

Induksi Kalus *Piper retrofractum* Vahl. dengan Variasi Eksplan dan Zat Pengatur Tumbuh

Asyroful Muna¹⁾, Suharyanto²⁾ Aries Bagus Sasongko²⁾

¹ Program Studi Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

²Departemen Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

Email: ariesbaguss@ugm.ac.id

APA Citation: Muna, Asyroful., Suharyanto., & Sasongko, A. B. (2022). Induksi Kalus *Piper retrofractum* Vahl. dengan Variasi Eksplan dan Zat Pengatur Tumbuh. Quagga: Jurnal Pendidikan dan Biologi, 14(1), 16-23. doi: 10.25134/quagga.v14i1.3796.

Received: 15-12-2020

Accepted: 27-11-2021

Published: 10-01-2022

Abstrak: Cabe Puyang merupakan tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi tanaman obat di Indonesia. Salah satu hambatan pengembangan tanaman ini adalah tingkat produktivitasnya yang rendah. Metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan produktivitas Cabe Puyang adalah kultur kalus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah kultur kalus merupakan metode yang efektif untuk perbanyakan Cabe Puyang. Eksplan daun dan batang ditumbuhkan pada medium Murashige dan Skoog (MS) dengan penambahan 0,5 mg/l 2,4-D dan 0,5 mg/l BA untuk mengetahui eksplan paling responsif. Eksplan tersebut ditumbuhkan pada medium MS dengan kombinasi 2,4-D:BA dan NAA:BA (0:0; 0,5:0,5; 0,5:1; dan 1:0,5) mg/l untuk optimasi medium induksi kalus. Kalus disubkultur ke medium dengan penambahan BA (0; 0,5; 1; 2; dan 3) mg/l untuk optimasi medium regenerasi tunas. Hasil penelitian menunjukkan eksplan batang lebih responsif dibandingkan daun. Kombinasi 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA dan 0,5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BA menunjukkan respon pembentukan kalus paling cepat, yaitu selama 9 hari. Belum terdapat tunas yang terbentuk pada tahap regenerasi, namun pada konsentrasi 1 mg/l BA kalus mulai menunjukkan tana regenerasi, seperti tekstur kalus friable dan warna menjadi kuning kehijauan.

Kata Kunci: 2,4-D; BA; Cabe Puyang; induksi kalus

Abstract: Javanese chili is a plant that has the potential to be developed into medicinal plants in Indonesia. One of the obstacles of the development of this plant is the low level of productivity. The method that can be used to increase the productivity of Long pepper is callus culture. This study aims to determine whether callus culture is an effective method for Long pepper propagation. Leaf dan stem explants were grown on Murashige dan Skoog (MS) medium with the addition of 0.5 mg / l 2,4-D dan 0.5 mg / l BA to determine the most responsive explants. The explants were grown on MS medium with a combination of 2,4-D: BA dan NAA: BA (0: 0; 0.5: 0.5; 0.5: 1; dan 1: 0.5) mg / l for optimization of callus induction medium. Callus was sub cultured to the medium with the addition of BA (0; 0.5; 1; 2; dan 3) mg / l for the optimization of the shoot regeneration medium. The results showed stem explants were more responsive than leaves. The combination of 0.5 mg / l 2,4-D + 0.5 mg / l BA dan 0.5 mg / l 2,4-D dan 1 mg / l BA showed the fastest response to callus formation, which was for 9 days. No shoots were formed at the regeneration stage, but at a concentration of 1 mg / l BA callus began to show signs of regeneration, such as a friable callus texture dan a greenish yellow color.

Keyword: *Piper retrofractum*; 2,4-D; BA; Cabe Puyang; callus induction

PENDAHULUAN

Saat ini gaya hidup *'back to nature'* menjadi tren di kalangan masyarakat, seperti pemanfaatan tanaman obat sebagai ramuan obat herbal. Hal itu dikarenakan tanaman obat bersifat aman, murah dan mudah didapat ([Mindarti dan Nurbaeti, 2015](#)).

Cabe Puyang (*Piper retrofractum* Vahl.) adalah tanaman obat asli Indonesia dari familia Piperaceae. Tanaman ini dapat tumbuh secara liar di daerah dengan tanah yang lembab dan berpasir seperti di dekat pantai atau tumbuh di hutan dengan ketinggian kurang dari 600 m dpl atau dibudidayakan di ladang ([Sudiarto, 1992](#)).

