

INDUKSI KALUS HIPOKOTIL BROKOLI PADA MEDIA MS YANG DIBERI 2,4-D

Max Sahetapy
Fakultas Pertanian, Universitas Klabat
(msahetapy@unklab.ac.id)

Abstrak

Brokoli merupakan jenis sayuran yang cukup populer sebagai bahan pangan. Brokoli memiliki kandungan antioksidan yang tinggi dan juga senyawa penting yang lain. Salah satu masalah yang dihadapi adalah bahwa jumlah produksi yang rendah mengakibatkan brokoli sulit untuk didapatkan. Hal ini disebabkan perbanyakannya bibit brokoli yang sulit. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh zat pengatur tumbuh 2,4-D pada pertumbuhan kalus brokoli dan untuk mendapatkan suatu dosis 2,4-D yang tepat untuk pertumbuhan kalus brokoli. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dan Rancangan Acak Kelompok dengan enam perlakuan serta sepuluh ulangan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 2,4-D dapat memberikan pertumbuhan yang signifikan pada tanaman brokoli yang dilakukan secara kultur jaringan. Dosis yang tepat untuk pertumbuhan kalus brokoli adalah pada perlakuan D₁ yaitu 500 ml MS + .25 ml 2,4-D.

Kata Kunci: brokoli, kalus hipokotil, 2,4-D

Abstract

Broccoli is a vegetable that is quite popular as food. Broccoli has a high content of antioxidants and other important compounds. One of the problems faced is the low quantity of production which results in the difficulty to obtain broccoli. This is due to the difficult reproduction of broccoli seeds. The research objective was to determine the effect of plant growth regulator 2,4-D on the growth of broccoli callus and to obtain the right dose of 2,4-D for the growth of broccoli callus. This study used a Complete Randomized Design and Randomized Block Design with six treatments and ten replications. The results showed that 2,4-D could provide a significant growth in the broccoli plant performed through tissue culture. The appropriate dose for the growth of broccoli callus was in the treatment of D₁, namely 500 ml MS + .25 ml of 2,4-D.

Keywords: broccoli, hypocotil callus, 2,4-D

Brokoli (*Brassicca oleraseae* L. var. *Italica*) adalah tanaman sayuran yang termasuk dalam kubis-kubisan atau Brassicaceae. Brokoli berasal dari daerah Laut Tengah dan sudah dibudidayakan sejak masa Yunani Kuno. Sayuran ini belum lama masuk ke Indonesia (sekitar 1970an), dan kini itu cukup populer sebagai bahan pangan. Bagian brokoli yang dimakan adalah kepala bunga berwarna hijau yang tersusun rapat seperti cabang pohon dengan batang tebal. Sebagian besar kepala bunga tersebut dikelilingi oleh dedaunan. Bunga brokoli berwarna hijau, dan masa tumbuhnya lebih lama daripada kubis bunga. Brokoli tersusun dari bunga-bunga kecil yang berwarna hijau, tetapi tidak sekompak kubis. Dibandingkan dengan kubis bunga, bunga brokoli akan terasa lebih lunak setelah direbus (Dalimartha, 1999).

Deskripsi mengenai kubis bunga pertama kali dijumpai pada tahun 1544, sedangkan nama *Brussel sprout* (kubis tunas), yang berasal dari nama salah satu kota kecil di Belgia, baru populer pada awal abad ke-19. Brokoli yang sekarang dikenal berasal dari daerah Mediterania. Tanaman ini baru populer di Amerika setelah kedatangan imigran Italia yang membawanya ke Kalifornia.

Sayuran jenis kubis-kubisan ini disebutkan paling kaya zat antioksidan, baik dalam hal jumlah maupun jenisnya. Senyawa antioksidan paling ampuh yang tersimpan dalam brokoli adalah sulforfan. Selain itu, ada juga betakaroten, indola, dan kuersetin. Brokoli amat penting bagi wanita karena mampu membuang kelebihan estrogen berbahaya yang berpotensi membangkitkan kanker. Bagi penderita kencing manis (diabetes mellitus), brokoli membantu meredakan melonjaknya kadar gula darah

karena brokoli sangat kaya mikromineral kromium. Untuk itu, penderita diabetes disarankan lebih sering memanfaatkan sayuran kelompok kubis-kubisan, terutama brokoli (Winarsi, 2007). Selanjutnya, berbagai kalangan memberikan predikat khusus untuk brokoli sebagai *superfood*. Banyak riset menunjukkan bahwa brokoli kaya akan zat-zat yang berfaedah bagi kesehatan. Sebuah penelitian terbaru di Inggris mengindikasikan bahwa brokoli memiliki zat penting yang mampu memperbaiki dan mengembalikan fungsi pembuluh darah yang rusak akibat diabetes. Peneliti dari Universitas Warwick meyakini bahwa zat yang bernama sulforfan mampu merangsang produksi

enzim-enzim yang dapat melindungi pembuluh darah dan menurunkan molekul-molekul yang menyebabkan kerusakan sel-sel secara signifikan. Sayuran-sayuran jenis *Brassica* seperti brokoli sebelumnya memang berkaitan dengan rendahnya risiko serangan jantung dan stroke (Anonym, 2008).

Brokoli mengandung lemak, protein, serat, karbohidrat, air, zat besi, kalsium, mineral, dan bermacam vitamin (A, C, E, riboflamin, nikotinamida; Lihat Tabel 1). Istimewanya, sayuran ini mengandung sulforfan, yaitu senyawa pencegah penyakit kanker. Sebab itu brokoli dinobatkan sebagai tanaman obat (Intan, 2008).

Tabel 1

Nilai Gizi Brokoli Segar per 100 g

Informasi Gizi	Per 100 g
Energi	142 kJ atau 34 kkal
Lemak	.370 g
Lemak jenuh	.039 g
Lemak tak Jenuh ganda	.038 g
Lemak tak Jenuh tunggal	.011 g
Kolesterol	.000 mg
Protein	2.820 g
Karbohidrat	6.640 g
Serat	2.600 g
Gula	1.700 g
Sodium	33.000 mg
Kalium	316.000 mg

Brokoli adalah tanaman yang baik dikonsumsi; namun, tanaman ini juga memiliki kekurangan. Umumnya, brokoli bersifat inkompatibel sehingga perlu dilakukan penyerbukan silang. Benih jenis hibrida mempunyai sifat yang kurang tegar yang menyebabkan hasil biji umumnya rendah (George & Sherrington, 1984).

