

Karakteristik Kalus dari Eksplan Batang Planlet Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) pada Media dengan Konsentrasi 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) dan 6-Benzylaminopurine (BAP) serta Kondisi Pencahayaan

Tia Setiawati^{1*}, Annisa Nur Arofah², Ani Lestari³, Rusdi Hasan⁴

^{1,2,4}Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Padjadjaran, Bandung-Sumedang, Indonesia

³Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Singaperbangsa, Karawang

*Corresponding author: tia@unpad.ac.id

Article History

Received : 28 November 2024

Approved : 30 November 2024

Published : 30 November 2024

Keywords

Callus, *Chrysanthemum*, media, texture, dark, light

ABSTRACT

*This research aimed to obtain the optimal concentration combination of 2,4-D and BAP growth regulators for inducing callus from the stem explant of Chrysanthemum (*C. morifolium* Ramat) in bright and dark conditions. Stem explants of chrysanthemum were grown in culture medium supplemented with various concentrations and combinations of 2,4-D and BAP under different lighting conditions for 45 days after culture. A laboratory-scale experimental method was used in this research using Completely Randomized Design (CRD). The observed parameters were induction time, percentage formation, size, fresh weight, dry weight, texture, color, and various responses generated by callus. All data were analyzed descriptively. The results showed that all concentrations and combinations of growth regulators could induce callus. In bright condition, the fastest callus induction time was 7 days after culture; most calli were dark green and dark brown colored with compact texture; the callus size was 1.36 cm; also, the highest dry weight generated by callus was 0.17 gram. Meanwhile, in dark conditions, the fastest callus induction time was 6 days after culture; most calli were light green and light brown colored with compact texture; the callus size was 1.18 cm; and the highest dry weight generated by callus was 0.15 gram.*

© 2024 Universitas Kristen Indonesia

Under the license CC BY-SA 4.0

PENDAHULUAN

Tanaman krisan dikenal sebagai penghasil bunga dengan bentuk, rupa, dan warna yang menarik. Krisan atau seruni (*Chrysanthemum* sp.) merupakan komoditas

andalan dalam industri hortikultura karena memiliki bentuk, tipe, dan warna bunga yang beranekaragam (Qiu et al., 2023). Krisan dengan nilai estetikanya yang tinggi menjadi salah satu dari empat bunga potong

yang paling banyak diminati di seluruh dunia, sehingga tanaman ini menempati posisi yang sangat penting dalam industri tanaman hias (florikultura). Diperkirakan ada lebih dari 20.000 kultivar krisan di dunia (Wang et al., 2014). Meningkatnya minat masyarakat terhadap tanaman krisan tidak diimbangi dengan peningkatan produksi tanaman ini. Pengembangan budidaya tanaman hias krisan juga dihambat oleh berbagai kendala seperti teknologi pembibitan yang belum mampu menyediakan bibit bermutu tinggi dalam jumlah banyak dan waktu yang relatif singkat (Hayati et al., 2019).

Permasalahan tersebut dapat diatasi melalui upaya perbanyak tanaman secara *in vitro* atau kultur jaringan. Kultur *in vitro* tanaman memiliki potensi yang sangat besar dalam program pemuliaan tanaman serta penyediaan benih dan bibit berkualitas. Perbanyak dengan teknik kultur *in vitro* memungkinkan bibit dapat dihasilkan dalam kurun waktu yang relatif cepat dan jumlah yang banyak, serta tidak tergantung pada iklim dan musim (Zuzarte et al., 2024). Perbanyak tanaman secara *in vitro* dapat dilakukan melalui proses organogenesis dan embriogenesis baik secara langsung maupun tidak langsung, sehingga akan terjadi regenerasi massa kalus membentuk tanaman utuh. Dengan demikian protokol induksi kalus yang efisien sangat penting sebagai prasyarat dalam memanfaatkan keunggulan

sel dan kultur jaringan untuk perbaikan genetik dalam pemuliaan tanaman (Song et al., 2023).

Keberhasilan induksi kalus secara *in vitro* dipengaruhi oleh kondisi fisik lingkungan, diantaranya cahaya. Cahaya dapat memengaruhi perkembangan tumbuhan secara *in vivo* dan *in vitro*. Keadaan suatu kultur dipengaruhi oleh fotoperiodisitas, kualitas, dan intensitas cahaya (Cavallaro et al., 2022). Cahaya dapat mempengaruhi morfologi kalus seperti tekstur dan warna kalus (D'nofrio & Morini, 2002; Lai et al., 2022). Cahaya juga berpengaruh terhadap metabolisme sel dan efektivitas kerja zat pengatur tumbuh dalam media (Dutta Gupta & Agarwal, 2017). Keberhasilan kultur jaringan juga ditentukan oleh faktor lain seperti komposisi zat pengatur tumbuh (ZPT), sumber eksplan, dan jenis tanaman. Aspek penting yang harus diperhatikan pada komposisi suatu media adalah kebutuhan terhadap ZPT, khususnya kombinasi dan konsentrasi ZPT yang digunakan (Sari et al., 2014). ZPT yang banyak digunakan untuk induksi kalus adalah kombinasi antara hormon auksin dan hormon sitokinin (Astutik et al., 2022; Bano et al., 2022).

Pada penelitian ini, hormon auksin yang digunakan adalah 2,4-*Dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa 2,4-D memiliki peran yang sangat signifikan

terhadap proses pembentukan kalus, terkait dengan diferensiasi maupun peningkatan kompetensi sel yang terbentuk (Rashid & Neamah, 2023). Pemberian sitokinin dalam kultur kalus berperan penting dalam memicu pembelahan dan pemanjangan sel, sehingga dapat mempercepat pertumbuhan dan perkembangan kalus (Ruvalcaba-Ruiz, D; Rojas-Bravo, D., Valencia-Botín, 2010). Salah satu jenis ZPT dari golongan sitokinin yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* ialah *6-Benzylaminopurine* atau BAP (Pratiwi et al., 2024).