Cabe Puyang mulai banyak dikonsumsi dan diekspor ke berbagai negara karena memiliki banyak khasiat seperti, antiradang, afrodisiak, memperlancar peredaran darah, melonggarkan saluran pernapasan, dan anelgesik ([Winarto, 2003](#)). Secara ekonomis, tanaman ini memiliki harga jual yang cukup tinggi dan relatif stabil ([Anisah dan Hayati, 2017](#)). Akan tetapi, tingkat produktivitas tanaman ini masih rendah karena pembudidayaan secara intensif masih kurang (Direktorat Jendral Perkebunan, 2013 dalam [Nurhuda, et al., 2017](#)).

Peningkatan produktivitas Cabe Puyang dapat dilakukan dengan cara kultur *in vitro*, yaitu kultur kalus. Kultur *in vitro* merupakan teknik isolasi jaringan, organ, sel, dan protoplas dalam medium yang aseptik hingga menjadi tanaman yang utuh kembali (Gunawan, 1995 dalam [Nofrianinda, et al., 2017](#)). Selain itu, bibit tanaman yang dihasilkan umumnya lebih bebas penyakit, juga dapat memproduksi dengan jumlah banyak dalam waktu yang relatif singkat, dan seragam dengan induknya (Zulkarnain, 2009 dalam [Sitinjak, et al., 2015](#)).

Jenis medium yang banyak digunakan dalam kultur kalus dan regenerasi tanaman adalah Murashige dan Skoog's (MS), karena memiliki kandungan N dan P yang tinggi ([Trigiano dan Gray, 2011](#)). Penambahan auksin dan sitokinin dapat membantu mempercepat proses induksi kalus dan regenerasi tanaman. 2,4-D merupakan jenis auksin sintetik yang umum digunakan dalam kultur *in vitro* dan bersifat termostabil (Hendaryono dan Wijayanti, 1994 dalam [Fajroti, 2012](#); Hendaryono dan Wijayanti dalam [Indah dan Ermavitalini, 2013](#)). Sedangkan jenis sitokinin yang banyak digunakan adalah BA, yaitu jenis sitokinin

sintetik yang aktif dan tidak mudah terdegradasi oleh enzim dalam tanaman, sehingga memiliki daya rangsang yang lebih lama ([George dan Sherrington, 1984](#)).

Pada penelitian induksi kalus *P. retrofractum* konsentrasi paling optimum untuk menginduksi kalus adalah 0,5 mg/l 2,4-D dan 0,5 mg/l BA. Hasil tersebut ditunjukkan pada minggu ke-3 pertumbuhan kalus tampak signifikan ([Faramayuda et al., 2016](#)). Sedangkan pada penelitian [Junairiah et al. \(2018b\)](#) yang juga menggunakan eksplan daun *P. retrofractum*, perlakuan 0,5 mg/l NAA dan 0,5 mg/l BA menunjukkan respon paling cepat untuk menginduksi kalus, yaitu 11,5 hari.

Oleh karena itu, untuk memperoleh kalus terbaik, pada penelitian ini dilakukan seleksi jenis eksplan dan optimasi medium dengan kombinasi ZPT untuk induksi kalus dan regenerasi tunas.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Laboratorium Struktur Perkembangan Tumbuhan, Fakultas Biologi UGM. Bahan penelitian yang digunakan adalah batang dan daun *P. retrofractum* sebagai eksplan. Eksplan dicuci dengan sabun dan dibilas dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran pada permukaan eksplan. Eksplan direndam dalam fungisida (Amistar Top) selama ± 30 menit dan diletakkan dalam *shaker*.

Proses kultur dilakukan di dalam LAF dan setiap alat yang digunakan telah disterilkan terlebih dahulu. Eksplan disterilkan dengan alkohol 70% selama ± 30 detik dan 5,25% NaClO selama ± 3 menit (digojok). Selanjutnya dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali.

Batang dipotong dengan ukuran panjang $\pm 0,7-0,9$ cm, sedangkan daun dipotong dengan ukuran ± 1 cm² dan diberikan perlakuan pada bagian tengahnya. Eksplan tersebut diambil dengan pinset dan dilewatkan di atas api kemudian ditumbuhkan pada medium perlakuan dalam *petridish*. Medium yang digunakan untuk mengetahui perbedaan responsivitas eksplan adalah MS+0,5 mg/l 2,4-D+0,5 mg/l BA, sedangkan untuk optimasi medium terdiri dari 7 variasi kombinasi (Tabel 1). Kemudian diinkubasi selama 36 hari dan diamati waktu induksi, warna kalus, tekstur kalus, serta berat segar dan berat kering pada hari terakhir

pengamatan. Kalus yang diperoleh kemudian disubkultur pada medium perlakuan untuk regenerasi, yaitu 0; 0,5; 1; 2; dan 3 mg/l BA. Kemudian diamati waktu kemunculan tunas dan jumlah tunas yang muncul setelah 45 hari subkultur.

