

KEMAMPUAN REGENERASI KALUS EMPAT KLON TEBU (*Saccharum officinarum* L.)

CALLUS REGENERATION OF FOUR SUGARCANE (*Saccharum officinarum* L.) CLONES

Riza Luth Fiah¹, Taryono², dan Toekidjo²

ABSTRACT

Sugarcane is one of the important agricultural commodities that have high economic value as raw material for sugar industry. One of the obstacle is large scale seed availability due to the limitation of planting material's area. Plant tissue culture is an alternative to overcome the problems. Callus culture and shoot regeneration are a contributing factor in plant tissue culture, but there is a problem in the long-term maintenance of callus which is the decreasing callus regeneration potential. This research used two stages, (1) callus induction with single factor experiment arranged in Completely Randomized Design, and (2) shoot regeneration using 2 factors experiment in Completely Randomized Design and 5 replications. The first factor is sugarcane clones (PS 862, PS 864, PS 881, and VMC 86-550), and the second factor is subculture frequencies which is transferred in every three weeks i.e. third, sixth, ninth, and twelfth week. The explant source used is an immature leaves roll sugarcane (3 – 4 month). Callus induction and subculture used MS medium + 1.5 mg/l 2,4-D, whereas shoot regeneration used MS medium + 2.0 mg/l IAA + 2.0 mg/l IBA + 2, 0 mg/l kinetin. Observed variables includes callus emerge, shoots regeneration rate and number of shoot. Statistical analysis using ANOVA showed significant difference in the rate of callus induction. PS 862 clones has the fastest callus emerge, shoots growth, and the largest number of shoots.

Keyword: sugarcane, callus, subculture, regeneration

INTISARI

Tebu merupakan salah satu komoditas penting pertanian karena memiliki nilai ekonomis tinggi sebagai bahan baku industri gula. Salah satu masalah yang dihadapi adalah pengadaan bibit tebu skala besar karena ketersediaan lahan sebagai kebun bibit tebu yang semakin terbatas. Budidaya jaringan tanaman menjadi salah satu alternatif untuk mengatasi masalah tersebut. Budidaya kalus dan regenerasi tanaman merupakan faktor pendukung dalam budidaya jaringan tanaman, namun terdapat permasalahan dalam penyimpanan kalus jangka panjang yaitu penurunan kemampuan regenerasi kalus setelah mengalami pindah tanam (*subculture*). Penelitian ini menggunakan dua tahap penelitian yaitu tahap (1) induksi kalus dengan Rancangan Acak Lengkap satu faktor yaitu klon tebu, dan (2) tahap regenerasi tunas dengan Rancangan Acak Lengkap 2 faktor perlakuan 5 ulangan. Faktor pertama yaitu 4 klon tebu (PS 862, PS 864, PS 881, VMC 86-550) dan faktor kedua yaitu frekuensi pindah tanam pada minggu ketiga, keenam, kesembilan, dan keduabelas. Eksplan yang digunakan adalah pucuk tebu yang berumur (3 – 4) bulan. Media yang digunakan pada tahap induksi kalus dan pindah tanam kalus

¹Alumni Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

adalah media MS + 1,5 mg/l 2,4-D, sedangkan regenerasi tunas dengan media MS + 2,0 mg/l IAA + 2,0 mg/l IBA + 2,0 mg/l kinetin. Pengamatan yang dilakukan pada tahap induksi kalus adalah kecepatan muncul kalus dan pada tahap regenerasi tunas adalah kecepatan tumbuh tunas dan jumlah tunas terbentuk. Analisis data secara statistik menggunakan uji ANOVA menunjukkan terdapat beda nyata pada perlakuan klon tebu untuk kecepatan muncul kalus. Kalus klon PS 862 memiliki kemampuan membentuk kalus paling cepat dan pada tahap regenerasi tunas, kalus klon PS 862 juga memiliki kemampuan membentuk tunas paling cepat serta jumlah tunas yang paling banyak.

Kata kunci: tebu, kalus, pindah tanam, regenerasi

PENDAHULUAN

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan salah satu komoditas pertanian yang mempunyai nilai ekonomis cukup tinggi sebagai bahan baku perindustrian gula (Irawan, 1995). Salah satu faktor produksi yang cukup penting adalah bibit varietas unggul karena bibit unggul merupakan faktor yang menentukan keberhasilan usaha perkebunan tebu. Pengadaan bibit dalam skala besar, waktu cepat, jenis yang seragam, dan bebas dari Organisme Pengganggu Tanaman (OPT) sangat sulit dipenuhi melalui teknologi perbanyakan tebu secara konvensional. Pilihan teknologi berupa budidaya *in vitro* untuk pengadaan bibit tebu yang unggul adalah alternatif untuk mengatasi keterbatasan tersebut karena faktor penggandaannya yang tinggi sehingga varietas unggul cepat diperbanyak, bibit lebih terjamin kesehatannya, membutuhkan ruang yang relatif kecil, bahan tanam dan pohon induk sedikit, dan eksplan dapat diproduksi secara cepat dan banyak (Mariska & Rahayu, 2011).

