

Pengaruh Penambahan Berbagai Konsentrasi NAA (*Napthalene Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) terhadap Induksi Kalus Daun Sirsak (*Annona muricata*) secara *In Vitro*

The Effect of Different Concentration of NAA (Napthalene Acetic Acid) and BAP (Benzyl Amino Purine) on Soursop Leaves Callus Induction (Annona muricata L) In Vitro

Rani Fitriana Puteri*, Evie Ratnasari, Isnawati

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

*e-mail: rhanieputeri17@gmail.com

ABSTRAK

Tanaman sirsak (*Annona muricata*) mengandung senyawa kimia *acetogenins* yang sangat bermanfaat bagi pengobatan. Produksi metabolit sekunder *acetogenins* melalui kultur *in vitro* merupakan pilihan yang mempunyai harapan dibandingkan dengan produksi tanaman utuh, karena senyawa-senyawa metabolit sekunder dalam tanaman dapat ditingkatkan dan sistem produksi dapat diatur sehingga kualitas dan produksinya lebih konsisten untuk memenuhi kebutuhan pasar. Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan pertumbuhan kalus, waktu induksi tercepat serta konsentrasi NAA dan BAP yang tepat untuk menghasilkan biomassa dan viabilitas kalus paling optimal dari daun sirsak. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 5 perlakuan dan setiap perlakuan memiliki 5 ulangan sehingga terdapat 25 unit eksperimen. Parameter yang diamati adalah kecepatan waktu induksi, viabilitas kalus yang terdiri atas biomassa, serta tekstur kalus. Waktu induksi dan tekstur kalus diamati secara visual dan dianalisis secara deskriptif, sedangkan biomassa kalus dianalisis dengan menggunakan ANAVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji BNT, hasil analisis menunjukkan bahwa penambahan berbagai konsentrasi NAA (*Napthalene Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) secara *in vitro* berpengaruh secara signifikan terhadap kecepatan waktu induksi dan viabilitas kalus daun tanaman sirsak. Pemberian konsentrasi yang paling optimal untuk menghasilkan kecepatan waktu induksi dan viabilitas kalus daun sirsak adalah penambahan NAA dengan konsentrasi 3 mg/l dan BAP dengan konsentrasi 1 mg/l menghasilkan biomassa kalus sebesar 0,551 mg dan menghasilkan waktu induksi tercepat, yaitu 7 hari.

Kata kunci: *Annona muricata*; kultur jaringan; metabolit sekunder; waktu induksi; biomassa dan viabilitas kalus; *Napthalene Acetic Acid*; *Benzyl Amino Purine*; kultur *in vitro*

ABSTRACT

Soursop (Annona muricata) contains chemical compounds acetogenins very beneficial for treatment. Production of secondary metabolites through in vitro culture acetogenins is an option because enhance the compounds of secondary metabolites in plant production and production system can be arrange the quality and more consistent production to market needs. This research aimed to determine the callus growth, the fastest time of induction and optimum concentration of NAA and BAP to produce biomass and optimal callus viability of soursop leaves. This research used completely randomized design with 5 treatments and 5 replicates of each treatment, hence there were 25 experimental units. Parameters measured were the speed of the induction time, the viability of callus consisted of biomass and texture of the callus. Induction time and the texture of the callus was observed and analyzed descriptively while the callus biomass were analyzed using one - way ANOVA followed by LSD test. The results of the analysis showed that the addition of various concentrations of NAA (Napthalene Acetic Acid) and BAP (Benzyl Amino Purine) are in vitro effect of the speed of time significant viability of callus induction and plant leaves soursop. The most optimal concentration to produce a fastest time callus induction and callus viability of soursop leaf is the addition of NAA (Napthalene Acetic Acid) at a concentration of 3 mg / l and BAP (Benzyl Amino Purine) at a concentration of 1 mg / l.