Penelitian terdahulu mengenai kultur *in vitro* krisan khususnya karakteristik kalus telah dilakukan menggunakan eksplan daun planlet krisan. Penelitian mengenai karakterisasi kalus asal eksplan batang planlet krisan dengan modifikasi konsentrasi ZPT dan manipulasi pencahayaan sebagai perlakuan pada penelitian ini belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dan memperoleh kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP yang paling optimum bagi pertumbuhan dan perkembangan kalus eksplan batang krisan (*C. morifolium* Ramat) pada kondisi terang maupun gelap. Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi mendasar terkait induksi kalus krisan yang bermanfaat baik dalam upaya perbanyak mikro maupun aplikasi lainnya seperti produksi metabolit sekunder asal kalus krisan.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah agar bubuk, akuades steril, alkohol 70%, gula, media MS (*Murashige and Skoog*) bubuk (*PhytoTechnologyLaboratories*®), planlet *Chrysanthemum morifolium* Ramat var. Tomohon Kuning yang diperoleh dari Balai Pengembangan Benih Hortikultura dan Aneka Tanaman (BPBHAT) Pasir Banteng, spirtus, serta zat pengatur tumbuh golongan auksin (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*) dan sitokinin (*6-Benzylaminopurine*).

Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal yang terdiri dari 4 kombinasi ZPT 2,4-D dan BAP yaitu B₁D₁ (2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP), B₁D₂ (4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP), B₂D₁ (2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP), dan B₂D₂ (4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP). Kultur diinkubasi pada kondisi pencahayaan yang berbeda yaitu terang dan gelap. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Pengamatan terhadap pertumbuhan kalus dilakukan selama 45 HST yang meliputi waktu muncul kalus, tekstur, warna, dan respon lain pada kalus, persentase pembentukan kalus, ukuran, dan berat kering kalus. Seluruh data pengamatan yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

Prosedur Penelitian

Sterilisasi Lingkungan Kerja

Permukaan LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*) disterilkan menggunakan alkohol 70% dengan cara disemprotkan lalu dibersihkan dengan kapas secara merata. *Dissecting set* (gunting, pinset, dan *scalpel*) serta alat lain yang telah disterilkan dan akan digunakan dalam proses penanaman eksplan dimasukkan ke dalam LAFC. Lampu Ultra Violet (UV) dinyalakan selama ± 2 jam untuk mematikan kontaminan.

Pembuatan Media Perlakuan

Pembuatan media perlakuan dilakukan dengan cara menimbang bubuk media MS (*Murashige and Skoog*) sebanyak 4,43 g/L dan gula 30 g/L. Kedua bahan tersebut dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dengan akuades hingga volume larutan mencapai 1 L. Derajat keasaman (pH) media diukur menggunakan pH meter hingga nilai pH berkisar 5,6-5,8.

Nilai pH diatur dengan menambahkan beberapa tetes NaOH 1 N untuk menaikkan pH atau HCl 1 N untuk menurunkan pH. Agar bubuk sebanyak 9 g/L dimasukkan ke dalam larutan, kemudian diaduk hingga homogen dan dipanaskan hingga mendidih. Selanjutnya, larutan media sebanyak ± 10 mL dituangkan ke dalam botol-botol kultur dan ditutup dengan *aluminium foil*, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf

pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama ± 15 menit.

Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAFC yang sebelumnya telah disterilkan. Eksplan yang digunakan berupa batang planlet krisan. Penanaman eksplan dilakukan dengan cara mengambil planlet dari dalam botol kultur menggunakan pinset, lalu planlet tersebut diletakkan di dalam cawan petri steril yang telah dilapisi dengan kertas saring. Bagian batang planlet dipotong dengan ukuran ± 1 cm, kemudian ditanam ke media perlakuan pada posisi horizontal. Setiap botol kultur berisi empat potongan eksplan batang krisan tanpa nodus.

Inkubasi kultur dilakukan selama 45 HST di ruang kultur dengan suhu ruang yang terkontrol dan kondisi pencahayaan yang berbeda. Suhu ruangan diatur pada kisaran 18-27°C. Sebanyak 12 botol kultur diinkubasi pada kondisi terang dengan intensitas cahaya 2000 lux dan 12 botol kultur lainnya diinkubasi pada kondisi gelap dengan cara ditutup menggunakan kain hitam.

Pengambilan Data

Pengamatan Parameter Pertumbuhan Kalus

Pengamatan dilakukan pada hari ke-45 setelah tanam. Pengamatan terhadap waktu muncul, tekstur, warna, dan respon lain yang dihasilkan oleh kalus dilakukan secara visual. Pengukuran diameter kalus diambil

dari sisi terpanjang kalus menggunakan penggaris atau kertas milimeter blok (Ubudiyah & Nurhidayati, 2013). Berat basah kalus ditimbang menggunakan neraca analitik. Berat kering kalus ditentukan dengan mengeringkan kalus ke dalam oven pada suhu 50°C selama \pm 48 jam atau hingga mencapai berat kering konstan.

Analisis Data

Data pengamatan pada percobaan berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif meliputi parameter waktu muncul, tekstur, warna, dan respon lain yang dihasilkan oleh kalus. Data kuantitatif meliputi parameter persentase pembentukan, ukuran, berat basah, dan berat kering kalus. Seluruh data pengamatan yang telah diperoleh dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Waktu Muncul Kalus

Salah satu indikator terjadinya pertumbuhan dalam kultur *in vitro* adalah kemunculan kalus pada eksplan. Pembentukan kalus ditandai dengan terjadinya penebalan jaringan atau pembengkakan pada bagian eksplan yang telah mengalami pelukaan (sayatan). Kalus yang terbentuk merupakan respon eksplan yang ditanam terhadap penambahan ZPT ke dalam media perlakuan (Zhai & Xu, 2021).

Eksplan batang krisan yang ditumbuhkan pada media MS dengan empat

perlakuan kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP pada kondisi pencahayaan yang berbeda menunjukkan respon yang beragam terhadap waktu munculnya kalus. Eksplan batang krisan mampu membentuk kalus dalam rentang waktu 6 hingga 12 HST pada dua kondisi pencahayaan yang berbeda (terang dan gelap). Perbedaan waktu induksi kalus setiap perlakuan dapat disebabkan oleh perbedaan kemampuan setiap eksplan dalam menyerap unsur hara dari media kultur (Guo & Jeong, 2021; Mardiana et al., 2024).

Perlakuan 2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP dan 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP mampu memacu pembentukan kalus tercepat yakni hanya dalam waktu 7 HST pada kondisi terang. Pada kondisi gelap, induksi kalus tercepat diperoleh dalam waktu 6 HST pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP. Pemberian ZPT 2,4-D dalam konsentrasi tinggi (4 ppm) dan BAP dalam konsentrasi rendah (0,5 ppm) mampu menghasilkan rata-rata waktu pembentukan kalus tercepat, sedangkan perlakuan dengan konsentrasi ZPT 2,4-D yang lebih rendah dan BAP yang lebih tinggi mengakibatkan inisiasi kalus semakin terhambat.

Pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara *in vitro* dipengaruhi oleh adanya interaksi dan keseimbangan antara konsentrasi ZPT yang ditambahkan ke dalam media kultur. Venkateshwarlu (2022) menjelaskan bahwa pada kultur *in vitro*, morfogenesis dari eksplan tergantung pada

hasil interaksi antara hormon auksin dan sitokinin yang ditambahkan (eksogen) serta hormon yang telah terkandung dalam eksplan (endogen). Khalifa et al. (2023) dan Ozias-Akins dan Vasil (1983) melaporkan bahwa kadar ZPT yang lebih tinggi dari titik atau batas optimum menyebabkan induksi dan pertumbuhan kalus menjadi terhambat.

Faktor lain yang dapat memengaruhi waktu induksi kalus adalah cahaya. Waktu induksi kalus tercepat yakni 6 HST diperoleh pada kalus yang diinkubasi dalam kondisi gelap. Menurut Venkateshwarlu (2022), cahaya dapat merusak kerja auksin dan dapat pula menyebabkan perpindahan auksin ke arah yang menjauhi cahaya. Metode kultur jaringan dalam kondisi gelap merupakan salah satu cara untuk mengefektifkan kerja auksin sehingga dapat mempercepat pembentukan kalus. Andaryani et al. (2022) dan Karami et al. (2022) menambahkan bahwa 2,4-D termasuk ke dalam kelompok auksin yang umum digunakan untuk menginduksi kalus dalam kondisi tanpa cahaya (gelap). Pada kondisi gelap, auksin tidak mudah terdegradasi sehingga mempercepat waktu inisiasi kalus pada eksplan.

Persentase Pembentukan Kalus

Pengamatan terhadap persentase pembentukan kalus pada berbagai konsentrasi 2,4-D dan BAP menunjukkan bahwa eksplan batang krisan pada seluruh media perlakuan yang diinkubasi pada

kondisi terang maupun gelap menunjukkan persentase kalus yang terbentuk mencapai 100%. Menurut Pramono (2017), pembentukan kalus dapat diinduksi dengan cara mengatur pemberian ZPT dengan jenis dan konsentrasi yang tepat. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D yang lebih tinggi dan BAP yang lebih rendah pada media kultur mampu memicu pembentukan kalus. Hal ini dapat disebabkan oleh rendahnya kadar auksin endogen pada eksplan krisan sehingga memerlukan tambahan auksin eksogen (2,4-D) dengan konsentrasi yang tinggi.

Kadar sitokinin endogen pada eksplan krisan diduga cukup tinggi sehingga penambahan BAP dalam konsentrasi rendah cukup efektif untuk menginduksi kalus. Andaryani et al. (2022) menjelaskan bahwa pembentukan kalus memerlukan auksin dalam jumlah yang relatif tinggi. Kadar auksin yang tinggi akan meningkatkan aktivitas auksin dalam eksplan yang berperan dalam proliferasi sel untuk membentuk kalus serta menekan morfogenesis.

Morfologi Kalus (Tekstur, Warna, dan Respon Lain)

Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* berupa tekstur dan warna kalus menggambarkan penampilan visual kalus, sehingga dapat diketahui kalus dengan sel yang masih aktif melakukan pembelahan (meristematis) atau sel yang

telah mengalami kematian (nekrosis). Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda (H. Ali et al., 2018). Berdasarkan hasil pengamatan secara visual, tekstur kalus yang dihasilkan pada seluruh media perlakuan menunjukkan hasil yang seragam yakni kalus dengan tekstur kompak.

Penambahan variasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP dalam media perlakuan dengan kondisi pencahayaan yang berbeda berpengaruh secara signifikan terhadap warna dan respon lain dari kalus. Hasil pengamatan pada awal pertumbuhan kalus menunjukkan bahwa sebagian besar kalus yang terbentuk menghasilkan warna bening,

putih, dan hijau muda. Seiring dengan meningkatnya laju pertumbuhan pada kalus, terjadi perubahan warna yang didominasi oleh warna hijau tua, coklat muda, dan coklat tua.

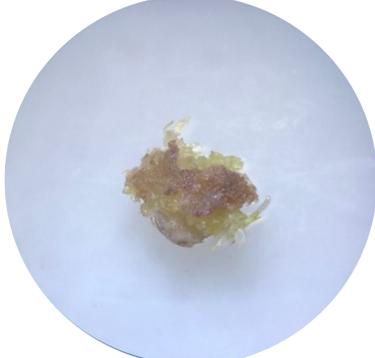
Seluruh kalus yang diinkubasi pada kondisi gelap menghasilkan warna yang lebih muda dan pucat dibandingkan pada kondisi terang. Respon lain yang ditunjukkan oleh kalus antara lain terbentuknya akar, tunas, dan daun dengan jumlah yang bervariasi. Pengamatan morfologi kalus eksplan batang krisan pada 15 HST dan 45 HST dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Pengamatan Morfologi Kalus Eksplan Batang Krisan pada Berbagai Kombinasi Konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP Serta Kondisi Pencahayaan yang Berbeda

Kondisi Pencahayaan	Media Perlakuan	Warna		Tekstur		Respon Lain	
		15 HST	45 HST	15 HST	45 HST	15 HST	45 HST
Terang	2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	B-HM-HT	CT-HT	Kompak	Kompak	Tumbuh bakal tunas	Tumbuh tunas dan daun (5)
	2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	HM-K	HM-HT-P	Kompak	Kompak	Tumbuh bakal tunas dan daun (3)	Tumbuh tunas dan daun (>5)
	4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	B	CM-CT-HM-HT-P	Kompak	Kompak	Tumbuh akar (1)	Tumbuh akar (>5)
	4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	B-HM-HT	CM-CT-HT	Kompak	Kompak	-	Tumbuh akar (2)
Gelap	2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	B-HM-P	CM-CT-HM	Kompak	Kompak	-	Tumbuh akar (>5)
	2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	HM-P	CT-HM-P	Kompak	Kompak	-	-
	4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	B-P	CM-HM	Kompak	Kompak	-	-
	4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	B-HM-P	CM-CT-HM-P	Kompak	Kompak	-	Tumbuh bakal tunas

Keterangan: B: Bening; CM: Coklat Muda; CT: Coklat Tua; K: Kuning; HM: Hijau Muda; HT: Hijau Tua; P: Putih

Tabel 2. Pengamatan Morfologi Kalus Berumur 45 HST (Mikroskop Stereo; P: 7x)

Media Perlakuan	Kondisi Terang	Kondisi Gelap
2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP		
2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP		
4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP		
4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP		

Tekstur Kalus

Berdasarkan hasil pengamatan secara visual, kalus yang terbentuk dari eksplan batang krisan pada seluruh media perlakuan

memiliki tekstur kompak (Tabel 2), ikatan antar selnya juga tampak kuat. Kalus yang kompak memiliki tekstur yang sulit untuk dipisahkan dan terlihat padat. Anniasari et

al. (2016) mengemukakan bahwa selama masa pertumbuhan, kalus mengalami lignifikasi sehingga terbentuk tekstur kalus yang keras, kompak, dan padat. Kalus dengan tekstur yang kompak umumnya memiliki ukuran sel yang kecil dengan sitoplasma yang padat, inti sel besar, dan mengandung banyak pati (karbohidrat). Kalus kompak tersusun atas sel-sel berbentuk nodular dengan struktur yang padat dan mengandung cukup banyak air. (Zhao et al., 2001).

