
- [5] Suryowinoto, M. (1997). *Pemuliaan tanaman secara in vitro*. Kanisius.
- [6] Widyasari, W. B., Murdiyatmo, U., & Suminingrum, A. (1998). Kendala Sistem Mikropropagasi Tebu Melalui Kultur Kalus Dan Upaya Mengatasinya. *Majalah Penelitian Gula*, XXXIV(2), 9–22.
- [7] Behera, K. K., & Sahoo, S. (2009). Rapid In vitro Micro propagation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) Through Callus Culture. *Nature and Science*, 7(4).
- [8] Rasud, Y. (2020). Induksi Kalus secara In Vitro dari Daun Cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.) dalam Media dengan Berbagai Konsentrasi Auksin (In Vitro Callus Induction from Clove (*Syzigium aromaticum* L.) Leaves on Medium Containing Various Auxin Concentrations), 25(1), 67–72. Retrieved from <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>.
- [9] Kalus, I., Nyamplung, D., & Bap, K. (2013). Induksi Kalus Daun Nyamplung (, 2(1), 1–6.

- [10] Dwipayana, gusti arya janatik; Yuswanti, hestin; Mayun, ida ayu. (2016). No Title. *E-Jurnal Agroteknologi Tropika*, 5, No.3(Induksi Kalus Stroberi (*Fragaria* spp.) Melalui Aplikasi Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat Secara In Vitro), 310–321.
- [11] Gandonou, C., Errabii, T., Abrini, J., Idaomar, M., Chibi, F., & Skali Senhaji, N. (2011). Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum* sp.). *African Journal of Biotechnology*, 4(11), 1250–1255. Retrieved 19 May 2022 from <https://doi.org/10.4314/ajb.v4i11.71384>
- [12] Hutami, S. (2008). 2_2008_Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan, 4(2), 83–88.
- [13] Karjadi, A. K., & Buchory, A. (2008). Pengaruh Komposisi Media Dasar, Penambahan BAP, dan Pikloram. *J. Hort*, 18(1), 1–9.
- [14] Purnamaningsih Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, R. (2016). Induksi Kalus dan Optimasi Regenerasi Empat Varietas Padi melalui Kultur In Vitro. *Jurnal AgroBiogen*, 2(2), 74–80. Retrieved 19 May 2022 from <https://doi.org/10.21082/jbio.v2n2.2006.p74-80>.
- [15] Snyman, S. J., Meyer, G. M., Koch, A. C., Banasiak, M., & Watt, M. P. (2011). Applications of in vitro culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2011 47:2, 47(2), 234–249. Retrieved 19 May 2022 from <https://doi.org/10.1007/S11627-011-9354-7>
- [16] Khan, S. A., Rashid, H., Chaudhary, M. F., Chaudhry, Z., & Afroz, A. (2010). Rapid micropropagation of three elite Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology*, 7(13), 2174–2180. Retrieved 19 May 2022 from <https://doi.org/10.4314/ajb.v7i13.58945>.
- [17] Plant, D. B., & Benson, E. E. (2014). In vitro Plant Recalcitrance : An Introduction Author (s): Erica E . Benson Source : In Vitro Cellular & Developmental Biology . Plant , Vol . 36 , No . 3 (May - Jun . , 2000), pp . Published by : Society for In Vitro Biology Stable URL : <http://www.js>, 36(3), 141–148.