Tabel 1. Variasi kombinasi ZPT untuk optimasi medium induksi kalus

Kode	Konsentrasi (mg/l)		
	2,4-D	NAA	BA
M1	0	0	0
M2	0,5	0	0,5
M3	0,5	0	1
M4	1	0	0,5
M5	0	0,5	0,5
M6	0	0,5	1
M7	0	1	0,5

Pada penelitian ini juga dilakukan pembuatan preparat anatomi kalus dengan metode *embedding*. Sampel yang digunakan antara lain, eksplan batang yang belum diinduksi kalus (kontrol), eksplan *swelling*, kalus, dan kalus yang membentuk organ atau jaringan baru.

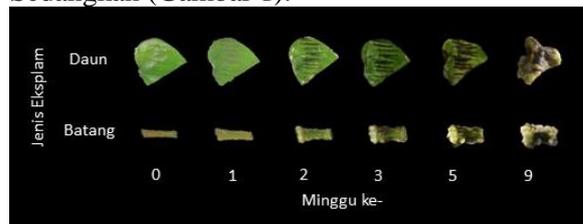
Sampel difiksasi dengan FAA (5% formalin; 5% asam asetat glasial; 90% alkohol 70%) selama 24 jam. Kemudian dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat (70-100%) dengan masing-masing pencucian selama 30 menit. Selanjutnya dealkoholisasi dengan alkohol:xilol (1:3; 1:1; 3:1) masing-masing 30 menit. Setelah dealkoholisasi, sampel dimasukkan xilol:paraffin (1:9) pada temperatur 57°C selama 24 jam.

Penyelubungan (*embedding*) dilakukan dengan mengganti xilol:paraffin (1:9) dengan paraffin murni pada temperatur 57°C selama 24 jam. Paraffin diganti dengan paraffin baru dan setelah ±1 jam, dibuat blok paraffin. Blok paraffin diiris menggunakan mikrotom putar (6-10 µm) dan dibuat preparat *series*. Kemudian dilakukan deparafinisasi dan pewarnaan dengan safranin 1%. Preparat ditetesi dengan balsam Canada dan ditutup dengan gelas benda. Pengamatan anatomi dilakukan menggunakan mikroskop Olympus CX22LED dan OptiLab 3.0 by Miconos Transdata Nusantara.

HASIL DAN PEMBAHASAN

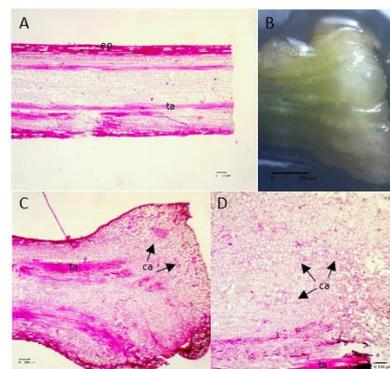
Pengaruh Jenis Eksplan terhadap Waktu Induksi Kalus Cabe Puyang

Berdasarkan hasil, diketahui bahwa eksplan batang memberikan respon lebih cepat dibandingkan daun. Pada minggu ke-3 eksplan batang pada minggu ke-3 sudah membentuk kalus, sedangkan eksplan daun baru mulai membentuk struktur gelombang pada permukaan daun, namun belum tampak jelas dan tampak jelas pada minggu ke-5 setelah induksi. Sedangkan (Gambar 1).



Gambar 1. Perbandingan induksi kalus dengan eksplan batang dan daun Cabe Puyang selama 9 minggu pengamatan.

Eksplan batang dapat merespon lebih cepat dibandingkan daun karena berkas pengangkut pada batang lebih kompleks dibandingkan pada daun, sehingga penyerapan air dan nutrisi pada batang lebih optimal (Sack dan Holbrook, 2006).