Tekstur kalus yang kompak disebabkan oleh adanya perbedaan kemampuan jaringan tanaman dalam menyerap unsur hara dan ZPT dalam media inisiasi. Ardhani et al. (2024) menjelaskan bahwa kalus yang kompak dapat disebabkan karena sel-sel yang semula aktif membelah mengalami penurunan aktivitas proliferasi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kalus kompak diperoleh pada seluruh media perlakuan dengan konsentrasi 2,4-D yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi BAP (Tabel 2). Hal ini dapat disebabkan tingginya konsentrasi 2,4-D yang diberikan dapat memengaruhi peningkatan konsentrasi auksin endogen pada eksplan. Selain itu, adanya BAP dalam konsentrasi rendah juga dapat memengaruhi terbentuknya kalus kompak tersebut. Tekstur kalus yang kompak merupakan efek dari penambahan auksin dan sitokinin yang memengaruhi potensial air dalam sel. Hal ini

menyebabkan penyerapan air dari medium ke dalam sel meningkat sehingga sel menjadi lebih keras atau padat (Ariati et al., 2012).

Berbeda dengan perlakuan ZPT, pada penelitian ini perbedaan kondisi pencahayaan pada masa inkubasi tidak berpengaruh terhadap tekstur kalus. Seluruh kalus yang diinkubasi pada kondisi terang maupun gelap memiliki tekstur kompak (Tabel 1 dan 2).

Warna Kalus

Perbedaan warna yang dihasilkan dapat dipengaruhi oleh laju pertumbuhan kalus (Ariati et al., 2012). Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan, penambahan variasi konsentrasi 2,4-D dan BAP menghasilkan warna kalus yang beragam pada kondisi pencahayaan berbeda (Tabel 1). Pada awal masa pertumbuhan (15 HST), kalus yang terbentuk pada seluruh media perlakuan pada kondisi terang maupun gelap didominasi warna bening dan putih. Hal ini sejalan dengan pernyataan Ardhani et al. (2024) bahwa proses induksi kalus diawali dengan menggelembungnya atau melengkungnya eksplan, kemudian dilanjutkan dengan munculnya tonjolan-tonjolan berwarna putih pada bagian luka bekas potongan yang akan terus berkembang menjadi kalus. Kalus yang masih berwarna putih, bening, dan kuning diduga belum mengalami senesensi atau penuaan (Anniasari et al., 2016). Hal ini dapat

disebabkan oleh penambahan sitokinin BAP pada media perlakuan yang berperan dalam menghambat proses penuaan sel.

Pada Tabel 2 terlihat adanya perbedaan yang cukup signifikan antara warna kalus yang diinkubasi pada kondisi terang dan kondisi gelap. Pada akhir masa pengamatan (45 HST), kalus yang diinkubasi pada kondisi gelap menghasilkan warna yang lebih muda dan cenderung pucat dibandingkan dengan kalus pada kondisi terang. Kalus pada kondisi terang didominasi warna hijau tua dan coklat tua, sedangkan kalus pada kondisi gelap cenderung menghasilkan warna hijau muda dan coklat muda. Jung et al. (2021) menjelaskan bahwa eksplan yang dikulturkan pada kondisi terang mengalami perkembangan klorofil karena adanya rangsangan cahaya dan dimulainya proses fotosintesis.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa perlakuan 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (kondisi terang) dan 4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP (kondisi gelap) menghasilkan warna putih pada kalus yang terbentuk (Tabel 1). Jung et al. (2021) menyatakan bahwa kalus yang berwarna putih perlahan akan tumbuh dan membentuk butir-butir klorofil akibat adanya paparan cahaya sehingga kalus menjadi berwarna hijau. Warna kalus juga mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus yang dihasilkan maka

kandungan klorofilnya semakin besar (Jung et al., 2021). Andaryani et al. (2022) menjelaskan bahwa warna putih kehijauan yang dihasilkan kalus disebabkan oleh adanya interaksi antara 2,4-D (auksin) dan BAP (sitokinin) serta faktor lingkungan seperti paparan cahaya yang berperan penting dalam pembentukan klorofil pada kalus. Hönig et al. (2018) menambahkan bahwa sitokinin berperan dalam membentuk warna putih kehijauan pada kalus. Sitokinin berfungsi dalam memperlambat proses senescensi (penuaan) sel-sel kalus dengan menghambat perombakan butir-butir klorofil dan protein dalam sel.

Hasil pengamatan menunjukkan pula bahwa terjadi perubahan warna pada sebagian permukaan kalus yakni dari warna hijau tua hingga membentuk warna coklat muda ataupun coklat tua (Tabel 2). Hal ini terjadi seiring dengan meningkatnya laju pertumbuhan pada kalus. Didukung oleh pernyataan Rani et al. (2021) bahwa sel-sel muda yang sehat menunjukkan warna kuning bening, namun akan berubah menjadi kecokelatan seiring dengan bertambahnya laju pertumbuhan dan umur kalus yang semakin tua. Tilley et al. (2023) mengemukakan bahwa pencokelatan jaringan (*browning*) disebabkan oleh senyawa fenolik yang teroksidasi melalui aktivitas enzim polifenol oksidase. Salah satu penyebab utama *browning* dalam kultur *in vitro* adalah luka akibat pemotongan

jaringan pada eksplan. Luka tersebut akan meningkatkan aktivitas *Phenilalanin Amonia Liase* (PAL) dan merangsang sintesis senyawa fenolik.