Budidaya kalus merupakan tahapan penting dalam budidaya jaringan tanaman karena kalus merupakan bahan penting untuk perbanyakan maupun rekayasa genetik (Rashid *et al.*, 2009). Kalus mempunyai kemampuan beregenerasi (Chengalrayan *et al.*, 2005) membentuk akar, tunas, dan embrio yang dapat membentuk tanaman dewasa lengkap (Farid, 2003). Namun demikian, seperti beberapa tanaman sereal dari suku Poaceae, kemampuan regenerasi kalus tebu dapat menurun setelah beberapa kali dipindah tanam. Penurunan kemampuan regenerasi dapat ditunjukkan dengan semakin menurunnya jumlah tunas yang dihasilkan (Pola *et al.*, 2009).

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan terdiri dari empat klon tebu, yaitu PS 862, PS 864, PS 881, dan VMC 86-550 dan dilakukan dalam dua tahap yaitu tahap induksi kalus menggunakan rancangan perlakuan faktor tunggal yang disusun Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan tahap regenerasi tunas menggunakan rancangan perlakuan faktorial dua faktor dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Dalam penelitian tahap kedua, faktor pertama adalah klon tebu dan faktor kedua yaitu frekuensi pindah tanam. Pengaruh frekuensi pindah tanam ditunjukkan dengan regenerasi tunas setiap tiga minggu sekali yaitu pada minggu ketiga, keenam, kesembilan, dan kedua belas.

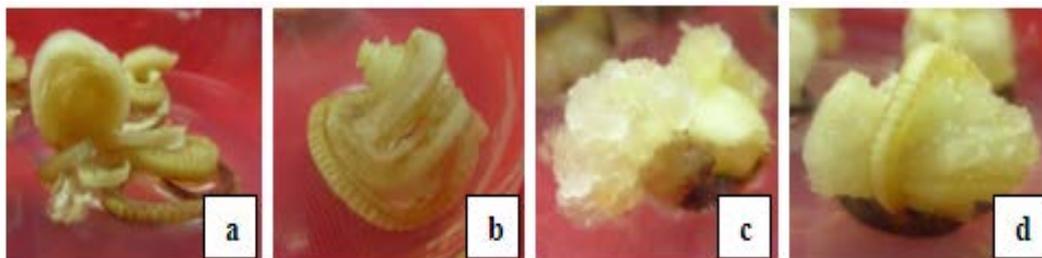
Penelitian diawali dengan pembuatan dan sterilisasi media tanam, persiapan dan sterilisasi eksplan, penanaman eksplan, pindah tanam kalus dan regenerasi tunas, dan pengakaran planlet. Media yang digunakan dalam tahap induksi kalus dan pindah tanam kalus adalah MS + 1, mg/l 2,4-D (Pola *et al.*, 2009), regenerasi tunas menggunakan MS + 2,0 mg/l IAA + 2,0 mg/l IBA + 2,0 mg/l kinetin (Seema *et al.*, 2011). Pengamatan yang dilakukan berupa pengamatan kualitatif (gambar) dan kuantitatif (data) baik pada tahap induksi kalus yaitu kecepatan muncul kalus maupun pada tahap regenerasi yaitu kecepatan tumbuh tunas dan jumlah tunas yang tumbuh.

Data kuantitatif yang diperoleh pada tahap induksi kalus berupa kecepatan muncul kalus dianalisis dengan Analisis Varian (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95% dan data kuantitatif pada tahap regenerasi tunas berupa kecepatan tumbuh tunas dan jumlah tunas yang tumbuh dianalisis dengan Analisis Varian (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95%. Jika terdapat beda nyata maka analisis dilanjutkan dengan analisis pemisahan rerata menggunakan DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) dengan tingkat kepercayaan 95%. Analisis menggunakan *software* SAS 9.1.3 (*Statistical Analysis System*) for *Windows*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