Gambar 2. Perkembangan eksplan batang membentuk kalus (A) penampang membujur eksplan kontrol; (B) morfologi eksplan *swelling*; (C) penampang membujur eksplan *swelling*; dan (D) penampang membujur eksplan berkalus. ep: epidermis, ca: *callus*, ta: *trachea*. Skala 1 mm= 100 µm.

Secara anatomis, terlihat bahwa setelah 2 minggu inokulasi, ujung bekas pembedahan eksplan muncul sel *amorphous* dengan pola penyebaran yang tidak terorganisir (Gambar 2C). Sel parenkim jaringan korteks pada eksplan minggu ke-2 setelah inokulasi memiliki ukuran yang lebih besar dan banyak dibandingkan pada eksplan kontrol (Gambar 2, A dan C). Selain itu,

Gambar 2C juga terlihat bahwa berkas pengangkut mulai menghilang dan terbentuk sel-sel meristematik di luar berkas pengangkut. Hal itu sesuai dengan penelitian [Park et al. \(2002\)](#) yang menyatakan bahwa sel parenkim pada jaringan korteks eksplan yang mulai berkembang membentuk kalus memiliki ukuran yang lebih besar dan panjang dibandingkan dengan eksplan kontrol. Pada tahap selanjutnya, berkas pengangkut yang ada sebelumnya mulai menghilang, kemudiann terbentuk sel-sel mersitematik di luar berkas pengangkut.

Pengaruh kombinasi ZPT terhadap Pertumbuhan Kalus Cabe Puyang

Eksplan batang yang diinokulasikan pada medium MS dengan 0,5 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BA dan 0,5 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BA memiliki waktu induksi kalus paling cepat dan tidak berbeda signifikan, yaitu selama ± 9 hari (Tabel 2). Hal itu sesuai dengan pernyataan bahwa konsentrasi auksin dan sitokinin yang seimbang dapat memicu pertumbuhan kalus ([Lisndanar et al., 2012](#)). Menurut [Junairiah et al. \(2018a\)](#), dalam transpor sitokinin, air dan nutrisi juga ikut terbawa melalui transpor jaringan pembuluh yang kemudian mempengaruhi potensial osmotik dalam sel.

Tabel 2. Pengaruh variasi konsentrasi ZPT terhadap waktu induksi kalus (WIK) Cabe Puyang

Konsentrasi (mg/l)			WIK (hari)
2,4-D	NAA	BA	
0	0	0	16,25 ^c
0,5	0	0,5	9,25 ^a
0,5	0	1	9,13 ^a
1	0	0,5	12,75 ^{abc}
0	0,5	0,5	13,88 ^{bc}
0	0,5	1	13,63 ^{bc}
0	1	0,5	11,88 ^{ab}

Berat segar kalus paling tinggi diperoleh pada perlakuan MS + 0,5 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BA yaitu 0,1347 g (Tabel 3). Nilai berat segar yang tinggi menunjukkan bahwa sel-sel kalus memiliki kandungan air tinggi. Berat segar dapat dipengaruhi oleh aktivitas metabolisme, faktor lingkungan seperti kelembaban, serta kecepatan pembelahan sel dan pembesaran sel yang merupakan respon dari adanya perlakuan ([Muryanti dan Anggarwulan, 2005](#); [Sathyanarayana dan Verghese, 2007](#)).

Tabel 3. Pengaruh variasi konsentrasi ZPT terhadap berat segar (BS) dan berat kering (BK) Cabe Puyang setelah 35 hari inokulasi

Konsentrasi (mg/l)			BS (g)	BK (g)
2,4-D	NAA	BA		
0	0	0	0,0143 ^a	0,0047 ^a
0,5	0	0,5	0,1053 ^{cd}	0,0160 ^{ab}
0,5	0	1	0,1347 ^d	0,0170 ^b
1	0	0,5	0,0617 ^{abc}	0,0130 ^{ab}
0	0,5	0,5	0,0293 ^a	0,0107 ^{ab}
0	0,5	1	0,0347 ^{ab}	0,0120 ^{ab}
0	1	0,5	0,0850 ^{bcd}	0,0157 ^{ab}

Hasil pengukuran berat kering kalus menunjukkan bahwa data relatif lebih stabil. Berat kering paling tinggi diperoleh pada perlakuan MS + 0,5 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l BA yaitu 0,0170 (Tabel 3). Berat kering hanya memiliki kandungan hasil metabolisme sehingga dapat dijadikan indikator pertumbuhan kalus ([Panglipur et al., 2013](#)).