Respon Lain Kalus

Pengamatan terhadap berbagai respon lain yang timbul pada kalus dengan perlakuan pencahayaan yang berbeda menunjukkan hasil yang beragam seperti munculnya akar, daun, serta tunas dengan jumlah yang bervariasi (Tabel 3 dan 4). Sesuai dengan pernyataan Yu et al. (2017) bahwa kalus kompak berpotensi mengalami organogenesis, misalnya membentuk akar atau tunas. Pada penelitian ini, kemunculan akar dalam jumlah yang cukup banyak (>5) terjadi pada beberapa perlakuan diantaranya perlakuan 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP (kondisi terang); 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (kondisi terang); dan 2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (kondisi gelap). Banyaknya akar yang tumbuh pada kalus tersebut dapat disebabkan oleh penambahan 2,4-D dalam konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan BAP. Ma et al. (2022) menyatakan apabila konsentrasi auksin yang ditambahkan lebih tinggi maka akan tumbuh banyak akar pada kalus.

Kalus yang terbentuk pada penelitian ini menunjukkan adanya pembentukan tunas pada beberapa perlakuan dengan kondisi pencahayaan yang berbeda. Tunas terbentuk pada perlakuan 2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP dan 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP dengan

kondisi terang, serta 4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP pada kondisi gelap. Karjadi & Buchory (2008) menyatakan bahwa pembentukan tunas, akar, ataupun keduanya secara bersamaan akan terjadi apabila terdapat auksin dan sitokinin dalam nisbah tertentu. Nisbah auksin dan sitokinin yang rendah, cenderung akan mendorong pertumbuhan tunas dan daun. Sebaliknya, apabila nisbah auksin dan sitokinin tinggi maka akan menumbuhkan akar. Nisbah auksin dan sitokinin yang seimbang akan mendukung pertumbuhan tunas, daun, ataupun akar dalam jumlah tertentu.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pembentukan organ meliputi akar, daun, dan tunas pada kalus terjadi secara optimal pada kondisi terang (Tabel 2). Cahaya berperan penting dalam mengatur proses morfogenesis kalus. Bajwa et al. (2023) menjelaskan bahwa cahaya putih dapat merangsang pembentukan kalus dan organogenesis tanaman secara *in vitro*. Vidican et al. (2024) menuturkan bahwa pengaruh cahaya yang dibutuhkan dalam kultur tergantung dari kualitas cahaya dan intensitas penyinaran. Kualitas cahaya tersebut akan memengaruhi arah diferensiasi jaringan.

Berat Kering, dan Ukuran Kalus

Berat kering tanaman dipandang sebagai manifestasi dari segala proses dan peristiwa yang terjadi selama masa pertumbuhan tanaman. Rata-rata berat

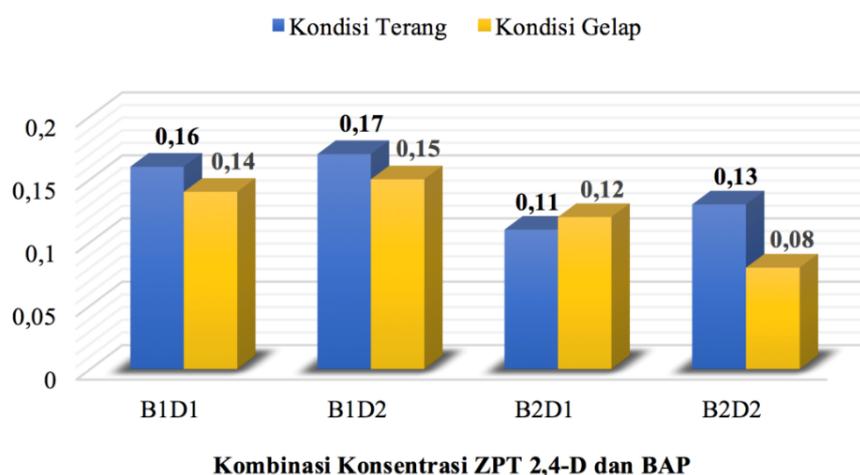
kering kalus eksplan batang krisan yang diinkubasi selama 45 HST pada kondisi terang dan kondisi gelap dapat dilihat pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan bahwa berat kering kalus tertinggi yang diinkubasi pada kondisi terang maupun gelap diperoleh pada perlakuan yang sama yaitu 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP, berturut-turut sebesar 0,17 gram dan 0,15 gram. Pada kondisi terang, berat kering kalus terendah yakni sebesar 0,11 gram diperoleh pada perlakuan 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP. Sementara itu, berat kering kalus terendah pada kondisi gelap yang hanya mencapai 0,08 gram diperoleh pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP.

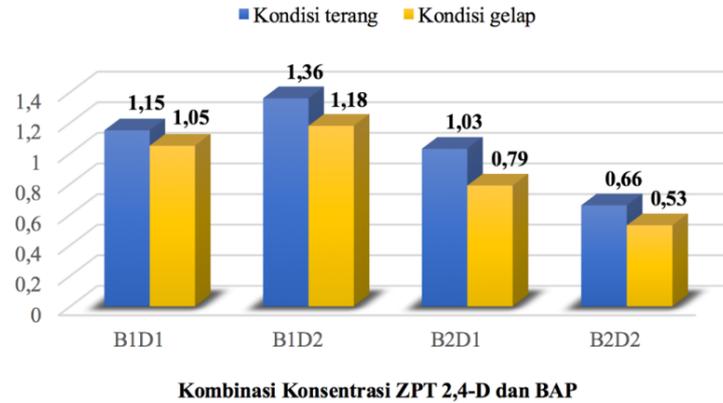
Menurut Vidican et al. (2024), ZPT 2,4-D diduga memengaruhi metabolisme protein yang terjadi pada saat proses transkripsi molekul RNA. Hal tersebut menyebabkan peningkatan aktivitas dan

berat kering kalus pada masing-masing perlakuan. Kenaikan sintesis protein juga menyebabkan bertambahnya sumber tenaga untuk pertumbuhan kalus. Andaryani et al. (2022) mengemukakan bahwa penggunaan 2,4-D dapat memacu pertumbuhan kalus. Hal ini ditunjukkan dengan terjadinya penambahan ukuran dan berat kering kalus yang tidak dapat kembali (*irreversible*).

Konsentrasi ZPT yang seimbang ataupun konsentrasi auksin yang lebih tinggi dibandingkan sitokinin mampu meningkatkan laju induksi kalus. Sitokinin merupakan suatu zat yang berperan dalam menentukan arah terjadinya diferensiasi sel dan volume pertambahan bobot segar kalus bersama dengan auksin. Keefektifan sitokinin sangat ditentukan oleh dosis yang digunakan, umur, dan bagian tanaman (Ratnasari. et al., 2016).