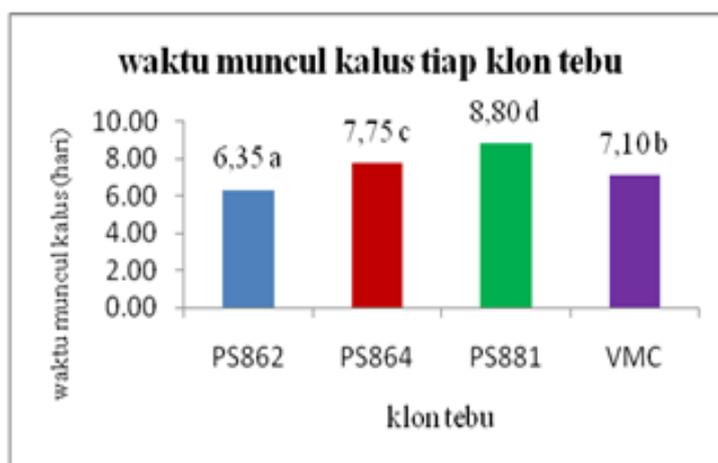
Induksi kalus merupakan tahapan penting dalam budidaya jaringan karena kalus merupakan sel yang terisolasi secara *in vitro* dan dirangsang untuk membentuk massa sel yang aktif membelah untuk jumlah yang tidak terbatas. Kalus dianggap sebagai tanggapan dari luka yang dialami jaringan maupun

organ tanaman. Tanggapan luka tersebut ditandai dengan pembelahan sel yang semakin meningkat hingga menjadi kumpulan massa sel yang belum terdeferensiasi (Liang, 2007).



Gambar 1. Tanggapan eksplan terhadap media tanam (a); kalus mulai muncul dari permukaan eksplan tebu (b); kalus tebu yang tumbuh semakin besar (c); dan kalus tebu yang siap dipindah ke media pindah tanam dan regenerasi tunas (d).

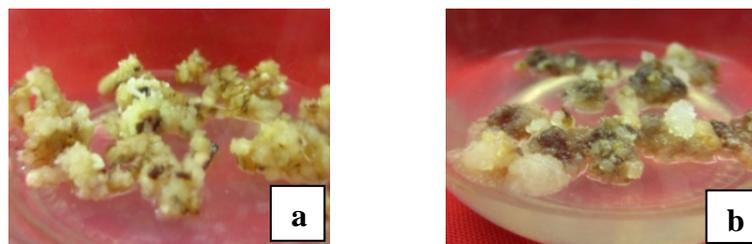
Eksplan tebu yang ditanam pada media induksi kalus (Gambar 1.a) akan memberikan tanggapan seperti bentuk eksplan tebu yang berubah menjadi spiral maupun lepas-lepas. Pada umumnya kalus yang terbentuk (Gambar 1.b) berawal dari bagian yang bersinggungan langsung dengan media tanamnya diawali dengan pembengkakan eksplan kemudian muncul kalus pada permukaan eksplan yang berbentuk bulat atau lempeng berwarna putih bening maupun kuning. Kalus yang tumbuh pada tiap permukaan eksplan semakin hari akan semakin bertambah besar (Gambar 1.c) dan (Gambar 1.d).



Gambar 2. Kecepatan muncul kalus klon tebu PS862, PS864, PS881, VMC 86-550 pada media induksi kalus MS + 1,5 mg/l 2,4-D dengan nilai KK = 9,087

Kecepatan muncul kalus merupakan peubah yang penting dalam tahap induksi kalus karena menunjukkan kemampuan setiap eksplan dari klon-klon yang diuji untuk membentuk kalus dalam jangka waktu tertentu. Kecepatan muncul kalus tiap klon tebu yang diuji menghasilkan angka yang berbeda-beda (Gambar 2). Ekplan klon PS862 membentuk kalus paling cepat yaitu kira-kira 6,35 hari setelah ditanam, sedangkan klon PS881 merupakan klon yang lama yaitu sekitar 8,80 hari.

Pembentukan kalus pada suatu eksplan dapat terjadi hingga 100% dari tiap bagian eksplan, namun jika terlalu lama tidak dipindahkan ke media baru maka kalus tersebut akan mengalami nekrosis dan kematian sehingga dibutuhkan pindah tanam kalus untuk meningkatkan pertumbuhan kalus (Srangsam & Kanchanapoom, 2003).