Berdasarkan (Tabel 4), diketahui sebagian besar kalus yang terbentuk tergolong dalam kategori *Light Yellow Green* (150D). Warna kalus dapat menunjukkan tingkat keaktifan pembelahan sel. Awalnya, kalus yang terbentuk berwarna putih, menunjukkan sel bersifat embrionik dan belum mengandung kloroplas, namun menunjukkan adanya kandungan butir pati ([Ariati et al., 2012](#)). Kemudian secara perlahan kalus dapat berubah warna akibat adanya pigmentasi, transport atau translokasi nutrisi, serta adanya faktor lingkungan seperti cahaya ([Afshari et al., 2011](#)).

Beberapa kalus mengalami perubahan warna dari putih menjadi putih kekuningan, hijau, bahkan cokelat. Warna putih kekuningan merupakan warna kalus yang baik karena menunjukkan sel kalus masih aktif membelah ([Sorentina et al., 2013](#)). [Leupin et al. \(2000\)](#) menyatakan bahwa perubahan warna kalus menjadi hijau menandakan terjadinya pembentukan klorofil dengan bantuan cahaya. Sedangkan perubahan warna kalus dari warna putih menjadi cokelat (*browning*) dapat terjadi karena adanya akumulasi dan oksidasi dari kandungan fenol ([Jones dan Saxena, 2013](#)).

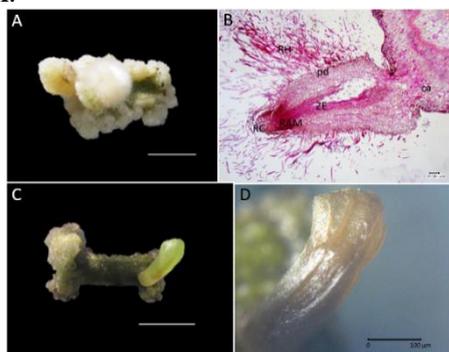
Tabel 4. Pengaruh variasi konsentrasi ZPT terhadap morfologi kalus Cabe Puyang setelah 35 hari inokulasi

Konsentrasi (mg/l)	Morfologi Kalus
--------------------	-----------------

2,4-D	NAA	BA	Warna	Struktur
0	0	0	152D	<i>friable</i>
0,5	0	0,5	150D	<i>friable</i>
0,5	0	1	145C	<i>friable</i>
1	0	0,5	150D	<i>friable</i>
0	0,5	0,5	150D	<i>friable</i>
0	0,5	1	150D	<i>friable</i>
0	1	0,5	150D	<i>friable</i>

Setiap perlakuan eksplan membentuk kalus yang *friable* (Tabel 4). Kalus *friable* memiliki kualitas yang lebih baik dibandingkan kalus kompak karena dapat dengan mudah dipisahkan menjadi sel tunggal (Chen *et al.*, 2016). Selama proses induksi, terdapat beberapa kalus yang menunjukkan respon pembentukan organ atau jaringan baru, menunjukkan kalus bersifat totipoten (Nagata dan Takebe, 1971).

Gambar 3, A-D menunjukkan bahwa organ atau jaringan yang terbentuk adalah akar dan kuncup (*bud*). Kemunculan kuncup tersebut hanya dijumpai pada perlakuan 0,5 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BA. Menurut Blakely dan Evans (1979), primordium akar memiliki sistem proliferasi sel yang efisien. Pada penelitian Saunders dan Bingham (1975) diketahui bahwa 2,4-D merupakan ZPT yang sangat efektif dalam pembentukan kuncup dibandingkan dengan NAA.



Gambar 3. Perkembangan kalus membentuk organ atau jaringan baru (A) hari ke-36 setelah inokulasi; (B) penampang melintang kalus A; (C) hari ke-51 setelah inokulasi, dan (D) hari ke-74 setelah inokulasi. ca: *callus*, pd: *protoderm*, RAM: *Root Apical Meristem*, RC: *Root Cap*, RH: *Root Hair*, ZE: *Zona Elongasi*. Skala: A, C= 500 μ m; B, D= 100 μ m.