Gambar 1. Rata-Rata Berat Kering Kalus Eksplan Batang Krisan pada Berbagai Kombinasi Konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP serta Kondisi Pencahayaan yang Berbeda (Sumber, dokumen penulis). Keterangan : B₁D₁ (2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP), B₁D₂ (4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP), B₂D₁ (2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP), dan B₂D₂ (4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP).



Gambar 2. Rata-Rata Ukuran Kalus Eksplan Batang Krisan pada Berbagai Kombinasi Konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP serta Kondisi Pencahayaan yang Berbeda (Sumber, dokumen penulis). Keterangan : B₁D₁ (2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP), B₁D₂ (4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP), B₂D₁ (2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP), dan B₂D₂ (4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP).

Pola perkembangan tanaman ditentukan oleh kerjasama antara faktor genetik dan faktor endogen lainnya dengan lingkungan. Salah satu faktor lingkungan tersebut adalah cahaya. Pengaruh cahaya terhadap perkembangan tumbuhan antara lain melalui kemampuannya dalam mengubah konsentrasi atau keseimbangan fitohormon di dalam jaringan tumbuhan (Liu & Li, 2024).

Kombinasi ZPT 2,4-D dan BAP pada berbagai konsentrasi memiliki pengaruh yang beragam terhadap ukuran kalus yang dihasilkan. Hasil pengamatan terhadap ukuran kalus eksplan batang krisan yang diinkubasi selama 45 HST pada kondisi terang dan kondisi gelap disajikan pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa kalus yang diinkubasi pada kondisi terang memiliki rata-rata ukuran yang lebih besar dibandingkan pada kondisi gelap. Rata-rata

ukuran kalus tertinggi pada kondisi terang dan gelap berturut-turut sebesar 1,36 cm dan 1,18 cm yang diperoleh pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP. Sementara itu, rata-rata ukuran kalus terendah yang diinkubasi pada kondisi terang dan kondisi gelap berturut-turut sebesar 0,66 cm dan 0,53 cm diperoleh pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP.

Kombinasi kedua konsentrasi ZPT tersebut merupakan keseimbangan yang optimal antara 2,4-D (auksin) dengan BA (sitokinin) dalam memacu pembelahan sel. Pertumbuhan kalus terbaik akan diperoleh pada saat tercapainya keseimbangan antara masing-masing konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diaplikasikan (Jader & Obaid, 2023; Syahid & Hernani, 2001). Ali et al. (2022) dan Sindhu (2015) menambahkan bahwa penggunaan 2,4-D (auksin) yang dikombinasikan dengan TDZ (sitokinin) dengan daya aktif tinggi menyebabkan

kandungan zat pengatur tumbuh di dalam jaringan tanaman (endogen) akan meningkat. Peningkatan tersebut menyebabkan jaringan tanaman mengalami stress dan memicu terjadinya pembelahan sel tanaman secara terus menerus, sehingga ukuran kalus akan bertambah besar.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa rata-rata berat kering, serta ukuran kalus terbesar diperoleh pada kondisi inkubasi terang. Hal ini membuktikan bahwa pertumbuhan tanaman secara *in vitro* tidak selalu terhambat oleh adanya cahaya, sebaliknya cahaya justru dibutuhkan untuk hasil pertumbuhan yang optimal. Cristian et al. (2021) dan Fan et al. (2022) menjelaskan bahwa dalam sebagian besar kultur *in vitro*, sel akan mampu melakukan pembelahan dalam kondisi terang dengan adanya auksin eksternal dalam media. Meskipun cahaya dapat merusak auksin, namun hasil uji kontras menunjukkan perlakuan terang dapat menghasilkan waktu muncul kalus tercepat.

Dalam penelitian ini karakterisasi kalus asal eksplan batang planlet krisan terbatas pada karakter morfologi. Oleh karena itu, perluasan parameter perlu dilakukan antara lain karakterisasi kalus berdasarkan ultrastruktur menggunakan SEM, selain dapat pula mengarah pada pemanfaatan kalus yang dihasilkan untuk produksi metabolit sekunder serta dapat pula

diregenerasi menjadi planlet dalam upaya perbanyak mikro.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP pada kondisi pencahayaan berbeda berpengaruh terhadap beberapa parameter pengamatan yang meliputi waktu muncul, persentase pembentukan kalus, berat kering, ukuran, warna, serta respon lain yang dihasilkan oleh kalus. Kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP merupakan konsentrasi optimum dalam menginduksi kalus krisan dari eksplan batang secara *in vitro* pada kondisi terang dengan waktu muncul tercepat yaitu 7 HST, memiliki tekstur kompak, warna kalus hijau tua dan coklat tua, ukuran 1,36 cm, serta berat kering tertinggi sebesar 0,17 gram. Kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP merupakan konsentrasi optimum dalam menginduksi kalus krisan secara *in vitro* pada kondisi gelap dengan waktu muncul tercepat yaitu 6 HST, memiliki tekstur kompak, warna kalus hijau muda dan coklat muda, ukuran 1,18 cm, serta berat kering tertinggi sebesar 0,15 gram.

DAFTAR PUSTAKA

Ali, H., Karsani, S. A., Othman, R., & Yaacob, J. S. (2018). Production of coloured callus in *Orthosiphon stamineus* Benth and antioxidant properties of the extracted pigments.