Key word: *Annona muricata*; tissue culture; secondary metabolites; induction time and biomass; viability callus; *Napthalene Acetic Acid*; *Benzyl Amino Purine*; *in vitro* culture

PENDAHULUAN

Tanaman sirsak (*Annona muricata*) merupakan tanaman obat yang berasal dari famili *Annonaceae*. Di Indonesia tanaman sirsak sering

dimanfaatkan sebagai tanaman obat karena mengandung banyak senyawa kimia seperti *acetogenins* yang sangat bermanfaat bagi pengobatan. Produksi metabolit sekunder

acetogenins melalui kultur *in vitro* merupakan pilihan yang mempunyai harapan dibandingkan dengan produksi tanaman utuh (Kurv dan Constabel, 1991). Hal ini disebabkan teknik kultur jaringan memiliki banyak keuntungan antara lain tidak tergantung pada faktor lingkungan, sistem produksinya dapat diatur sehingga kualitas dan produksinya lebih konsisten untuk memenuhi kebutuhan pasar serta dapat mengurangi penggunaan lahan (Sitinjak, 2000).

Keuntungan lainnya menggunakan kultur jaringan untuk pertumbuhan kalus daun sirsak untuk mendapatkan metabolit sekundernya adalah menghemat waktu, tenaga, dapat diproduksi dalam jumlah yang cukup banyak dengan kondisi yang terkontrol dan dapat diproduksi sesuai dengan kebutuhan (Suryowinoto, 1996). Kultur jaringan dapat digunakan untuk memproduksi atau meningkatkan senyawa-senyawa metabolit sekunder dalam tanaman dibandingkan produksi senyawa yang sama secara alami. Daya multiplikasi tanaman pada kultur jaringan dapat ditingkatkan dengan menambahkan zat pengatur tumbuh (ZPT) dari golongan auksin (NAA) sitokinin (BAP) pada komposisi media yang digunakan tergantung dengan jenis tanaman yang akan diperbanyak. Murashige (1974) menyatakan bahwa BAP (Benzyl Amino Purine) merupakan sitokinin yang paling efektif dibandingkan dengan sitokinin lainnya. Menurut Salisbury dan Ross (1992) NAA lebih efektif dari IAA karena NAA tidak dapat dirusak oleh IAA oksidase atau enzim lainnya, sehingga bertahan lebih lama. NAA juga lebih stabil terhadap oksidase dan cahaya (Nurzaman, 2005). Menurut Evans *et al.* (2003) dalam Hayati *et al.* (2010) induksi kalus dipengaruhi oleh rasio auksin dan sitokinin yang seimbang, sehingga diperlukan kombinasi yang tepat agar dapat menginduksi pembentukan kalus yang optimal.

Konsentrasi optimum BAP pada penelitian kultur jaringan sirsak oleh Alzate *et al.* (2002) yang mengkultur bagian apikal dari tanaman sirsak dengan menggunakan media MS dengan penambahan kombinasi hormon BAP dan GA₃. Dari percobaan tersebut didapatkan hasil terbaik dari konsentrasi BAP 1 ppm dan GA₃ 0,5 ppm. Hasil penelitian Amin *et al.* (2002) yang mengkultur nodus tanaman sirsak dengan menambahkan kombinasi hormon NAA dan IBA. Hasil terbaik ditunjukkan dari konsentrasi IBA 0,2 mg/l dan NAA 0,5 mg/l

Berdasarkan penelitian di atas penulis mencoba untuk mengkombinasikan hormon NAA dan BAP untuk mengetahui pertumbuhan kalus

dari eksplan daun sirsak yang menghasilkan kecepatan waktu induksi dan viabilitas kalus yang paling optimal.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2013 s.d Februari 2014, di Laboratorium Kultur Jaringan UPTD Balai Pembibitan dan Pemuliaan Tanaman Dinas Pertanian Kota Surabaya.