Bila ditinjau dari segi kebutuhan, bahan baku dari bahan tumbuh-tumbuhan untuk mendukung industri obat-obatan akan semakin sulit dipenuhi akibat berbagai macam kendala. Salah satu faktor adalah yang berhubungan dengan penyediaan bibit tanaman obat. Penyediaan bibit secara konvensional untuk mengantisipasi permintaan industri seringkali kurang memadai secara kualitas dan kuantitas. Hal ini menyebabkan jumlah produksi tidak mampu memenuhi kebutuhan (Badres, 2013). Sebab itu diperlukan teknik perbanyak tanaman yang menggunakan kultur invitro dengan menambahkan salah satu zat pengatur tumbuh yang berperan dalam induksi kalus yaitu 2,4-D. Zat 2,4-D memiliki mekanisme kerja yang sama dengan auksin yaitu mengatur pembesaran sel dan memicu pemanjangan sel di daerah belakang ujung meristem (Riyadi, 2014).

Brassica oleracea adalah tanaman dwimusim (biennial); namun, tanaman ini dapat pula semusim maupun tahunan (perennial) tergantung dari kultivar dan suhu lingkungan. Hal ini terjadi akibat beberapa varietasnya memerlukan rangsangan suhu rendah (di atas 0 °C dan di bawah 7 °C) untuk memulai pembungaan. Varietas-varietas tersebut memerlukan vernalisasi atau perlakuan suhu dingin. Apabila varietas demikian tidak mengalami suhu rendah dalam selang waktu tertentu yang mencukupi (biasanya 2-3 bulan), tumbuhan akan tumbuh terus tanpa berbunga selama bertahun-tahun. Dalam agronomi varietas demikian disebut tipe 'musim dingin' (*winter type* karena memerlukan musim dingin untuk berproduksi) atau 'musim gugur' (*autumn type* karena disemai pada musim gugur). Varietas yang tidak memerlukan vernalisasi untuk berbunga disebut tipe 'musim panas' (*summer type*) atau 'musim semi' (*spring type* karena ditanam pada musim semi). Akibat persilangan yang dilakukan manusia, sekarang sudah ada brokoli tipe setengah musim dingin untuk memperpanjang musim (Masley, 2009).

Menurut Broko (2014), klasifikasi dari tanaman brokoli adalah sebagai berikut:

Kingdom: Plantae
 Subkingdom: Tracheobionta
 Superdivisi: Spermatophyta
 Divisi: Magnoliophyta
 Kelas: Magnoliopsida
 Subkelas: Dilleniidae
 Ordo: Capparales
 Famili: Brassicaceae
 Genus: *Brassica*
 Spesies: *Brassica oleracea* L.
 Varietas: *Brassica oleracea* L. var. *Italica*

Adapun morfologi tanaman brokoli adalah sebagai berikut. Brokoli memiliki akar serabut dan akar tunggang. Akar tunggang bertumbuh ke pusat bumi, sedangkan akar serabut bertumbuh ke arah samping, menyebar, dan dangkal (20-30 cm). Sistem perakaran yang dangkal membuat tanaman ini dapat bertumbuh dengan baik apabila ditanam pada tanah yang gembur dan dapat menyerap. Selanjutnya, batang brokoli tumbuh tegak dan pendek (± 30 cm); batang tersebut berwarna hijau, tebal, lunak, namun cukup kuat dan bercabang samping. Batang tersebut halus tidak berambut dan tidak begitu tampak jelas karena tertutup oleh daun-daun.

Daun brokoli berbentuk bulat telur (oval) dengan bagian tepi daun bergerigi agak panjang dan membentuk celah-celah yang menyirip agak melengkung ke dalam. Daun berwarna hijau dan tumbuh berselang-seling pada batang tanaman; tangkainya agak panjang dengan pangkal daun yang tebal dan lunak. Daun-daun yang tumbuh pada pucuk batang terbentuk sebelum masa bunga, berukuran kecil, dan melengkung ke dalam melindungi bunga yang sedang mulai tumbuh.

Bunga brokoli merupakan kumpulan massa bunga yang berjumlah lebih dari 5,000 kuntum bunga bersatu dan membentuk bulatan tebal serta padat (kompak). Warna bunga sesuai dengan varietasnya. Ada yang memiliki masa bunga hijau muda, hijau tua, dan hijau kebiru-biruan (ungu). Berat bunga brokoli berkisar 0.6-0.8 kg dengan diameter antara 18-25 cm, tergantung pada varietasnya (Rukmana, 1995). Pada kondisi lingkungan yang sesuai, bunga brokoli dapat tumbuh memanjang menjadi tangkai bunga yang penuh dengan kuntum bunga. Tiap bunga terdiri dari empat helai daun kelopak (calyx), empat helai daun mahkota bunga (corolla), enam benang sari yang komposisinya empat memanjang dan dua pendek. Bakal buah terbagi menjadi dua ruang, dan setiap ruang berisi bakal biji.

Buahnya terbentuk dari hasil penyerbukan bunga yang terjadi karena penyerbukan sendiri ataupun penyerbukan silang dengan bantuan serangga lebah madu. Buah berbentuk polong, berukuran kecil, dan ramping, dengan panjang

antara 3–5 cm. Di dalam buah tersebut terdapat biji berbentuk bulat kecil dan berwarna coklat kehitam-hitaman. Biji-biji tersebut dapat dipergunakan sebagai benih perbanyak tanaman (Fitriani, 2009).

Ada faktor-faktor yang berpengaruh pada keberhasilan kultur jaringan. Faktor-faktor yang sangat mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis eksplan dalam kultur invitro adalah:

1. Genotipe Tanaman

Genotipe tanaman yang dimaksudkan adalah genotipe asal eksplan yang diisolasi. Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa respon masing-masing eksplan tanaman sangat bervariasi tergantung dari spesies, bahkan varietas tanaman asal eksplan tersebut. Pengaruh genotipe ini umumnya berhubungan erat dengan faktor-faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan eksplan, seperti kebutuhan nutrisi, zat pengatur tumbuh, dan lingkungan kultur. Oleh karena itu, komposisi media zat pengatur tumbuh dan lingkungan pertumbuhan yang dibutuhkan oleh masing-masing varietas tanaman bervariasi meskipun teknik kultur jaringan yang digunakan sama (Abas, 2011).