- Pigment & Resin Technology*, 47(3), 196–207. DOI: 10.1108/PRT-01-2017-0009.
- Ali, H. M., Khan, T., Khan, M. A., & Ullah, N. (2022). The multipotent thidiazuron: A mechanistic overview of its roles in callogenesis and other plant cultures in vitro. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(6), 2624–2640. DOI: <https://doi.org/10.1002/bab.2311>.
- Andaryani, S., Samanhudi, S., & Yunus, A. (2022). Effect of BAP and 2,4-D on callus induction of *Jatropha curcas* in vitro. *Cell Biology and Development*, 3(2), 56–65. DOI: 10.13057/cellbioldev/v030202.
- Anniasari, T. D., Putri, R. B. A., & Muliawati, E. S. (2016). Penggunaan BA dan NAA untuk Merangsang Pembentukan Tunas Lengkeng Dataran Rendah (*Dimocarpus longan*) Secara In Vitro. *Jurnal Bioteknologi*, 13(2), 43–53. DOI: 10.13057/biotek/c130201.
- Ardhani, D. N., Maharijaya, A., & Megayani Sri Rahayu. (2024). Callus formation response from immature male flower explant of plantain banana (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana* cv. Kepok) treated by 2,4-D and BAP. *Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy)*, 52(1), 101–109. DOI: 10.24831/jai.v52i1.49008.
- Ariati, S. N., Waeniati, Muslimin, & Suwastika, I. N. (2012). Induksi Kalus Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) Pada Media MS Dengan Penambahan 2,4-D, BAP Dan Air Kelapa. *Jurnal Natural Science Desember*, 1(1), 74.
- Astutik, M., Suhartanto, B., Umami, N., Suseno, N., & Haq, M. S. (2022). *Auxin and Cytokinin Effect on In vitro Callus Induction of Maize (Zea mays L.) Srikandi Putih BT - Proceedings of the 6th International Seminar of Animal Nutrition and Feed Science (ISANFS 2021)*. 1–5. DOI: 10.2991/absr.k.220401.001.
- Bajwa, M. N., Khanum, M., Zaman, G., Ullah, M. A., Farooq, U., Waqas, M., Ahmad, N., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2023). Effect of Wide-Spectrum Monochromatic Lights on Growth, Phytochemistry, Nutraceuticals, and Antioxidant Potential of In Vitro Callus Cultures of *Moringa oleifera*. *Molecules*, 28(3). DOI: 10.3390/molecules28031497.
- Bano, A. S., Khattak, A. M., Basit, A., Alam, M., Shah, S. T., Ahmad, N., Gilani, S. A. Q., Ullah, I., Anwar, S., & Mohamed, H. I. (2022). Callus Induction, Proliferation, Enhanced Secondary Metabolites Production and Antioxidants Activity of *Salvia moorcroftiana* L. as Influenced by Combinations of Auxin, Cytokinin and Melatonin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65, 1–16. DOI: 10.1590/1678-4324-2022210200.
- Cavallaro, V., Pellegrino, A., Muleo, R., & Forgione, I. (2022). Light and Plant Growth Regulators on In Vitro Proliferation. *Plants*, 11(7), 844. DOI: 10.3390/plants11070844.
- Cristian, F. B., Remalia, S. C., Sanda, R. B., Georgeta, S., & Oana, D. S. (2021). Effect of light quality on in vitro germination, seedling growth and photosynthetic pigments production in wheat (*Triticum aestivum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 20(7), 300–307. DOI: 10.5897/ajb2021.17329.
- D'nofrio, C., & Morini, S. (2002). Effects of light quality on induction and growth of MM106 apple callus cultures. *Advances in Horticultural Science*,

- 16(2), 47–52. <http://www.jstor.org/stable/42882192>
- Dutta Gupta, S., & Agarwal, A. (2017). Influence of LED Lighting on In Vitro Plant Regeneration and Associated Cellular Redox Balance. In S. Dutta Gupta (Ed.), *Light Emitting Diodes for Agriculture: Smart Lighting* (pp. 273–303). Springer Singapore. DOI: 10.1007/978-981-10-5807-3_12.
- Fan, C., Manivannan, A., & Wei, H. (2022). Light Quality-Mediated Influence of Morphogenesis in Micropropagated Horticultural Crops: A Comprehensive Overview. *BioMed Research International*, 2022(1), 4615079. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/4615079>.
- Guo, G., & Jeong, B. R. (2021). Explant, Medium, and Plant Growth Regulator (PGR) Affect Induction and Proliferation of Callus in *Abies koreana*. In *Forests* (Vol. 12, Issue 10). DOI: 10.3390/f12101388.
- Hayati, N. Q., Nurmalinda, N., & Marwoto, B. (2019). Inovasi Teknologi Tanaman Krisan yang Dibutuhkan Pelaku Usaha (Technology Innovation of Chrysanthemum Needed by Stakeholders). *Jurnal Hortikultura*, 28(1), 147. DOI: 10.21082/jhort.v28n1.2018.p147-162.
- Hönig, M., Plíhalová, L., Husičková, A., Nisler, J., & Doležal, K. (2018). Role of Cytokinins in Senescence, Antioxidant Defence and Photosynthesis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 12). DOI: 10.3390/ijms19124045.
- Jader, H. S., & Obaid, O. H. (2023). Effect different concentrations of growth regulators on callus induction from different explants of *Aloe vera* L. in vitro. *AIP Conference Proceedings*, 2776(1), 30006. DOI: 10.1063/5.0137255.
- Jung, W.-S., Chung, I.-M., Hwang, M. H., Kim, S.-H., Yu, C. Y., & Ghimire, B. K. (2021). Application of Light-Emitting Diodes for Improving the Nutritional Quality and Bioactive Compound Levels of Some Crops and Medicinal Plants. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 5). DOI: 10.3390/molecules26051477.
- Karami, O., de Jong, H., Somovilla, V. J., Acosta, B. V., Sugiarta, A. B., Wennekes, T., & Offringa, R. (2022). Structure-activity relationship of 2,4-D correlates auxin activity with the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *BioRxiv*. DOI: 10.1101/2022.08.17.504315.
- Karjadi, A., & Buchory, A. (2008). Sifat Inovasi Dan Aplikasi Teknologi Pengelolaan Terpadu Kebun Jeruk Sehat Dalam Pengembangan Agribisnis Jeruk Di Kabupaten Sambas, Kalimantan Barat. *Jurnal Hortikultura*, 18(4), 380–384.
- Khalifa, A. M., Eid, M. A., Gaafar, R. M., Saad-Allah, K. M., & Gad, D. (2023). Induction of bioactive constituents and antioxidant enzyme activities in *Achillea fragrantissima* (Forsk.) callus cultures using ZnO nanoparticles. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 59(6), 808–824. DOI: 10.1007/s11627-023-10388-8.
- Lai, C.-C., Pan, H., Zhang, J., Wang, Q., Que, Q.-X., Pan, R., Lai, Z.-X., & Lai, G.-T. (2022). Light Quality Modulates Growth, Triggers Differential Accumulation of Phenolic Compounds, and Changes the Total Antioxidant Capacity in the Red Callus of *Vitis davidii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(41), 13264–