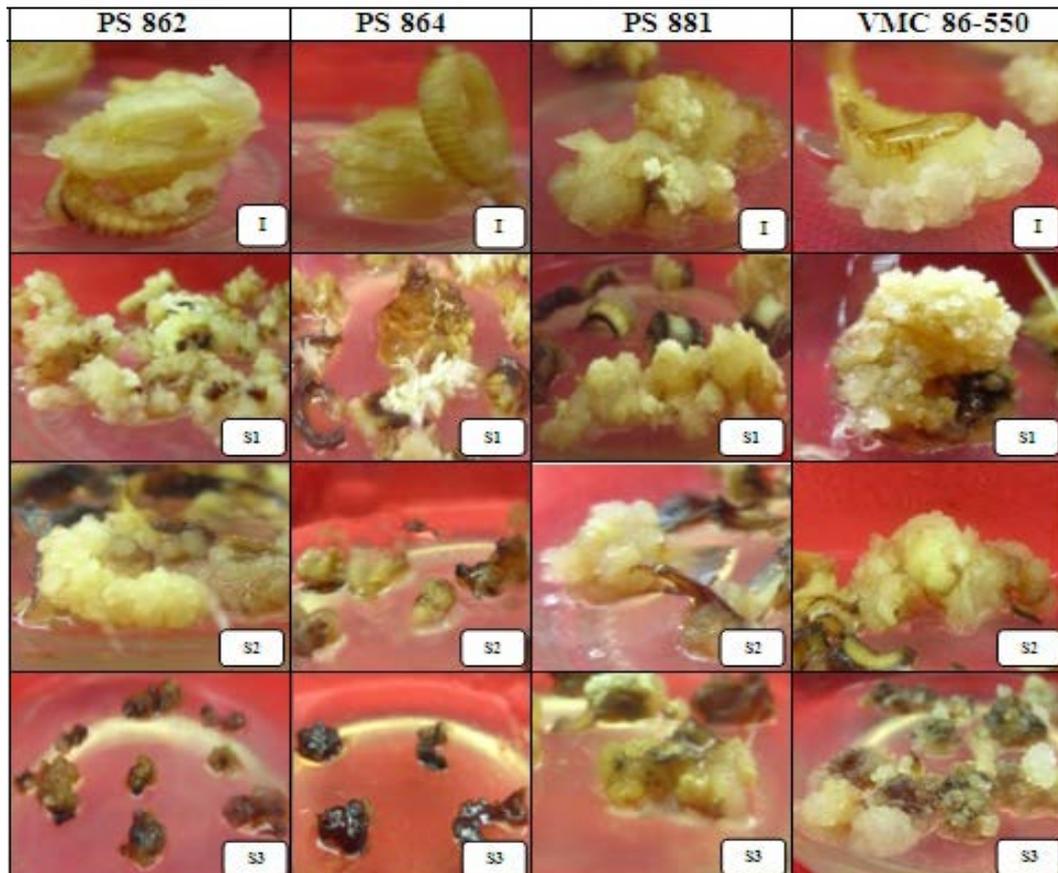


Gambar 3. Kalus tebu yang mengalami satu kali pindah tanam (umur 6 minggu) (a), kalus tebu yang telah mengalami tiga kali pindah tanam (12 minggu) (b)

Kalus segar yang berumur enam minggu atau telah mengalami pindah tanam satu kali (Gambar 3.a) memiliki ciri-ciri seperti bentuknya bulat/globular, warna kuning cerah hingga putih bening, dan ketika dipindahkan menggunakan pinset terasa teksturnya yang remah dan lepas-lepas, sedangkan pada kalus yang telah mengalami dua kali pindah tanam atau berumur dua belas minggu atau lebih sudah kehilangan kesegaran kalusnya seperti warna yang mulai menghitam dan teksturnya menjadi lunak dan kompak (Gambar 3.b).

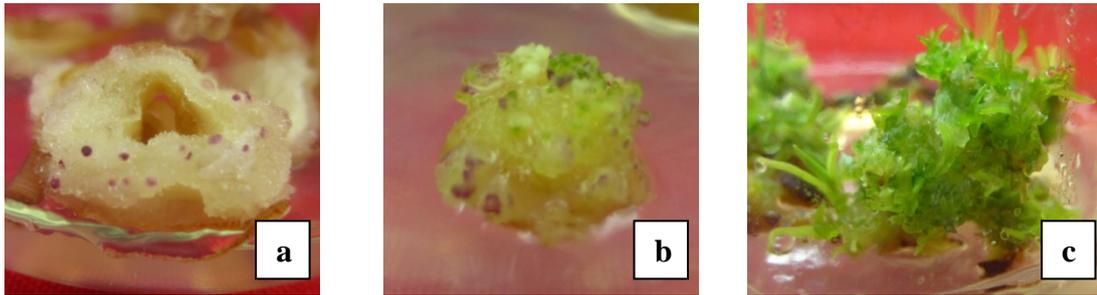
Perubahan bentuk kalus dan warna kalus dapat dilihat pada setiap perlakuan pindah tanam (Gambar 4). Pada tahap induksi kalus tebu terlihat bahwa kalus tebu klon PS 862, PS 864, dan VMC 86-550 memiliki sifat yang sama yaitu remah, bentuknya globular/bulat, dan warnanya putih kekuningan, berbeda dengan kalus tebu klon PS 881 yang bentuknya agak kompak, warnanya lebih putih pekat. Tekstur dari kalus tebu pada pindah tanam pertama (S1) hampir sama seperti tahap induksi kalus tetapi pada tahap ini sebagian kecil kalus tebu sudah menunjukkan perubahan tekstur menjadi lebih kompak atau