Bahan yang diperlukan meliputi bahan tanaman yang berupa daun sirsak (*Annona muricata*) muda dan bahan kimia yang meliputi hara MS, zat pengatur tumbuh auksin (NAA) dan sitokinin (BAP), akuades steril, alkohol 96% dan 70%, larutan tween 5% dan 10%, antiseptik, sabun cair, KOH 1M dan HCl. Adapun alat-alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas, autoklaf, dan *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF).

Prosedur penelitian meliputi persiapan, sterilisasi alat dan bahan, pembuatan media MS, inokulasi eksplan dan pengamatan. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 pengulangan sehingga jumlah total unit eksperimen sebanyak 25 kali, tiap unit atau botol diisi dengan 2 buah eksplan. Perlakuan tersebut meliputi : A = Media MS dengan penambahan NAA 0 mg/l dan BAP 4 mg/l; B = Media MS dengan penambahan NAA 1 mg/l dan BAP 3 mg/l; C = Media MS dengan penambahan NAA 2 mg/l dan BAP 2 mg/l; D = Media MS dengan penambahan NAA 3 mg/l dan BAP 1 mg/l; dan E = Media MS dengan penambahan NAA 4 mg/l dan BAP 0 mg/l

Parameter pertumbuhan kalus yang diamati dan diukur adalah kecepatan waktu induksi kalus, biomassa kalus, dan penampakan kalus. Kecepatan waktu induksi kalus kecepatan induksi kalus diamati setiap hari selama 40 hari dihitung satu hari setelah penanaman sampai tumbuhnya kalus untuk pertama kalinya yang ditandai dengan munculnya tonjolan-tonjolan kecil berwarna putih pada bagian eksplan yang mengalami perlakuan. Biomassa kalus dihitung dengan menggunakan timbangan analitik, dengan cara dengan mengeluarkan kalus dari botol dan menimbang massanya pada hari ke-40 setelah inokulasi. Penampakan kalus ditinjau dari tekstur yang dihasilkan selama masa inkubasi. Penampakan kalus dapat diamati secara langsung.

Analisis data biomassa kalus dilakukan dengan menggunakan uji *One Way ANOVA* dengan taraf 5% dan terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji BNT dengan taraf 5% dan data kecepatan waktu induksi dilakukan secara

deskriptif dengan mengamati tumbuhnya kalus dihitung satu hari setelah inokulasi.

HASIL

Penelitian tentang induksi kalus daun sirsak dengan penambahan berbagai konsentrasi NAA dan BAP pada media MS secara *in vitro* menunjukkan bahwa dengan penambahan NAA dan BAP memberikan pengaruh terhadap kecepatan induksi dan biomassa daun sirsak. Menurut George dan Paul (2008) kalus dapat diinisiasi secara *in vitro*.

Penelitian tersebut dilakukan dengan menambahkan kombinasi hormon yang berbeda pada setiap perlakuannya. Kombinasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan adalah *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) dan 6-Benzyl Amino Purine (BAP) dengan 5 macam kombinasi konsentrasi dan 5 kali pengulangan sehingga terdapat 25 unit eksperimen.

Perhitungan kecepatan waktu induksi kalus dimulai dari satu hari setelah inokulasi sampai terbentuknya kalus pertama kali. Pengamatan dilakukan hingga akhir penelitian, yaitu 40 hari setelah inokulasi.

Tabel 1. Rerata kecepatan induksi kalus dari eksplan daun sirsak dengan penambahan berbagai konsentrasi *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) dan 6-Benzyl Amino Purine (BAP) pada media MS secara *in vitro*

Perlakuan Ulangan	Kecepatan Waktu Induksi				
	A (Hari)	B (Hari)	C (Hari)	D (Hari)	E (Hari)
1	12	10	8	7	10
2	15	10	10	6	10
3	14	12	11	8	10
4	13	10	8	8	12
5	13	10	8	7	12
RERATA	13	10	8	7	11