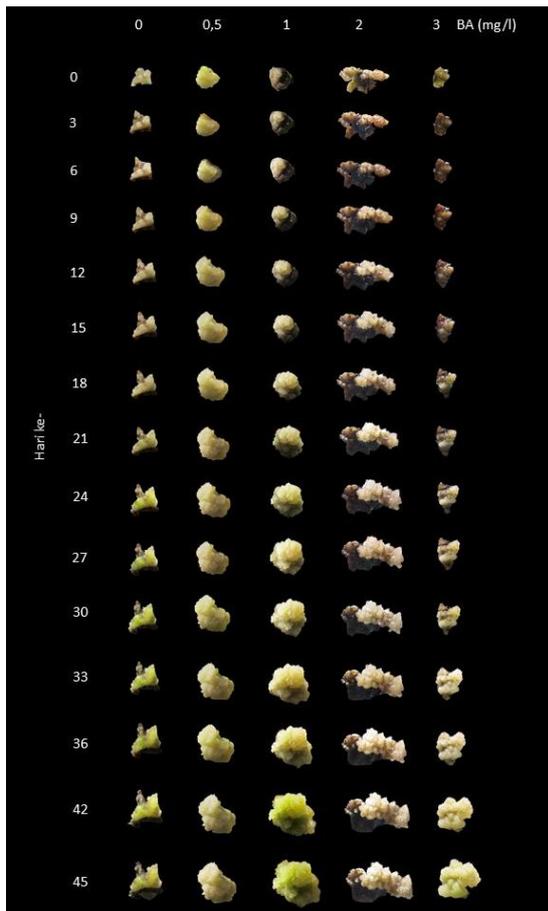
Kalus yang berhasil membentuk kuncup tersebut hanya diinokulasi pada medium induksi kalus, tanpa dilakukan subkultur ke medium baru. Hal yang sama juga diperoleh pada penelitian Pillai dan Hildebrandt (1969), saat

induksi kalus tanaman *Geranium* dijumpai adanya kalus yang membentuk kuncup tanpa dilakukan subkultur kalus ke medium kedua, dengan komposisi yang diubah. Sedangkan pada penelitian lain diperlukan subkultur ke medium kedua dengan komposisi auksin yang lebih rendah (Levine, 1950; Halperin dan Wetherell, 1964).

Pengaruh BA terhadap Regenerasi Tunas dari Kalus Cabe Puyang

Pada penelitian ini, kalus yang telah disubkultur selama 45 hari pada medium perlakuan dengan variasi konsentrasi BA ternyata belum berhasil membentuk tunas, namun menunjukkan adanya pertumbuhan (ukuran kalus yang meningkat). Kalus yang diinokulasi pada MS+1 mg/l BA menunjukkan perubahan warna yang cukup signifikan, yaitu dari kalus yang berwarna putih menjadi kuning kehijauan dan memiliki tekstur kalus *friable* (Gambar 4). Menurut Hesami dan Daneshvar (2018), ada 2 tipe kalus yang dapat mencirikan akan membentuk tunas adventif, yaitu warna kalus kuning kehijauan dan bertekstur *friable*.

Kalus yang telah disubkultur banyak yang mengalami *browning*, seperti pada Gambar 5 Selain dikarenakan oleh stress, *browning* tersebut dapat terjadi karena tanaman sumber eksplan mengandung fenol yang tinggi. Golongan Piperaceae termasuk Cabe Puyang merupakan dalam tanaman dengan senyawa fenolik yang tinggi, sehingga tergolong antioksidan (Jadid *et al.*, 2018).



Gambar 4. Perkembangan kalus selama 45 hari setelah disubkultur pada medium dengan variasi konsentrasi BA.



Gambar 5. Kenampakan kalus yang mengalami *browning* setelah disubkultur ke medium untuk regenerasi.

Menurut Unchendu, *et al.*, 2011 & Thomas, 2008 dalam [Jones dan Saxena \(2013\)](#), kadar fenolik pada kultur dapat direduksi dengan beberapa cara, antara lain 1) pemberian asam askorbat, melatonin, atau *citric acid*; 2) penambahan arang aktif (*Charcoal*) pada medium yang akan berperan dalam pengikatan fenol; dan (3) subkultur secara berkala untuk

mengurangi stress. Pada penelitian ini, reduksi fenolik dilakukan dengan penambahan arang aktif pada medium perlakuan serta subkultur secara berkala.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa eksplan yang lebih responif untuk digunakan sebagai eksplan dalam induksi kalus adalah organ batang Cabe Puyang. Kombinasi 0,5 mg/l 2,4-D dan 0,5 mg/l BA serta 0,5 mg/l 2,4-D dan 1,0 mg/l BA memiliki waktu induksi kalus paling cepat dan tidak berbeda signifikan, yaitu selama 9 hari. Penambahan BA dengan beberapa variasi konsentrasi pada medium subkultur belum dapat membentuk tunas, namun pada penambahan 1 mg/l BA mulai menunjukkan tana regenerasi, yaitu kalus *friable* dan menjadi kuning kehijauan.