agak lunak/lembek. Pada pindah tanam yang kedua (S2), kalus sudah menunjukkan perubahan tekstur dan warnanya. Pada pindah tanam kalus yang ketiga (S3) hampir semua klon menunjukkan hasil bahwa kalus semua klon tebu yang diuji telah mengalami perubahan kualitas kalus dan tidak menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik.



Gambar 4. Kalus tebu klon PS 862, PS 864, PS 881, dan VMC 86-550 pada media MS+1,5 mg/l 2,4-D dimulai dari perlakuan I (induksi kalus tebu selama 3 minggu); S1 (pemeliharaan kalus setelah berumur 3 minggu di media induksi dengan cara pindah tanam selama 3 minggu); S2 (pemeliharaan kalus berumur 9 minggu dan telah mengalami 1 kali pindah tanam); dan S3 (pemeliharaan kalus berumur 12 minggu dan telah mengalami 2 kali pindah tanam)

Regenerasi tunas tebu bertujuan untuk menumbuhkembangkan tunas tebu yang berasal dari kalus. Regenerasi dilakukan dengan cara memindahkan kalus tebu dari media tanam kalus ke media regenerasi yang berisi kombinasi auksin dan sitokinin. Pada penelitian ini media regenerasi yang digunakan adalah MS + 2,0 mg/l IAA + 2,0 mg/l IBA + 2,0 mg/l kinetin.