Keterangan : A = media MS dengan penambahan kombinasi NAA 0 mg/l + BAP 4 mg/l, B = media MS dengan penambahan kombinasi NAA 1 mg/l + BAP 3 mg/l, C = media MS dengan penambahan kombinasi NAA 2 mg/l + BAP 2 mg/l, D = media MS dengan penambahan kombinasi NAA 3 mg/l + BAP 1 mg/l, E = media MS dengan penambahan kombinasi NAA 4 mg/l + BAP 0 mg/l

Kecepatan waktu induksi terbaik ditunjukkan perlakuan D dengan kombinasi hormon NAA 3 mg/l dan BAP 1 mg/l dengan rerata kecepatan waktu induksi kalus terjadi pada hari ke-7. Rerata kecepatan waktu induksi semakin menurun, yaitu pada perlakuan C dengan kombinasi hormon NAA 2 mg/l dan BAP

2 mg/l dengan rerata kecepatan induksi kalus terjadi pada hari ke-8, perlakuan B dengan kombinasi hormon NAA 1 mg/l dan BAP 3 mg/l dengan rerata kecepatan induksi kalus terjadi pada hari ke-10, perlakuan E dengan kombinasi hormon NAA 4 mg/l dan BAP 0, mg/l dengan rerata kecepatan induksi kalus terjadi pada hari ke-11, perlakuan A dengan kombinasi hormon NAA 0 mg/l dan BAP 4 mg/l memiliki rerata kecepatan induksi kalus terlama yaitu terjadi pada hari ke-13 setelah inokulasi eksplan (Tabel 1).

Biomassa kalus eksplan daun sirsak yang terbentuk diamati secara kuantitatif yaitu dengan cara menimbang kalus yang dihasilkan oleh eksplan daun sirsak (*Annona muricata*) yang berumur 40 hari setelah waktu inokulasi eksplan.

Penambahan berbagai konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP menghasilkan biomassa yang berbeda pada tiap perlakuan. Pada perlakuan D mempunyai nilai rerata biomassa kalus paling besar, yaitu sebesar 0,551 gram, diikuti oleh perlakuan B (kombinasi NAA 1 mg/l dan BAP 3 mg/l) sebesar 0,410 gram, perlakuan A (kombinasi NAA 0 mg/l dan BAP 4 mg/l), sebesar 0,386 gram, perlakuan E (kombinasi NAA 4 mg/l dan BAP 0 mg/l) sebesar 0,293 gram dan paling rendah pada rerata perlakuan C (kombinasi NAA 2 mg/l dan BAP 2mg/l) yaitu sebesar 0,271 gram (Gambar 1).

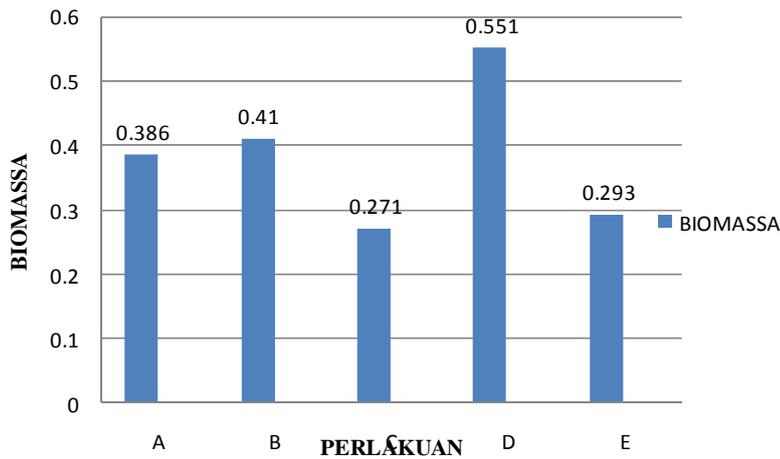
Rerata biomassa kalus eksplan daun sirsak yang diperoleh dari setiap perlakuan diuji dengan ANAVA satu arah diketahui nilai probabilitasnya sebesar $0,002 < 0,005$, nilai F hitung $> F$ tabel sebesar $6,039 > 2,87$ dengan demikian pemberian zat pengatur tumbuh NAA dan BAP berpengaruh signifikan terhadap biomassa kalus daun tanaman sirsak pada media MS secara *in vitro*.