Perbedaan respon genotipe tanaman tersebut dapat diamati pada perbedaan eksplan masing-masing varietas untuk tumbuh dan beregenerasi. Masing-masing varietas tanaman berbeda kemampuannya dalam merangsang pertumbuhan tunas aksilar, baik jumlah tunas maupun kecepatan pertumbuhan tunas aksilarnya. Hal serupa juga terjadi pada pembentukan kalus, laju pertumbuhan kalus, serta regenerasi kalus menjadi tanaman lengkap baik melalui pembentukan organ-organ adventif maupun embrio somatik. Regenerasi dan perkembangan organ adventif dan somatik embrio juga sangat ditentukan oleh varietas tanaman induk. Perbedaan pengaruh genetik ini disebabkan oleh perbedaan kontrol genetik dari masing-masing varietas serta jenis kelamin tanaman induk (Sepdian, 2009).

2. Media Kultur

Perbedaan komposisi media, komposisi zat pengatur tumbuh, dan jenis media yang digunakan akan sangat mempengaruhi pertumbuhan dan regenerasi eksplan yang dikulturkan (Abas, 2011).

a. Komposisi Media

Perbedaan komposisi media, seperti jenis dan komposisi garam-garam anorganik, senyawa organik, dan zat pengatur tumbuh sangat mempengaruhi respon eksplan saat dikulturkan. Perbedaan komposisi media biasanya mempengaruhi arah pertumbuhan dan regenerasi eksplan. Meskipun demikian, media yang telah diformulasikan tidak hanya berlaku untuk satu jenis eksplan dan

tanaman saja. Beberapa jenis formulasi media bahkan digunakan secara umum untuk berbagai jenis eksplan dan varietas tanaman, seperti media MS. Namun, ada juga beberapa jenis media yang diformulasikan untuk tanaman-tanaman tertentu misalnya WPM dan VW. Media-media tersebut dapat digunakan untuk berbagai tujuan seperti perkecambahan biji, kultur pucuk, kultur kalus, dan regenerasi kalus melalui organogenesis dan embriogenesis. Media yang dibutuhkan untuk perkecambahan biji dan perangsangan tunas-tunas aksilar umumnya lebih sederhana dibandingkan dengan media untuk regenerasi kalus melalui organogenesis maupun embriogenesis (Nurmahyudi, 2012).

b. Komposisi Hormon Pertumbuhan

Komposisi dan konsentrasi hormon pertumbuhan yang ditambahkan dalam media sangat mempengaruhi arah pertumbuhan dan regenerasi eksplan yang dikulturkan. Komposisi dan konsentrasi hormon pertumbuhan yang ditambahkan ke dalam media kultur sangat tergantung dari jenis eksplan yang dikulturkan dan tujuan pengkulturannya. Konsentrasi hormon pertumbuhan optimal yang ditambahkan ke dalam media tergantung pula dari eksplan yang dikulturkan serta kandungan hormon pertumbuhan endogen yang terdapat pada eksplan tersebut. Komposisi yang sesuai ini dapat diperkirakan melalui percobaan-percobaan yang telah dilakukan sebelumnya bersamaan dengan percobaan untuk mengetahui komposisi hormon pertumbuhan yang sesuai dengan kebutuhan dan arah pertumbuhan eksplan yang diinginkan (Sepdian, 2009).

Hormon pertumbuhan yang digunakan untuk perbanyakan secara invitro adalah golongan auksin, sitokinin, giberelin, dan *growth retardant*. Auksin yang umum dipakai adalah IAA (*Indole Acetic Acid*), IBA (*Indole Butyric Acid*), NAA (*Naphtalena Acetic Acid*), dan 2,4-D (*2,4-dichloropenoxy Acetic acid*). Selain itu, beberapa peneliti pada beberapa tanaman menggunakan juga CPA (*Chlorophenoxy Acetic Acid*). Sitokinin yang banyak dipakai adalah kinetin (*Furfuryl Amino Purine*), BAP/BA (*Benzyl Amino Purine/Benzyl Adenine*), dan 2i-P (*2-isopentenyl Adenin*). Beberapa sitokinin lainnya yang juga digunakan adalah Zeatin, Thidiazuron, dan PBA (*6(benzylamino)-9-(2-tetrahydropyranil)-9H-purine*). Hormon pertumbuhan golongan giberelin yang paling umum digunakan adalah GA3. Selain itu, ada

beberapa peneliti yang menggunakan GA4 dan GA7. *Growth retardant* yang sering digunakan adalah Ancymidol, TIBA, AbA, Paracloburtazol, dan CCC (Abas, 2011).

c. Keadaan Fisik Media

Media yang umum digunakan dalam kultur jaringan adalah medium padat, medium semi padat, dan medium cair. Keadaan fisik media akan mempengaruhi pertumbuhan kultur, kecepatan pertumbuhan, dan diferensiasinya. Keadaan fisik media ini mempengaruhi pertumbuhan antara lain karena efeknya pada osmolaritas larutan dalam media serta ketersediaan oksigen bagi pertumbuhan eksplan yang dikulturkan (Luri, 2009).

Media yang umum digunakan dalam mikropropagasi adalah *semi-solid media* (media semi padat) dengan cara menambahkan agar-agar. Menurut Abas (2011), media semi padat ini digunakan karena beberapa alasan antara lain:

- (1) Eksplan yang kecil mudah terlihat dalam media semi padat.
- (2) Kultur eksplan tetap berada pada orientasi yang sama.
- (3) Eksplan berada di atas permukaan media sehingga tidak diperlukan teknik aerasi tambahan pada kultur.
- (4) Orientasi pertumbuhan tunas dan akar tetap.
- (5) Kalus tidak pecah seperti jika ditempatkan pada media cair.