REFERENSI

- Afshari, R. R. Angoshtari, dan S. Kalantari. 2011. Effects of Light dan Different Plant Growth Regulators on Induction of Callus Growth in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Genotypes. *Plant Omics*, 4(2): 60.
- Anisah dan M. Hayati. 2017. Pengambilan Keputusan Petani untuk Tetap Berusahatani Cabe Jamu di Kecamatan Bluto, Kabupaten Sumenep. *AGRARIS: Journal of Agribusiness dan Rural Development Research*, 3(2): 112-118.
- Ariati, S.N., W. Muslimin, dan N. Suwastika. 2012. Induksi Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) pada Media MS dengan Penambahan 2,4-D, BAP, dan Air Kelapa. *Jurnal Natural Science*, 1(1): 74-78.
- Blakely, L.M., dan T.A. Evans. 1979. Cell Dynamics Studies on The Pericycle of Radish Seedling Roots. *Plant Sci. Lett*, 14: 79-83.
- Chen, Y., Y. Zhang, Q. Cheng, M. Niu, H. Liang, H. Yan, X. Zhang, J.A.T. da Silva, dan G. Ma. 2016. Plant Regeneration via Direct dan Callus-mediated Organogenesis from Leaf of *Chirita swinglei* (Merr.) W.T. Wang. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 52: 521-529.
- Fajroti, 2012. Pengaruh Jenis Eksplan dan Konsentrasi 2,4-D (2,4 – *Dichlorophenoxy Acetic Acid*) terhadap Pertumbuhan dan Kadar Metabolit

- Sekunder (Stigmasterol dan Sitosterol) Kalus Purwoceng (*Pimpinella alpine* Molk.) pada Medium MS. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Faramayuda, F., Elfahmi, dan R.S Ramelan. 2016. Optimasi Induksi Kalus Tanaman Cabe Jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) dengan Berbagai Variasi Zat Pengatur Tumbuh. *Kartika-Jurnal Ilmiah Farmasi*, 4(2): 21-25.
- George, E.F. dan P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture – Hdanbook dan Directory of Commercial Laborartories*. Exegetics Limited. Engldan.
- Halperin, W., dan D.F. Wetherell. 1964. Adventive Embryony in Tissue Cultures of The Wild Carrot, *Daucus carota*. *Amer. J. Bot*, 51: 274-283.
- Hesami, M. dan M.H. Daneshvar. 2018. In Vitro Adventitious Shoot Regeneration through Direct dan Indirect Organogenesis from Seedling-derived Hypocotyl Segments of *Ficus religiosa* L.: An Important Medicinal Plant. *HORTSCIENCE*, 53(1): 55-61.
- Indah, P.N. dan D. Ermavitalini. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BA) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(1):1-6
- Jadid, N., B.A. Arraniry, D. Hidayati, K.I. Purwani, W. Wikanta, S.R. Hartanti, dan R.Y. Rachman. 2018. Proximate Composition, Nutritional Values dan Phytochemical Screening of *Piper retrofractum* Vahl. *Fruits. Trop. Biomed*, 8(1): 37-43.
- Jones, A.M.P., dan P.K. Saxena. 2013. Inhibition of Phenylpropanoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L.: A Novel Approach to Reduce Oxidative Browning in Plant Tissue Culture. *PLoS ONE*, 8(10): 1-13.
- Junairiah, Purnomo, E.S.W. Utami, Ni'matuzahroh, dan L. Sulistyorini. 2018a. Callus Induction of *Piper betle* Var Nigra Using 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid dan 6-Benzyl Aminopurin. *Biosaintifika*, 10(3): 588-596.
- Junairiah, D.A. Sofiana, Y.S.W. Manuhara, dan Surahmaida. 2018b. Induksi Kalus *Piper retrofractum* Vahl. dengan Zat Pengatur Tumbuh Auksin dan Sitokinin. *Journal of Pharmacy dan Science*, 3(2): 41-46.
- Leupin, R.E., M. Leupin, C. Ehret, K.H. Erismann, dan B. Witholt. 2000. Compact Callus dan Plant Regeneration of a Non-flowering Vetiver from Java. *Plant Cell, Tissue dan Organ Culture*, 62: 115-123.
- Levine, M. 1950. The Growth of Normal Plant Tissue In Vitro as Affected by Chemical Carcinogens dan Plant Growth Substances. I. The Culture of The Carrot Taproot Meristem. *Amer. J. Bot*, 37:445-458.
- Lisndanar, D. S., W. Mudyantini, dan A. Pitoyo. 2012. Pengaruh Pemberian Variasi Konsentrasi NAA (*α-naphthaleneacetic acid*) dan 2,4 D terhadap Induksi Protocorm Like Bodies (PLB) Anggrek Macan (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.)). *Bioteknologi*, 9(2): 66-72 (2012)
- Mindarti, S dan B. Nurbaeti. 2015. *Buku Saku Tanaman Obat Keluarga (TOGA)*. Balai pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Barat. Lembang, hal. 1.
- Muryanti, S. dan E. Anggarwulan. 2005. Pertumbuhan dan Produksi Reserpin Kalus Pule Pdanak (*Rauwolfia serpentine* (L.) Bentham ex. Kurz) pada Pemberian Metil Jasmonat secara *In Vitro*. *Bioteknologi*, 2(2): 58-64.
- Nagata, T., dan I. Takebe. 1971. Plating of Isolated Tobacco Mesophyll Protoplasts on Agar Medium. *Planta*, 99(1): 12-20.
- Nofrianinda, V, F. Yulianti, dan E. Agustina. 2017. Pertumbuhan Planlet Stroberi (*Fragaria ananassa* D.) Var. Dorit pada Beberapa Variasi Medium Modifikasi *In Vitro* di Balai Penelitian Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO). *BIOTROPIC The Journal of Tropical Biology*, 1(1): 41-50.
- Nurhuda, A., N. Azizah, dan E. Widaryanto. 2017. Kajian jenis dan Bagian Sulur pada Pertumbuhan Stek Cabe Jamu (*Piper retrofractum* Vahl.). *Jurnal Produksi Tanaman*. 5 (1): 154-160.
- Panglipur, D.B. L. Sulistyowati, N, Hidayah, dan Anton Muhibuddin. 2013. Uji