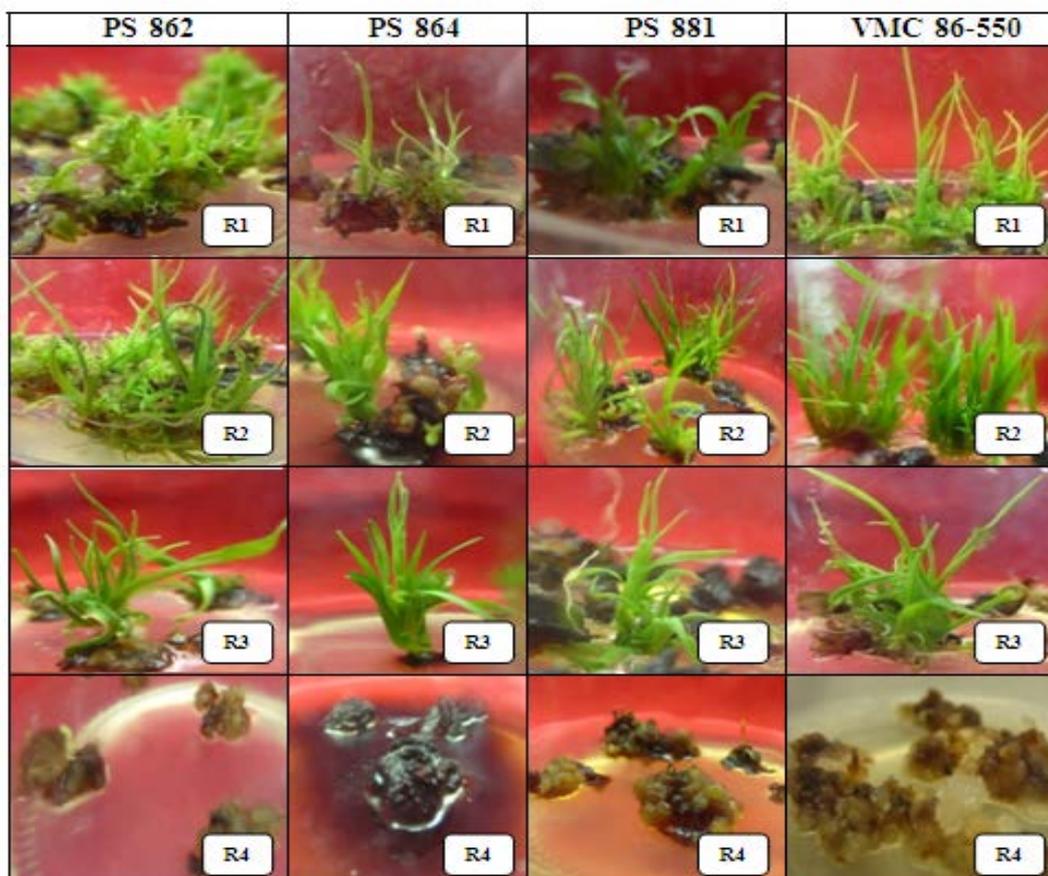


Gambar 5. Kalus menunjukkan tanggapan terhadap media regenerasi tunas dengan munculnya warna ungu pada kalus tebu (a); titik-titik ungu pada kalus tebu berubah menjadi titik hijau yang menandakan tumbuhnya tunas (b); dan titik-titik hijau mulai memanjang membentuk tunas tebu (c)

Tanggapan awal kalus setelah dipindahkan ke media regenerasi tunas pada setiap klon tebu yang diuji hampir sama yaitu menunjukkan titik-titik ungu pada permukaan kalus (Gambar 5.a) yang tersebar hampir merata di bagian permukaan atas kalus. Titik-titik ungu pada kalus yang serupa juga ditemukan pada kalus *Actinidia deliciosa* (Oliveira & Pais, 1992 dan Popielarska *et al.*, 2006). Menurut Popielarska *et al.*, (2006), titik-titik ungu tersebut mirip dengan kumpulan sel yang memiliki pigmen antosianin. Titik-titik ungu pada kalus selanjutnya akan berubah menjadi titik-titik hijau (Gambar 5.b) dan titik-titik hijau tersebut akan merata memenuhi permukaan kalus. Titik-titik hijau yang berawal dari titik-titik ungu akan lebih dulu memanjang dan membentuk tunas (Gambar 5.c) yang berwarna hijau. Menurut Lizawati (2012), warna hijau pada kalus adalah akibat pengaruh sitokinin dalam pembentukan klorofil.

Kemampuan regenerasi yang semakin menurun dapat terlihat pada jumlah tunas tebu yang dihasilkan di setiap perlakuan pindah tanam kalus tebu (Gambar 6). Regenerasi pertama yang dilakukan pada kalus empat klon tebu yang diuji menunjukkan hasil bahwa keempat klon tersebut mampu menghasilkan sejumlah tunas. Klon PS 864 menghasilkan jumlah tunas yang paling sedikit di antara klon PS 862, PS 881, dan VMC 86-550. Regenerasi kedua menghasilkan tunas yang lebih sedikit daripada regenerasi pertama kecuali pada kalus klon PS 862 karena setelah mengalami pindah tanam satu kali, pembelahan sel-sel kalus menjadi semakin banyak dan setiap bagian kalus mampu menghasilkan tunas sehingga jumlah tunas tebu pada regenerasi kedua lebih banyak daripada regenerasi pertama. Regenerasi ketiga terlihat jelas bahwa jumlah tunas yang dihasilkan jauh lebih sedikit karena sebagian besar

kalus yang diregenerasi sudah tidak mampu menumbuhkan tunas. Sebagian besar kalus mulai menghitam dan tidak dapat tumbuh menjadi tunas lagi. Regenerasi keempat merupakan regenerasi terakhir karena kalus yang diregenerasikan sudah tidak mampu menghasilkan tunas. Semua kalus berubah warna menjadi coklat kehitaman dan hitam yang menandakan bahwa kalus telah kehilangan kemampuan regenerasinya.



Gambar 6. Tunas tebu klon PS 862, PS 864, PS 881, dan VMC 86-550 pada media MS + 2,0 mg/l IAA + 2,0 mg/l IBA + 2,0 mg/l kinetin dimulai dari perlakuan R1 (regenerasi kalus yang telah diinduksi selama 3 minggu); R2 (regenerasi tunas berumur 6 minggu dan telah mengalami 1 kali pindah tanam); R3 (regenerasi tunas tebu yang berumur 9 minggu dan telah mengalami 2 kali pindah tanam); dan R4 (regenerasi tunas tebu yang berumur 12 minggu dan telah mengalami 3 kali pindah tanam)