Penambahan agar-agar dalam beberapa kasus dapat menghambat pertumbuhan karena:

- (1) Agar-agar mungkin mengandung senyawa penghambat yang dapat menghambat morfogenesis beberapa kultur atau memperlambat pertumbuhan kultur.
- (2) Eksudasi fenolik dari eksplan terserap oleh media yang menempel dengan eksplan sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan.
- (3) Agar-agar harus dicuci bersih dari akar sebelum diaklimatisasi.
- (4) Perlu waktu yang lebih banyak untuk mencuci gelas kultur. Misalnya, botol-botol harus diautoklaf untuk melarutkan agar-agar sebelum dicuci.

3. Lingkungan Tumbuh

a. Suhu

Tanaman umumnya tumbuh pada lingkungan dengan suhu yang tidak sama setiap saat. Misalnya, pada siang dan malam hari tanaman mengalami kondisi dengan perbedaan suhu yang cukup besar. Keadaan demikian bisa dilakukan dalam kultur in vitro

dengan mengatur suhu siang dan malam di ruang kultur; namun, laboratorium kultur jaringan selama ini mengatur suhu ruang kultur yang konstan baik pada siang maupun malam hari. Umumnya, temperatur yang digunakan dalam kultur in vitro lebih tinggi dari kondisi suhu in vivo. Tujuannya adalah untuk mempercepat pertumbuhan dan morfogenesis eksplan.

Pada sebagian besar laboratorium, suhu yang digunakan adalah konstan yaitu 25 °C (kisaran suhu 17-32 °C). Tanaman tropis umumnya dikulturkan pada suhu yang sedikit lebih tinggi dari tanaman empat musim, yaitu 27 °C (kisaran suhu 24-32 °C). Bila suhu siang dan malam diatur berbeda, perbedaan umumnya adalah 4-8 °C. Variasi yang biasa dilakukan adalah 25 °C pada siang hari dan 20 °C pada malam hari atau 28 °C pada siang hari dan 24 °C pada malam hari. Meskipun hampir semua tanaman dapat tumbuh pada kisaran suhu tersebut, kebutuhan suhu untuk masing-masing jenis tanaman umumnya berbeda-beda. Tanaman dapat tumbuh dengan baik pada suhu optimumnya. Pada suhu ruang kultur di bawah optimum, pertumbuhan eksplan lebih lambat; namun, pada suhu di atas optimum pertumbuhan tanaman juga terhambat akibat tingginya laju respirasi eksplan (Nurmahyudi, 2012).

b. Kelembaban Relatif

Kelembaban relatif dalam botol kultur dengan mulut botol yang ditutup umumnya cukup tinggi, yaitu berkisar antara 80-90%. Jika mulut botol ditutup agak longgar, kelembaban relatif dalam botol kultur dapat lebih rendah dari 80%. Kelembaban relatif di ruang kultur umumnya adalah sekitar 70%. Jika kelembaban relatif ruang kultur berada di bawah 70%, itu akan mengakibatkan media dalam botol kultur (yang tidak tertutup rapat) cepat menguap dan kering, sehingga eksplan dan planlet yang dikulturkan akan cepat kehabisan media. Namun, kelembaban udara dalam botol kultur yang terlalu tinggi menyebabkan tanaman tumbuh abnormal yaitu daun lemah, mudah patah, serta tanaman kecil-kecil dan terlampau sukulen. Kondisi tanaman demikian disebut 'vitrifikasi' atau 'hiperhidrositas'. Subkultur ke media lain atau menempatkan planlet kecil ini dalam botol dengan tutup yang agak longgar, ditutup dengan filter, atau menempatkan gel silika ke dalam botol kultur dapat membantu mengatasi masalah ini (Sepdian, 2009).

c. Cahaya

Pada pertumbuhan tanaman dalam kondisi in vitro, kuantitas dan kualitas cahaya, yaitu intensitas, lama penyinaran, dan panjang gelombang cahaya mempengaruhi pertumbuhan eksplan dalam kultur. Pertumbuhan organ atau jaringan tanaman dalam kultur in vitro umumnya tidak dihambat oleh cahaya; namun, pertumbuhan kalus umumnya dihambat oleh cahaya.

Pada perbanyakan tanaman secara in vitro, kultur umumnya diinkubasikan pada ruang penyimpanan dengan penyinaran, kecuali pada teknik perbanyakan yang diawali dengan pertumbuhan kalus. Sumber cahaya pada ruang kultur ini umumnya adalah lampu fluorescent (TL). Hal ini disebabkan lampu TL menghasilkan cahaya warna putih. Selain itu, sinar lampu TL tidak meningkatkan suhu ruang kultur secara drastis (hanya meningkat sedikit). Intensitas cahaya yang dibutuhkan tanaman adalah dalam keadaan normal. Intensitas cahaya dalam ruang kultur untuk pertumbuhan tunas umumnya berkisar antara 600-1,000 lux. Perkecambahan dan inisiasi akar umumnya dilakukan pada intensitas cahaya lebih rendah.

Selain intensitas cahaya, lama penyinaran atau fotoperiodisitas juga mempengaruhi pertumbuhan eksplan yang dikulturkan. Lama penyinaran umumnya diatur sesuai dengan kebutuhan tanaman sesuai dengan kondisi alamiahnya. Periode terang dan gelap umumnya diatur pada kisaran 8-16 jam terang dan 16-8 jam gelap, tergantung varietas tanaman dan eksplan yang dikulturkan. Periode siang dan malam (terang dan gelap) ini diatur secara otomatis menggunakan timer yang ditempatkan pada saklar lampu pada ruang kultur. Dengan teknik ini penyinaran dapat diatur konstan sesuai kebutuhan tanaman (Nurmahyudi, 2012).

4. Kondisi Eksplan

Pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh keadaan jaringan tanaman yang digunakan sebagai eksplan. Kondisi eksplan yang mempengaruhi keberhasilan kultur adalah jenis eksplan, ukuran, umur, dan fase fisiologis jaringan yang digunakan sebagai eksplan.

Meskipun masing-masing sel tanaman memiliki kemampuan berpotensi, masing-masing jaringan memiliki kemampuan yang berbeda-beda untuk tumbuh dan beregenerasi dalam kultur jaringan. Oleh karena itu, jenis eksplan yang digunakan untuk masing-masing

kultur berbeda-beda tergantung tujuan pengkulturrannya.