Analisis Beda Nyata Terkecil pengaruh kombinasi penambahan zat pengatur tumbuh NAA dan BAP pada media MS terhadap pertumbuhan, biomassa kalus daun sirsak yaitu perlakuan A (kombinasi NAA 0 mg/l dan BAP 4 mg/l), B (kombinasi NAA 1 mg/l dan BAP 3 mg/l), C (kombinasi NAA 2 mg/l dan BAP 2mg/l) dan E memiliki notasi yang sama sehingga ketiga perlakuan tersebut tidak berbeda nyata, namun berbeda nyata dengan perlakuan D (kombinasi NAA 3 mg/l dan BAP 1 mg/l). Berdasarkan hasil analisis dapat diketahui bahwa perlakuan D menghasilkan biomassa kalus daun sirsak yang paling optimal.

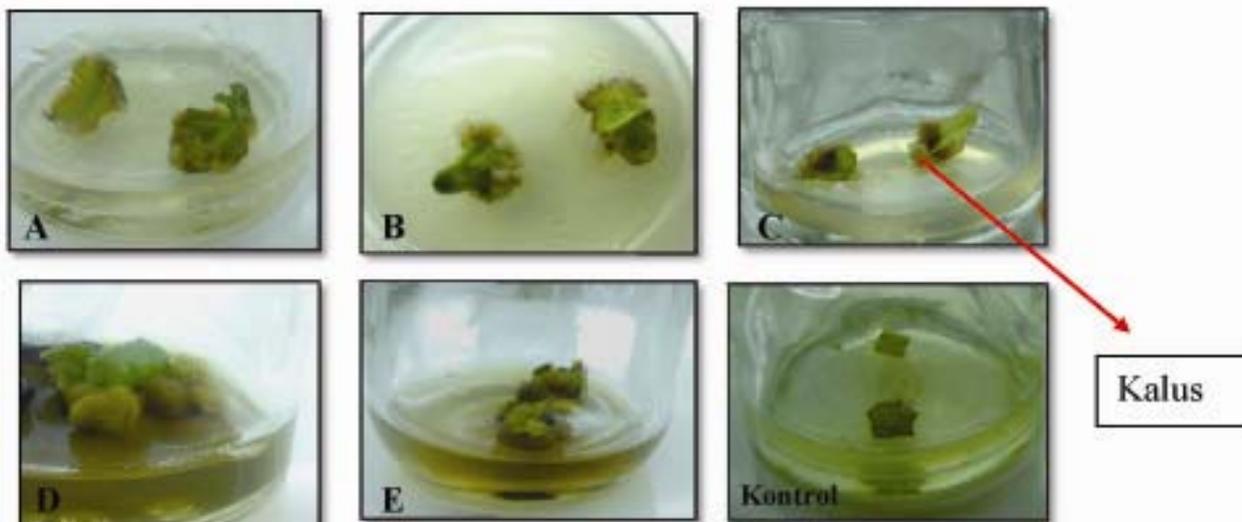
Tekstur kalus yang dihasilkan dari eksplan daun sirsak pada perlakuan A,B,C,D dan E adalah kompak dapat dilihat pada Gambar 2. Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang

dipergunakan untuk menilai pertumbuhan suatu kalus. Kalus yang baik untuk digunakan sebagai bahan penghasil metabolit sekunder yaitu memiliki tekstur kompak (*non friable*). Tekstur kalus yang kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak. Kalus pada perlakuan A, B, C, D dan E berwarna

putih kuning. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Dengan penambahan zat pengatur tumbuh terutama sitokinin dan stimulus cahaya (Tsuero, 1998).