Kecepatan tumbuh tunas menunjukkan kebutuhan waktu tumbuh dan berkembangnya tunas tebu yang diregenerasi dari kalus (Tabel 1). Klon tebu dan frekuensi pindah tanam mempengaruhi secara nyata terhadap waktu tumbuh tunas tebu yang diregenerasi yang ditunjukkan dengan terdapat beda nyata

antara perlakuan klon tebu dan frekuensi pindah tanam. Frekuensi pindah tanam kalus tebu mempengaruhi kecepatan tumbuhnya tunas tebu saat regenerasi tunas. Kemampuan regenerasi tunas tiap klon tebu berbeda-beda karena kepekaan kalus tiap klon tebu terhadap media yang digunakan juga berbeda. Klon yang membutuhkan waktu paling cepat dalam menumbuh kembangkan tunas adalah PS 862 pada frekuensi pindah tanam ke-0 atau waktu pemeraman kalus tiga minggu dengan waktu perkembangan tunas adalah 1,20 hari, sedangkan kalus yang mengalami perlakuan tiga kali pindah tanam atau berumur dua belas minggu tidak mampu menumbuh kembangkan tunas hingga hari ketigapuluh pengamatan.

Tabel 1. Kecepatan tumbuh tunas hasil regenerasi dari kalus klon tebu PS 862, PS 864, PS 881, dan VMC 86-550 pada media regenerasi tunas MS + 2,0 mg/l IAA + 2,0 mg/l IBA + 2,0 mg/l Kinetin (hari)

Perlakuan		Frekuensi Pindah Tanam Kalus Tebu				Rerata Klon
		0	1	2	3	
Klon Tebu	PS 862	1,20 a	3,60 b	6,00 c	30,00 f	10,20
	PS 864	7,20 c	15,00 d	24,60 ef	30,00 f	19,20
	PS 881	8,20 c	7,20 c	25,40 ef	30,00 f	17,70
	VMC 86-550	2,50 b	6,80 c	20,50 de	30,00 f	14,75
Rerata		4,78	8,15	19,13	30,00	(+)

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji *Duncan Multiple Range Test* dengan tingkat kepercayaan 95% dengan nilai KK = 11,347. (+) : ada interaksi.

Tabel 2. Jumlah tunas hasil regenerasi dari kalus klon tebu PS 862, PS 864, PS 881, dan VMC 86-550 pada media regenerasi tunas MS + 2,0 mg/l IAA + 2,0 mg/l IBA + 2,0 mg/l Kinetin

Perlakuan		Frekuensi Pindah Tanam Kalus Tebu				Rerata Klon
		0	1	2	3	
Klon Tebu	PS 862	44,00 ab	53,00 a	20,60 de	0,00 h	29,40
	PS 864	30,00 cd	8,40 f	5,40 f	0,00 h	10,95
	PS 881	35,20 bc	17,00 e	2,00 gh	0,00 h	13,55
	VMC 86-550	32,17 bc	16,20 e	2,00 g	0,00 h	12,59
Rerata		35,34	23,65	7,50	0,00	(+)

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak ada beda nyata berdasarkan uji *Duncan Multiple Range Test* dengan tingkat kepercayaan 95% dengan nilai KK = 13,229. (+) : ada interaksi.

Jumlah tunas yang dihasilkan dari regenerasi kalus tebu merupakan peubah yang penting karena dapat menunjukkan kemampuan kalus untuk membentuk tunas tebu (Tabel 2). Jumlah tunas yang dihasilkan pada tiap perlakuan klon tebu berbeda-beda karena kemampuan yang dimiliki klon tersebut untuk membentuk kalus juga berbeda. Kualitas kalus yang baik akan

menghasilkan jumlah tunas yang semakin banyak. Klon tebu dan frekuensi pindah tanam mempengaruhi secara nyata jumlah tunas tebu yang diregenerasi yang ditunjukkan dengan adanya beda nyata antara perlakuan klon tebu dan frekuensi pindah tanam. Klon yang mampu menghasilkan jumlah tunas paling banyak adalah PS 862 pada frekuensi pindah tanam ke-1 atau waktu pemeraman selama enam minggu, sedangkan kalus yang mengalami perlakuan tiga kali pindah tanam atau berumur dua belas minggu tidak mampu membentuk tunas hingga hari ketigapuluh pengamatan.