Umur eksplan sangat berpengaruh pada kemampuan eksplan tersebut untuk tumbuh dan beregenerasi. Umumnya, eksplan yang berasal dari jaringan tanaman yang masih muda (juvenil) lebih mudah tumbuh dan beregenerasi dibandingkan dengan jaringan yang telah terdiferensiasi lanjut. Jaringan muda umumnya memiliki sel-sel yang aktif membelah dengan dinding sel yang belum kompleks sehingga lebih mudah dimodifikasi dalam kultur dibandingkan jaringan tua. Oleh karena itu, inisiasi kultur biasanya dilakukan dengan menggunakan pucuk-pucuk muda, kuncup-kuncup muda, hipokotil, atau *inflorescence* yang belum dewasa. Jika eksplan diambil dari tanaman dewasa, rejuvenilisasi tanaman induk melalui pemangkasan atau pemupukan dapat membantu untuk memperoleh eksplan muda agar kultur lebih berhasil (Abas, 2011).

Ukuran eksplan juga mempengaruhi keberhasilan kultur. Eksplan dengan ukuran kecil lebih mudah disterilisasi dan tidak membutuhkan ruang serta media yang banyak; namun, kemampuannya untuk beregenerasi juga lebih kecil sehingga dibutuhkan media yang lebih kompleks untuk pertumbuhan dan regenerasinya. Sebaliknya, semakin besar eksplan, semakin besar kemungkinannya untuk membawa penyakit dan semakin sulit untuk disterilkan dan membutuhkan ruang dan media kultur yang lebih banyak. Ukuran eksplan yang sesuai sangat tergantung dari jenis tanaman yang dikulturkan, teknik, dan tujuan pengkulturrannya (Nurmahyudi, 2012).

Kultur jaringan adalah teknik biakan tanaman dengan sel atau jaringan yang aktif yang dimasukkan dalam tabung kaca atau wadah tembus cahaya hingga dihasilkan bibit yang tidak terbatas dengan tingkat keseragaman tinggi dan sifat induk menurun (Tim Penyusun Kamus PS, 2013). Kultur jaringan dapat diartikan sebagai suatu metode penanaman dan pemeliharaan potongan jaringan yang dipisahkan dari tanaman induknya dan dibiakkan pada medium buatan *in vitro* dalam kondisi aseptik dan terkontrol. Setiap sel dari potongan jaringan tadi yang teradaptasi pada lingkungan akan mampu mengadakan pembelahan dan penambahan plasma sehingga juga mampu berdiferensiasi dan berkembang menjadi tanaman baru (Noerhadi & Toruan, 1975).

Atas dasar ini, jelas bahwa kultur jaringan bukan suatu ilmu, akan tetapi merupakan suatu alat, metode, atau teknik yang kemudian berkembang menjadi teknologi bahkan merupakan suatu orientasi (Noerhadi & Toruan, 1975). Adapun teori yang mendasari kultur jaringan tanaman adalah teori sel dari Schwann dan Schleiden (1847) yang

mengatakan bahwa semua organisme tersusun dari unit-unit biologis terkecil berupa sel yang mampu mengadakan aktivitas hidup seperti metabolisme, pertumbuhan, dan reproduksi. Selanjutnya, atas dasar teori sel ini pula teretus teori totipotensi sel pada tumbuhan. Sel tumbuhan mempunyai informasi genetik yang sama. Ini berarti bahwa sel-sel tumbuhan, apakah sel berasal dari akar, batang, ataupun daun, mampu berkembang membentuk tanaman baru (diferensiasi morfologis).

Setelah perang dunia kedua, perkembangan di bidang kultur jaringan sangat cepat dan banyak dihasilkan pada bidang-bidang penting seperti pertanian, kehutanan, dan hortikultura. Perkembangan semakin cepat dengan ditemukan hormon-hormon tumbuh yaitu auksin (asam indolasetat) dan sitokinin (kinetin) pada tahun 1955 (Pierik, 1987). Kultur jaringan secara luas dinyatakan sebagai penanaman *in vitro* secara aseptik dari seluruh bagian tanaman, apakah itu berupa sel, jaringan, ataupun organ (Biondi & Thorpe, 1981).

Pierik (1987) membedakan tipe-tipe kultur *in vitro* dan membagi tipe kultur dalam enam kelompok:

1. Kultur tanaman utuh: Biji dapat ditaburkan secara *in vitro* sehingga berkembang menjadi kecambah, tanaman muda, dan menjadi tanaman lengkap.
2. Kultur embrio: Embrio terisolasi ditanam setelah dipisahkan dari biji.
3. Kultur organ: Organ yang ditanam secara *in vitro* (Hal ini dapat dibedakan seperti kultur meristem, kultur pucuk, kultur akar, dan kultur antera.)
4. Kultur kalus: Jaringan terdiferensiasi, diisolasi dan ditanam, serta dapat diteruskan untuk dideferensiasi secara *in vitro*.
5. Kultur sel tunggal: Penanaman sel-sel yang diperoleh dari suatu jaringan berupa kultur kalus atau suspensi dengan bantuan enzim atau secara mekanik.
6. Kultur protoplas: Kultur ini diperoleh dari sel melalui penguraian atau penghancuran dinding sel oleh enzim.

Menurut Biondi dan Thorpe (1981), ada tiga prinsip yang terlibat dalam kultur jaringan yaitu:

1. mengisolasi bagian tanaman dari tanaman utuh seperti organ, jaringan, dan sel;
2. memelihara bagian tanaman tadi dalam lingkungan yang cocok dan kondisi kultur yang tepat; dan
3. memelihara dalam kondisi aseptik.

Kultur jaringan mempunyai potensi yang besar dalam propagasi vegetatif spesies tanaman yang secara ekonomis penting dan berpotensi dalam bidang komersial. Selain itu, sistem ini dapat digunakan untuk meneliti masalah dasar seperti fisiologi, biokimia, genetika, dan morfologi yang

berhubungan dengan tanaman (Biondi & Thorpe, 1981).

Menurut Murashige (1974), potensi kultur jaringan dapat diproyeksikan dalam empat bidang yaitu:

1. produksi bahan obat-obatan dan produk alam lainnya;
2. perbaikan sifat genetik tanaman;
3. penyediaan klon bebas penyakit dan pelestarian plasma nutfah; dan
4. multiplikasi klon dari tanaman terpilih.