Gambar 1. Rerata biomassa kalus eksplan daun sirsak (*Annona muricata l*) dengan penambahan NAA (*Napthalene Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) pada media MS secara *in vitro*



Gambar 2. Kalus eksplan daun sirsak; A = media MS dengan penambahan kombinasi NAA 0 mg/l + BAP 4 mg/l, B = media MS dengan penambahan kombinasi NAA 1 mg/l + BAP 3 mg/l, C = media MS dengan penambahan kombinasi NAA 2 mg/l + BAP 2 mg/l, D = media MS dengan penambahan kombinasi NAA 3 mg/l + BAP 1 mg/l, E = media MS dengan penambahan kombinasi NAA 4 mg/l + BAP 0 mg/l, F = media MS tanpa penambahan NAA dan BAP

PEMBAHASAN

Berdasarkan lima perlakuan dalam penelitian ini, dapat dilihat kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP pada masing-masing perlakuan memiliki pengaruh yang berbeda terhadap eksplan daun sirsak sehingga kalus dapat terbentuk. Pada perlakuan D (kombinasi NAA 3 mg/l dan BAP 1 mg/l) mampu menginduksi kalus lebih cepat dibandingkan dengan empat perlakuan lainnya hal ini disebabkan karena penambahan kombinasi hormon NAA dan BAP secara eksogen pada media MS merangsang pembentukan kalus. Pemberian auksin dan sitokinin yang tepat berpengaruh terhadap pembentukan kalus dan membuktikan bahwa sel-sel eksplan daun sirsak merespon ZPT. Proses induksi kalus ini diawali dengan mengembangnya atau melengkungnya eksplan daun kemudian dilanjutkan dengan munculnya tonjolan-tonjolan berwarna putih pada bagian luka bekas potongan yang akan terus berkembang menjadi kalus. Kalus merupakan proliferasi massa jaringan yang belum terdiferensiasi, massa jaringan ini terbentuk akibat adanya luka atau bekas potongan pada eksplan sehingga sel-sel yang kontak dengan media akan menjadi meristematis (Katuuk, 1989). Mengembang atau melengkungnya eksplan ini dapat terjadi akibat penambahan hormon NAA yang merupakan hormon auksin menginduksi pembentangan sel dengan mengendurkan dinding sel akibat penurunan pH, pH rendah dapat mengaktifkan beberapa enzim perusak dinding sel (selulosa). Enzim tersebut diduga memutuskan ikatan pada polisakarida dinding sehingga menyebabkan dinding elastis dan mudah merenggang (Salisbury dan Ross 1995). Selain itu NAA sebagai auksin berperan untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan orogonogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus (Rohmah, 2013). Selanjutnya sitokinin BAP berfungsi dalam pembelahan sel dan proliferasi kalus. sitokinin terutama berperan dalam hal pembentukan benang gelendong metafase (Wattimena *et al*, 1992) sitokinin juga berperan untuk menunda penuaan dengan jalan mempertahankan membran protoplas dan mencegah oksidasi asam lemak tak jenuh pada membran yang dapat merusak membran.

Kecepatan induksi kalus makin berkurang pada perlakuan C (kombinasi NAA 2 mg/l dan BAP 2 mg/l), B (kombinasi NAA 1 mg/l dan BAP 3 mg/l), E (kombinasi NAA 4 mg/l dan BAP 0 mg/l) dan perlakuan A (kombinasi NAA 0 mg/l dan BAP 4 mg/l). Hal ini dikarenakan pada masing-masing eksplan daun sirsak memiliki sifat kompeten yang berbeda dan pertumbuhan pada daun sirsak kurang optimal karena tidak adanya

keseimbangan dari kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP. Pada perlakuan A (kombinasi NAA 0 mg/l dan BAP 4 mg/l) merupakan kecepatan induksi dengan waktu terlama dikarenakan konsentrasi BAP yang diberikan telah mencapai dan melewati titik yang optimum sehingga menyebabkan kecepatan induksinya menurun. Kadar ZPT yang lebih tinggi dari titik optimum menyebabkan induksi dan pertumbuhan kalus menjadi lebih lama (Anggraeni, 2009).