- Ketahanan Kalus Kultivar Tebu (*Saccharum officinarum* L.) terhadap Penyakit Pokahbung Menggunakan Filtrat Kultur *Fusarium moniliforme* secara *In Vitro*. *Jurnal HPT*, 1(4): 51-58.
- Park, J.B., K.B. Lee, dan S. Lee. 2002. Histological Study of Callus Formation dan Root Regeneration from Mung Bean (*Vigna radiata* W.) *Journal of Plant Biology*, 45(3): 170-176.
- Pillai, S.K., dan C. Hildebrandt. 1969. Induced Differentiation of Geranium Plants from Undifferentiated Callus *In Vitro*. *Amer. J. Bot*, 56: 52-58.
- Sathyanarayana, B.N. dan D. Verghese. 2007. *Plant Tissue Culture: Practices dan New Experimental Protocols*. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi, p. 109.
- Sack, L., dan N.M. Holbrook. 2006. Leaf Hydraulics. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 361-381.
- Saunders, J.W., dan E.T. Bingham. 1975. Growth Regulator Effects on Bud Initiation in Callus Cultures of *Medicago sativa*. *Amer. J. Bot*, 62(8): 850-855.
- Sitinjak, M.A., M.N. Isda, dan S. Fatonah. 2015. Induksi Kalus dari Eksplan Daun *In Vitro* Keladi Tikus (*Typhonium* sp.) dengan Perlakuan 2,4-D dan Kinetin. *Jurnal Biologi*, 8(1): 32-39.
- Sorentina, M.S.M., Haliani, Muslimin, dan I.N. Suwastika. 2013. Induksi Kalus Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) Lokal Palu pada Medium MS dengan Penambahan 2,4-D (2,4-Asam Dikloropenoksi Asetat) dan Air Kelapa. *Online Jurnal of Natural Science*, 2(2): 55-63.
- Sudiarto. 1992. Budidaya Cabe Jamu di Kabupaten Lamongan Jawa Timur. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, 1(3): 8-10.
- Trigiano, R.N. dan D.J. Gray. 2011. *Plant Tissue Culture, Development, dan Biotechnology*. CRC Press. New York, pp. 14-15.
- Winarto, W.P. 2003. *Cabe Jawa: Si Pedas Berkhasiat Obat*. Agromedium Pustaka. Jakarta, hal. 12-15.