Potensi kultur jaringan di atas telah diaplikasikan pada sejumlah besar tanaman. Khusus untuk genus *Brassica*, telah diteliti kultur meristem dan multiplikasi pucuk dengan menggunakan eksplan pucuk aksilar *B. oleracea* var. *Gemmifera* dan *B. oleracea* var. *Capitata* (kubis putih) dengan menggunakan eksplan pucuk aksilar serta eksplan meristem apikal dan jaringan daun. Pada eksplan daun terbentuk kalus dan diikuti dengan pembentukan tunas adventif dan akar adventif. Sebaliknya, pada jaringan hipokotil dan kotiledon kecambah dari beberapa genus *Brassica* terjadi secara organogenesis langsung. Contoh, *B. juncea* tunas-tunas dibentuk langsung dari eksplan hipokotil dan epikotil.

Identifikasi masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perbanyak bibit yang sulit menyebabkan sangat sulit untuk menghasilkan bibit brokoli.
2. Jumlah produksi yang sangat rendah mengakibatkan tanaman ini menjadi sulit untuk dicari sementara brokoli sangat baik untuk dikonsumsi.
3. Konsentrasi 2,4-D yang tepat untuk induksi kalus belum diketahui.

Perumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perbanyak tanaman dapat dilakukan dengan menggunakan kultur in vitro.
2. Dengan konsentrasi dan dosis 2,4-D yang tepat maka hipokotil kalus dapat bertumbuh.

Tujuan dari penelitian ini dapat dijabarkan sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui seberapa besar pengaruh zat pengatur tumbuh 2,4-D pada pertumbuhan kalus brokoli; dan
2. Untuk mendapatkan suatu dosis 2,4-D yang tepat untuk pertumbuhan kalus brokoli.

Hipotesis pada penelitian adalah sebagai berikut:

1. Diduga bahwa 2,4-D adalah hormon tumbuh yang tepat untuk mengembangkan kalus brokoli pada media MS sehingga menjadi tanaman yang utuh.
2. Diduga bahwa terdapat suatu dosis 2,4-D yang tepat untuk pertumbuhan kalus brokoli.

Metodologi Penelitian

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Sam Ratulangi selama tiga bulan.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bibit brokoli, akuades steril, alkohol 70%, unsur-unsur hara dan vitamin pembuatan larutan stok dan MS, agar-agar, gula pasir, larutan NaOH, larutan HCl, dan spiritus. Alat-alat yang digunakan adalah *laminar air flow*, erlenmeyer, gelas piala, pengaduk, pipet, pinset, gunting, skalpel, autoklaf, kompor gas, timbangan analitik, botol eksplan, petridish, PH meter digital, bunsen, aluminium foil, dan sendok.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dan Rancangan Acak Kelompok dengan enam perlakuan dan sepuluh ulangan. Perluannya adalah 2,4-D: 0, 1, 2, 3, 4, 5.

1. D₀: 500 ml MS + 0 ml 2,4-D
2. D₁: 500 ml MS + 0,25 ml 2,4-D
3. D₂: 500 ml MS + 0,50 ml 2,4-D
4. D₃: 500 ml MS + 0,75 ml 2,4-D
5. D₄: 500 ml MS + 1,00 ml 2,4-D
6. D₅: 500 ml MS + 1,25 ml 2,4-D

Variabel Pengamatan

Variabel yang diamati dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Induksi terbentuk kalus: Saat kalus mulai terbentuk (khusus pada perlakuan ini minggu sebagai kelompok, digunakan Rancangan Acak Kelompok.)
2. Bentuk kalus: Pengamatan dilakukan seminggu dua kali.
3. Warna kalus: Pengamatan dilakukan seminggu dua kali.
4. Berat kalus: Diketahui pada minggu ke-8 dengan melakukan penimbangan (penimbangan dilakukan dengan menggunakan timbangan analitik digital).

Prosedur Kerja

Sterilisasi alat. Sterilisasi dengan menggunakan autoklaf dilakukan pada botol, erlenmeyer, gelas piala, pengaduk, pinset, gunting, botol eksplan, dan petridish. Setelah selesai sterilisasi, alat-alat disimpan di dalam kulkas.

Pembuatan larutan stok. Unsur hara dan vitamin ditimbang sesuai dengan kebutuhan kemudian dimasukkan ke dalam gelas piala yang berisi 500 ml akuades steril dan diaduk sampai larut. Setelah semua unsur hara dan vitamin larut, akuades steril ditambahkan ke dalam larutan

sampai volumenya 1000 ml. Larutan stok ini kemudian dituangkan ke dalam botol steril dan ditutup dengan aluminium foil.

Pembuatan media MS. Pertama, akuades steril disiapkan sebanyak 250 ml. Sesudah itu, serbuk media MS yang siap pakai dimasukkan dan diaduk sampai larut sehingga warna larutan menjadi agak kekuningan. Gula sebanyak 30 gr dimasukkan ke dalam larutan MS dan diaduk sampai larut kemudian ditambahkan serbuk agar-agar sampai semua larut. Selanjutnya, akuades steril ditambahkan sampai volumenya 1000 ml. Sesudah itu, media yang sudah masak ini ditambahkan PPM (*Plant Preservative Mixture*) dan hormon sesuai dengan kebutuhan kemudian dilakukan pengukuran pH larutan. Ukuran pH larutan harus berada pada kisaran 5.8-6.0 karena pada saat dilakukan sterilisasi, pH larutan akan turun 0.2 sehingga setelah sterilisasi, diharapkan pH larutan akan berkisar 5.6-5.8. Selanjutnya, larutan media dimasukkan ke dalam botol-botol kultur yang sudah disiapkan, lalu botol ditutup dengan rapat menggunakan aluminium foil dan diberi label. Botol-botol kultur yang berisi media dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi.

Penanaman. Eksplan atau bahan tanaman yang digunakan sebagai *plantlet* adalah bibit brokoli. Penanaman dilakukan dalam *laminar air flow*. Alat yang digunakan disterilkan dengan menggunakan spiritus. Pertama, bibit brokoli disterilkan lebih

dahulu dengan menggunakan kloroks kemudian dipotong di atas cawan petri. Daun dan tunas dibuang, sedangkan batang brokoli dipotong-potong dengan ukuran 3-5 mm menggunakan scalpel. Batang brokoli yang sudah dipotong kemudian disayat dan ditanamkan ke dalam botol media. Setelah selesai penanaman, botol media yang sudah berisi *plantlet* dipindahkan di dalam ruangan pertumbuhan atau inkubasi dengan suhu 18 °C.