Pada parameter biomassa kalus pertumbuhan yang berbeda pada setiap perlakuan. Pada gambar 1. dapat diketahui bahwa pada perlakuan D (kombinasi NAA 3 mg/l dan BAP 1 mg/l) memiliki rerata biomassa kalus terbaik, yaitu sebesar 0,551 gram. Pada perlakuan C (kombinasi NAA 2 mg/l dan BAP 2mg/l) menunjukkan respon pertumbuhan biomassa kalus paling lambat, yaitu memiliki rerata biomassa sebesar 0,271 gram. Pada perlakuan A (kombinasi NAA 0 mg/l dan BAP 4 mg/l) memiliki rerata biomassa sebesar 0,386 gram, perlakuan B (kombinasi NAA 1 mg/l dan BAP 3 mg/l) memiliki rerata biomassa sebesar 0,410 gram dan pada perlakuan E (kombinasi NAA 4 mg/l dan BAP 0 mg/l) memiliki rerata sebesar 0,293 gram. Biomassa kalus terbaik dihasilkan oleh perlakuan D dengan penambahan NAA 3 mg/l dan BAP 1 mg/l hal ini sesuai dengan teori yang ada bahwa konsentrasi yang di butuhkan untuk menghasilkan kalus pada kultur jaringan adalah perbandingan konsentrasi NAA sebagai auksin harus lebih tinggi dibandingkan dengan BAP atau sitokinin. Penambahan hormon NAA yang merupakan hormon auksin menginduksi pembentangan sel dengan mengendurkan dinding sel akibat penurunan pH, pH rendah dapat mengaktifkan beberapa enzim perusak dinding sel (selulosa). Enzim tersebut diduga memutuskan ikatan pada polisakarida dinding sehingga menyebabkan dinding elastis dan mudah merenggang (Salisbury dan Ross 1995).

Berdasarkan uji parametrik anava satu arah didapatkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh yang nyata diantara perlakuan terhadap biomassa kalus daun sirsak. Perbedaan tersebut menunjukkan, bahwa masing-masing perlakuan memiliki pengaruh yang berbeda terhadap eksplan yang ditanam pada media MS yang dimodifikasi dengan pemberian konsentrasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP yang berbeda dan terdapat sifat determinasi yang berbeda dari setiap sel eksplan. Pengaruh tersebut terlihat pada biomassa kalus yang ditimbang dari masing-masing perlakuan.

Warna kalus yang hijau tergantung pada eksplan yang digunakan. Kalus yang berwarna

hijau merupakan kalus yang di dalam sel-selnya terkandung klorofil. Kalus pada perlakuan A, B, C, D dan E berwarna putih kuning. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi.