13278. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c04620.
- Liu, H., & Li, J. (2024). Plant photobiology: From basic theoretical research to crop production improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*, 66(5), 847–848. DOI: <https://doi.org/10.1111/jipb.13672>.
- Ma, J., Li, Q., Zhang, L., Cai, S., Liu, Y., Lin, J., Huang, R., Yu, Y., Wen, M., & Xu, T. (2022). High auxin stimulates callus through SDG8-mediated histone H3K36 methylation in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(12), 2425–2437. DOI: <https://doi.org/10.1111/jipb.13387>.
- Mardiana, Y., Dwi Putriani, L., & Setyo Utomo, P. (2024). Pengaruh Pemilihan Eksplan Dan Varietas Terhadap Induksi Kalus Tanaman Tebu (*Saccharum Officinarum* L). *Jurnal Ilmiah Agrineca*, 24(1), 79–88. DOI: 10.36728/afp.v24i1.3106.
- Ozias-Akins, P., & Vasil, I. K. (1983). Callus induction and growth from the mature embryo of *Triticum aestivum* (Wheat). *Protoplasma*, 115(2), 104–113. DOI: 10.1007/BF01279802.
- Pratiwi, H. G., Wardana, R., & Jumiatun, J. (2024). Pengaruh Pemberian ZPT IAA Dan BAP Terhadap Pertumbuhan Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L.) Ungu Secara In Vitro: Effect of ZPT IAA and BAP Administration on Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Adornment in Vitro. *Jurnal Ilmiah Inovasi*, 24(1), 1–7. DOI: 10.25047/jii.v24i1.4092.
- Qiu, T., Li, S., Zhao, K., Jia, D., Chen, F., & Ding, L. (2023). Morphological Characteristics and Expression Patterns of CmCYC2c of Different Flower Shapes in *Chrysanthemum morifolium*. In *Plants* (Vol. 12, Issue 21, p. 3728). DOI: 10.3390/plants12213728.
- Rani, D., Kobtrakul, K., Luckanagul, J. A., Thaweeseest, W., Rojsitthisak, P., De-Eknamkul, W., & Vimolmangkang, S. (2021). Differential gene expression levels, chemical profiles, and biological activities of *Pueraria candollei* var. *mirifica* callus cultures at different growth stages. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 147(1), 61–72. DOI: 10.1007/s11240-021-02105-3.
- Rashid, R. K., & Neamah, S. I. (2023). 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 6-Benzyladenine Stimulate of Indication and Biomass Accumulation in a *Phaseolus Vulgaris* Callus Culture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1252(1). DOI: 10.1088/1755-1315/1252/1/012105.
- Ratnasari., B. D., Suminar, E., Nuraini, A., & Ismail, A. (2016). Pengujian efektivitas berbagai jenis dan konsentrasi sitokinin terhadap multiplikasi tunas mikro pisang (*Musa paradisiaca* L.) secara In Vitro. *Kultivasi*, 15(2), 74–80. DOI: 10.24198/kultivasi.v15i2.11870.
- Ruvalcaba-Ruíz, D; Rojas-Bravo, D., Valencia-Botín, A. J. (2010). Tropical and Subtropical Agroecosystems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 139–143.
- Sari, N., Suwarsi, E., & Sumadi. (2014). Optimasi Jenis dan Konsentrasi ZPT dalam Induksi Kalus Embriogenik dan Regenerasi menjadi Planlet pada *Carica pubescens* (Lenne & K.Koch). *Biosaintifika*, 6(1), 51–59.
- Sindhu, S. S. (2015). Ornamental Horticulture. *Ornamental Horticulture*, 0, 41–48. DOI: 10.59317/9789390083329.
- Song, W., Song, Y., Liu, X., Zhang, X., Xin, R., Duan, S., Guan, S., & Sun, X.

- (2023). Improvement of Culture Conditions and Plant Growth Regulators for In Vitro Callus Induction and Plant Regeneration in *Paeonia lactiflora* Pall. *Plants*, 12(23), 3968. DOI: 10.3390/plants12233968.
- Syahid, S. F., & Hernani, H. (2001). Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Pembentukan Dan Pertumbuhan Serta Kandungan Sinensetin Dalam Kalus Pada Tanaman Kumis Kucing (*Orlhosiphon Arislatus*). *Industrial Crops Research Journal*, 7(4), 99–103. DOI: 10.21082/littri.v7n4.2001.99-103.
- Tilley, A., McHenry, M. P., McHenry, J. A., Solah, V., & Bayliss, K. (2023). Enzymatic browning: The role of substrates in polyphenol oxidase mediated browning. *Current Research in Food Science*, 7, 100623. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100623>.
- Ubudiyah, I. W. A., & Nurhidayati, T. (2013). Respon Kalus Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L .) pada Kondisi Cekaman Salinitas (NaCl) secara In Vitro. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 2(2), 138–143.
- Venkateshwarlu, M. (2022). In Vitro Culture Techniques from Cotyledon Explants of *Celastrus Paiculatus* (Wild) a Medicinal Important Plant. *International Journal of Current Research and Review*, 14(03), 60–62. DOI: 10.31782/ijcrr.2022.14311.
- Vidican, T. I., Cărbunar, M. M., Lazăr, A. N., Borza, I. M., Popoviciu, G. A., Ienciu, A. I., Cărbunar, M. L., & Vidican, O. M. (2024). The influence exerted by LEDs and fluorescent tubes, of different colorson regenerative processes and morphogenesis of *Rebutia heliosa* in vitro cultures. *Journal of Central European Agriculture*, 25(2), 502–516. DOI: 10.5513/JCEA01/25.2.4336.
- Wang, F., Zhang, F.-J., Chen, F.-D., Fang, W.-M., & Teng, N.-J. (2014). Identification of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium*) Self-Incompatibility. *The Scientific World Journal*, 2014(1), 625658. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/625658>.
- Yu, J., Liu, W., Liu, J., Qin, P., & Xu, L. (2017). Auxin control of root organogenesis from callus in tissue culture. *Frontiers in Plant Science*, 8(August), 1–4. DOI: 10.3389/fpls.2017.01385.
- Zhai, N., & Xu, L. (2021). Pluripotency acquisition in the middle cell layer of callus is required for organ regeneration. *Nature Plants*, 7(11), 1453–1460. DOI: 10.1038/s41477-021-01015-8.
- Zhao, J., Zhu, W.-H., Hu, Q., & He, X.-W. (2001). Enhanced indole alkaloid production in suspension compact callus clusters of *Catharanthus roseus*: impacts of plant growth regulators and sucrose. *Plant Growth Regulation*, 33(1), 33–41. DOI: 10.1023/A:1010732308175.
- Zuzarte, M., Salgueiro, L., & Canhoto, J. (2024). Plant Tissue Culture: Industrial Relevance and Future Directions. In J. Steingroewer (Ed.), *Plants as Factories for Bioproduction: Recent Developments and Applications* (pp. 1–15). Springer International Publishing. DOI: 10.1007/10_2024_254.