Analisis data. Analisis data pada variabel bentuk kalus dan warna kalus dilakukan dengan uji ANOVA dan, apabila ada perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan. Data diolah dengan menggunakan program Microsoft Excel dan SPSS.

Hasil dan Pembahasan

Induksi Terbentuk Kalus

Waktu tumbuh kalus terjadi rata-rata pada umur 4 MST. Tabel 2 menunjukkan rata-rata pertumbuhan pada umur 4-7 MST. Jumlah kalus yang terbentuk paling sedikit terdapat pada D₀ yang berbeda dengan D₁, D₂, D₃, D₄, tetapi tidak berbeda dengan D₅. Jumlah kalus yang terbentuk paling sedikit terdapat pada D₁ yang berbeda dengan D₀, D₄, dan D₅, tetapi tidak berbeda dengan D₂ dan D₃.

Tabel 2

Rata-Rata Induksi Terbentuk Kalus pada Berbagai Dosis yang Diberikan

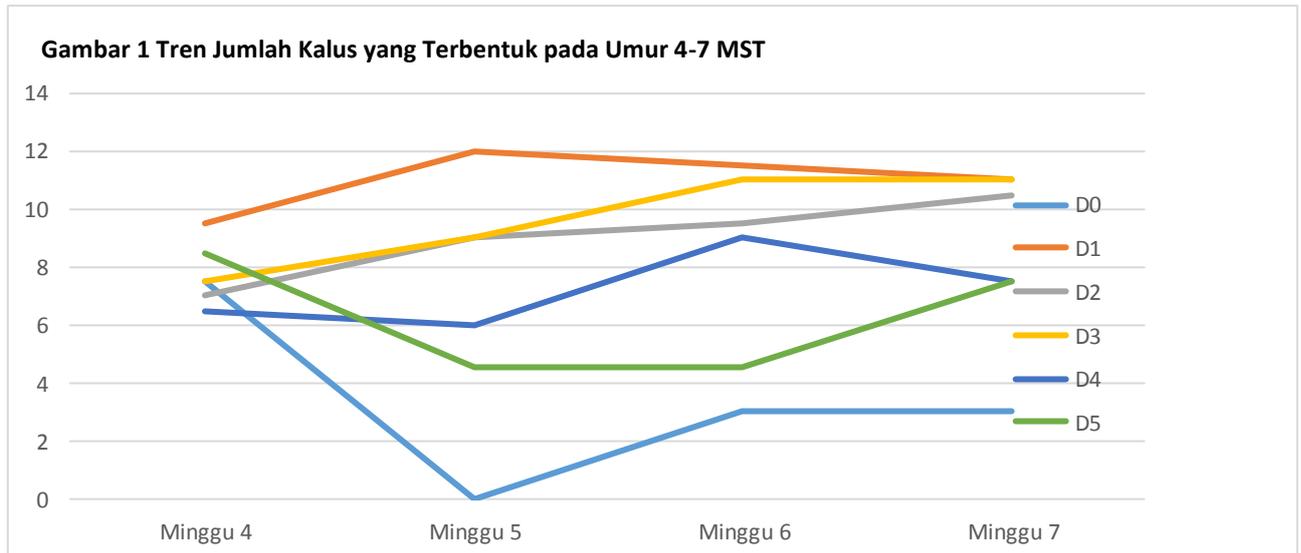
Perlakuan	Minggu IV	Minggu V	Minggu VI	Minggu VII	Total	Rata-rata
D ₀	7.5	2.5	3.0	3.0	16.0	4.0 a
D ₁	9.5	12.5	11.5	11.0	44.0	11.0 d
D ₂	7.0	9.0	9.5	10.5	36.0	9.0 bcd
D ₃	7.5	9.0	11.5	11.0	38.5	9.625 cd
D ₄	6.5	6.0	9.0	7.5	29.0	7.25 bc
D ₅	8.5	4.5	4.5	7.5	25.0	6.25 ab

Ket: Nilai rata-rata perlakuan pada Tabel 2 yang diikuti oleh huruf yang sama dinyatakan tidak berbeda.

Dari analisis data pada Tabel 2, variabel hipokotil kalus menunjukkan adanya perbedaan pertumbuhan kalus. Umur 4 MST merupakan waktu awal pembentukan kalus. Rata-rata semua perlakuan tumbuh ada pada umur 4 MST. Pada umur 4 MST, rata-rata pertumbuhan kalus paling tinggi terdapat pada perlakuan D₁ dengan mencapai 9.5, sedangkan rata-rata pertumbuhan kalus paling rendah terdapat pada perlakuan D₄ yang mencapai 6.5. Pada umur 5 MST, rata-rata pertumbuhan kalus paling tinggi terdapat pada perlakuan D₁ dengan mencapai 12.5, sedangkan rata-rata pertumbuhan kalus paling rendah terdapat pada perlakuan D₀ yang mencapai 2.5. Pada umur 6 MST, rata-rata pertumbuhan kalus paling tinggi terdapat pada perlakuan D₁ dan D₃ yang mencapai 11.5,

sedangkan rata-rata pertumbuhan kalus paling rendah terdapat pada perlakuan D₀ yang mencapai 3.0. Pada umur 7 MST, rata-rata pertumbuhan kalus paling tinggi terdapat pada perlakuan D₁ dan D₃ yang mencapai 11.0, sedangkan rata-rata pertumbuhan kalus paling rendah terdapat pada perlakuan D₀ yang mencapai 3.0.

Hasil uji sidik ragam yang diperoleh menunjukkan ada perbedaan jumlah kalus yang signifikan pada berbagai perlakuan. Dosis yang optimal pada induksi terbentuknya kalus adalah pada perlakuan D₁. D₁ memiliki tren yang baik pada umur 4 MST. Dalam Gambar 1 dapat dilihat tren dari rata-rata hipokotil kalus pada umur 4-7 MST.