SIMPULAN

Dari penelitian Pengaruh Penambahan Berbagai Konsentrasi NAA Dan BAP Terhadap Pertumbuhan Kalus Daun Sirsak (*Annona muricata* L) Secara *In Vitro* didapatkan kesimpulan sebagai berikut: Pemberian berbagai kombinasi hormon NAA dan BAP berpengaruh terhadap kecepatan dan viabilitas kalus daun sirsak (*Annona muricata* L) pada media MS secara *in vitro*. Konsentrasi tecepat untuk menginduksi kalus daun sirsak (*Annona muricata* L) pada media MS secara *in vitro* adalah konsentrasi NAA 3 mg/l dan BAP 1 mg/l. Konsentrasi yang menghasilkan biomassa kalus yang optimal adalah konsentrasi yang menghasilkan waktu induksi tercepat dan biomassa kalus terbesar ditunjukkan oleh perlakuan D dengan kombinasi hormon NAA 3 mg/l dan BAP 1 mg/l menghasilkan biomassa kalus sebesar 0,551 mg dan menghasilkan waktu induksi tercepat yaitu 7 hari.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Laboratorium Kultur Jaringan UPTD Balai Pembibitan dan Pemuliaan Tanaman Dinas Pertanian Kota Surabaya atas penyediaan tempat penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin M, Nahar K dan Firej A, 2002. *Micropropagation Of Anonna squamosa Lin Using Exsplan (Shoot and Node) of Field Grown Mature Plants*. Web publication <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2002/394-397.pdf> 394. Diunduh pada tanggal 30 November 2013
- Anggraeni F, 2009. *Penambahan Zat Pengatur Tumbuh a-naphthalrneacetic acid (NAA) dan 6-benzylamino purine (BAP) Untuk Induksi Dan Pertumbuhan Eksplan Batang Ubi Kayu (manihol escuenta crantz) Secara in-vitro*. Skripsi. Tidak dipublikasikan. Universitas Negeri Surabaya.
- Ariningsih I dan Solichatun, 2003. *Pertumbuhan Kalus dan Produksi Antrakuinon Mengkudu (Morinda citrifolia L.) pada Media Murashige-Skoog (MS) dengan Penambahan Ion Ca²⁺ dan Cu²⁺*.
- Fatmawati A, Nurhayati T dan Nurul J, 2006. *Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh Iaa Dan Bap Pada Kultur Jaringan Tembakau Nicotiana Tabacum L. Var. Prancak 95*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya
- George E, dan Sherrington P, 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture. England: Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Inggris: Exegetics Limited
- Hayati K, Surya NY, Setiari N, 2010. *Induksi Kalus dari Hipokotil Alfalfa (Mediagio sativa L.) secara in vitro dengan Penambahan Benzyl Amino Purin (BAP) dan a-Naphtalene Acetic Acid (NAA)* Web publication http://eprints.undip.ac.id/33511/1/2_YulitaNintya_siap.pdf. Diunduh pada 20 Maret 2014
- Rohmah DI. 2014. *Pengaruh Berbagai Konsentrasi 2,4 D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) Terhadap Induksi dan Viabilitas Kalus Daun dan Nodus Tanaman Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) pada Medium New Phalaenopsis (NP) secara in vitro*. Skripsi. Tidak dipublikasikan. Universitas Negeri Surabaya.
- Katuuk JRP, 1989. *Tekhnik Kultur Jaringan dalam Mikropropagasi Tanaman*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Proyek Pengembangan Lembaga Pendidikan Tenaga Kependidikan.
- Kurz, GW dan Constabel F, 1991. *Produksi dan isolasi metabolit sekunder*. Dalam L. R. Wetter dan Constabel F. *Metode Kultur Jaringan Tanaman* (diterjemahkan oleh Mathilda B. Widiyanto). Bandung: Penerbit ITB.
- Nurzaman Z, 2005. *Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh NAA Dan IBA Terhadap Pertumbuhan Stek Mini Pule Pandak (Rauwolfia Serpentina Benth.) Hasil Kultur In Vitro Pada Media Arang Sekam Dan Zeolit*. Bogor: ITB
- Salisbury F & C. Ross.1992. *Fisiologi Tumbuhan Jilid 1*. Bandung : ITB Press
- Santoso U dan Nursandi F, 2002. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: UMM Press.
- Sitinjak RR, 2000. *Pengaruh pemberian ekstrak Saccharomyces cereviceae Hansen terhadap kandungan gopipol pada kultur kalus Gossypium hirtusum L. Berita Biologi 5 (2): 131-132*
- Suryowinoto M, 1996. *Pemuliaan Tanaman secara In Vitro*. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM.
- Tsuro M, 1998. *Comparative 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 Prefectural University, Shimogamo-Hangi Sakyoku, Kyoto 606-8522 : Japan
- Wattimena GA, 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.