KESIMPULAN

1. Klon PS 862 memiliki kemampuan membentuk kalus paling cepat dibandingkan dengan klon PS 864, PS 881, dan VMC 86-550.
2. Terdapat interaksi antara klon dengan frekuensi pindah tanam pada waktu tumbuh kembang tunas dan jumlah tunas yang terbentuk.
3. Klon PS 862 memiliki kemampuan membentuk tunas yang paling cepat dan menghasilkan jumlah tunas paling banyak pada setiap perlakuan pindah tanam.
4. Pindah tanam sebanyak dua kali pada kalus yang berumur sembilan minggu telah menurunkan kemampuan regenerasi tunas pada klon PS 862, untuk klon PS 864, PS 881, dan VMC 86-550 kemampuan regenerasi tunas sudah menurun sejak pindah tanam satu kali pada kalus yang berumur enam minggu.
5. Tebu klon PS 862, PS 864, PS 881, dan VMC 86-550 kehilangan kemampuan regenerasinya setelah mengalami tiga kali pindah tanam atau kalus berumur lebih dari dua belas minggu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat terlaksana melalui Hibah Penelitian Fakultas Pertanian UGM tahun 2012. Ucapan terima kasih juga diberikan kepada Dr. Ir. Taryono, M.Sc. dan Ir. Toekidjo, M.P. selaku pembimbing skripsi serta Rani Agustina Wulandari, S.P., M.P., Ph.D. selaku penguji, keluarga (Bapak, Ibu, dan Adik), staf serta anggota Laboratorium Budidaya Jaringan Tanaman Fakultas Pertanian UGM, dan teman-teman atas doa, dukungan, dan bantuannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Baksha, R., R. Alam, M.Z. Karim, S.A. Mannan, B.P. Podder, dan A.B.M.M. Rahman. 2003. Effect of auxin, sucrose, and pH level on in vitro rooting of callus induced micro shoots of sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Journal of Biological Sciences* 3: 915 – 920.
- Chengalrayan, K., A. Abouzid, dan M. Gallo-Meagher. 2005. In vitro regeneration of plant from sugarcane seed derived callus. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*. 41: 477 – 482.
- Farid, M.B. 2003. Perbanyakan tebu (*Saccharum officinarum* L.) secara *in vitro* pada berbagai konsentrasi IBA dan BAP. *Jurnal Sains dan Teknologi* 3: 103 – 109.
- Irawan. 1995. Penyakit Pembuluh dan Usaha Pengendaliannya di Indonesia. Pertemuan Teknis Pusat Penelitian dan Pengembangan Gula Indonesia.
- Khan, S.J., M.A. Khan, H.K. Ahmad, R.D. Khan, dan Y. Zafar. 2004. Somaclonal variation in sugarcane through tissue culture and subsequent screening for salt tolerance. *Journal of Plant Science* 3: 330-334.
- Liang, O.P. 2007. Micropropagation and Callus Culture of *Phyllanthus niruri* L., *Phyllanthus urinaria* L., and *Phyllanthus myrtifolius* (Euphorbiaceae) with The Establishment of Cell Suspension Culture of *Phyllanthus niruri* L.. University Sains Malaysia. Thesis.
- Lizawati. 2012. Proliferasi kalus dan embriogenesis somatik jarak pagar (*Jatropha curcas* L.). *Jurnal Bioplantae* 1: 32 – 41.
- Mariska, I., dan S. Rahayu. 2011. Pengadaan Bibit Tebu melalui Kultur Jaringan. *Jurnal Libang Pertanian Edisi 6-12 Juli 2012 No.3413 Tahun XLI*.
- Mohatkar, L.C., A.N. Chaudhari, A. B. Deokar, dan B.S. Shah. 1993. Organogenesis in *Saccharum officinarum* L. variety 'Co740'. *Current Science* 64: 604 – 605.
- Pola, S., N.S. Mani., dan T. Ramana. 2009. Long-term maintenance of callus cultures from immature embryo of *Sorghum bicolor*. *World Journal of Agricultural Science* 5: 415 – 421.
- Popielarska, M., H. Slesak, dan G. Goralski. 2006. Histological and SEM studies on organogenesis in endosperm-derived callus of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv.Hayward). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48: 97 – 104.
- Rashid, H., S.A. Khan, M. Zia, M.F. Chaudhary, Z. Hanif, dan Z. Chaudary. 2009. Callus induction and regeneration in elite sugarcane cultivar HSF-240. *Pakistan Journal of Botany* 41: 1645 – 1649.
- Seema, N., F.C. Oad, I.A. Khan, S. Tunio, M.A.S.S Yasmin, A. Khatri, dan S. Bibi. 2011. Influence of phytohormone on the organogenesis of sugarcane. *Pakistan Journal of Botany* 43: 1531 – 1534.
- Srangsam, A., dan K. Kanchanapoom. 2003. Thidiazuron induced plant regeneration in callus culture of triploid banana (*Musa* sp.) 'Gros Michel' AAA Grup. *Journal Science and Technology* 25: 689 – 696.