Bentuk Kalus

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bentuk kalus tidak rata (Gambar 2). Hal ini sesuai dengan Gunawan (1987) yang mengatakan bahwa bentuk kalus sangat bervariasi, dan setiap perlakuan berbeda-beda bentuknya, namun memiliki

permukaan yang bergerigi atau sangat tidak rata. Bentuk kalus adalah dari luar ke dalam tersusun dari lapisan luar dengan sel yang parah; lapisan kedua terdiri dari lapisan sel dorman; lapisan ketiga dengan sel yang aktif membelah (terdiri dari 1-6 lapis); lapisan tengah yang selnya tidak membelah.

Gambar 2 Bentuk Kalus yang Tumbuh



Menurut Sumadi dan Marianti (2007), hal ini disebabkan oleh adanya siklus sel. Siklus sel adalah pembelahan sel dari satu tahapan ke tahapan pembelahan sel yang lain. Siklus sel sendiri meliputi pertumbuhan massa, duplikasi bahan genetik yang dikenal sebagai interfase, dan pembelahan sel. Interfase meliputi tiga tahap yaitu G1 (periode pertumbuhan), S (sintesis), dan G2 (persiapan pembelahan). Pembelahan sel terdiri dari dua tahap yaitu kariokinesis dan sitokinesis. Tahap kariokinesis (siklus kromosom) merupakan tahap pembagian bahan genetik, sedangkan sitokinesis (siklus sitoplasma) merupakan tahap pembagian sitoplasma.

Warna Kalus

Warna kalus yang terdapat pada penelitian ini adalah putih dan coklat. Warna putih agak kebeningan adalah warna awal setelah tanam. Setelah memasuki 3 MST, eksplan yang belum tumbuh akan membentuk kalus berwarna putih. Setelah eksplan berubah warna menjadi coklat, itu artinya kalus akan bertumbuh. Setelah kalus bertumbuh, ada bagian kalus yang kembali berwarna putih, ada yang tetap berwarna coklat, dan ada juga yang sebagian berwarna putih dan sebagian berwarna coklat. Hal ini disebabkan oleh terbentuknya senyawa fenol dari jaringan dan semakin dewasanya umur kalus (Trimulyono, Solichatun, & Marlina, 2004).

Berat Kalus

Berdasarkan uji ANOVA dan uji beda yang dilakukan dengan uji Jarak Berganda Duncan, maka berat kalus yang ditimbang pada umur 8 MST

dengan menggunakan timbangan digital analitik menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan. Berat kalus dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 3.

Tabel 3

Berat Kalus pada Umur 3 MST

Perlakuan	Berat Kalus (g)
D ₀	.0207 g a
D ₁	.4070 g b
D ₂	.0996 g a
D ₃	.0547 g a
D ₄	.0336 g a
D ₅	.0388 g a

Ket: Nilai rata-rata perlakuan pada Tabel 3 yang diikuti oleh huruf yang sama pada setiap perlakuan dinyatakan tidak berbeda. D₁ berbeda dengan D₂, D₃, D₄, dan D₅.

Analisis ragam pada hasil pengamatan rata-rata per perlakuan induksi hipokotil kalus brokoli yang diberi 2,4-D memberi pengaruh nyata antar perlakuan. D₁ menunjukkan rata-rata berat tertinggi yaitu .4070 g, dan berat terendah adalah D₀ yaitu .0207 g. Berat kalus pada D₁ sangat berbeda dengan perlakuan yang lain, sehingga dosis terbaik pada berat kalus adalah pada perlakuan D₁.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Dosis 2,4-D dapat memberikan pertumbuhan yang signifikan bagi tanaman brokoli yang dilakukan secara kultur jaringan.
2. Dosis 2,4-D yang tepat untuk pertumbuhan kalus brokoli adalah pada perlakuan D₁.

Saran

Untuk mengetahui pengaruh zat pengatur tumbuh 2,4-D pada pertumbuhan kalus brokoli, perlu dilakukan penelitian lanjutan kembali dengan menambah variabel pengamatan (ukuran kalus) dan menambah lamanya waktu penelitian.

Daftar Pustaka

Abas, B. (2011). *Prinsip dasar teknik kultur jaringan*. Bandung, Indonesia: Alfabeta.

Anonim. (2008). *Brokoli, makanan penting bagi diabetes*. Diambil dari <http://travel.kompas.com/read/2008/08/07/17103483/brokoli.makanan.penting.bagi.diabetes>

Badres, F. (2013). *Analisis strategi ketahanan pangan Indonesia dan rencana strategis swasembada beras*. Diambil dari http://www.academia.edu/8345927/ANALISIS_S

TRATEGI_KETAHANAN_PANGAN_INDONESIA_DAN_RENCANA_STRATEGI_SWASEMBADA_BERAS

Biondi, S., & Thorpe, T. A. (1981). *Requirements for a tissue culture facility: Methods and application in agriculture* [Persyaratan-persyaratan untuk fasilitas kultur jaringan: Metode-metode dan aplikasi dalam pertanian]. New York, NY: Academic Press.

Broko. (2014). *Clasification and morphology* [Klasifikasi dan morfologi]. Diambil dari <http://mrbroko.com/en/taxonomy-of-broccoli/>

Dalimartha, S. (1999). *Atlas tumbuhan obat Indonesia*. Jakarta, Indonesia: Trubus Agriwidya.

Fitriani, M. L. (2009). *Budidaya tanaman kubis bunga (Brassica oleraceae var botrytis L.) di kebun benih hortikultura (KBH) Tawangmangu* (Skripsi yang tidak dipublikasikan). Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Indonesia.

George, E. F., & Sherrington, P. D. (1984). *Plant propagation by tissue culture* [Pembiakan tanaman melalui kultur jaringan]. London, England: Exegetics.

Gunawan, L. W. (1987). *Teknik kultur jaringan*. Bogor, Indonesia: IPB Press.

Intan, A. (2008). *Tanaman obat, buah dan sayur sebagai sumber super oksida dismutase (SOD)* [Sebuah blog di web]. Diambil dari <http://biosains-uns.blogspot.com/2008/12/sup-per-oksida-dismutase-sod.html>

Luri, S. (2009). *Faktor-faktor penentu keberhasilan kultur jaringan* [Sebuah blog di web]. Diambil dari <http://kultur-jaringan.blogspot.com/2009/08/faktor-faktor-penentu-keberhasilan.html>

Masley, S. (2009). *Grow it organically* [Menanam secara organik]. Diambil dari <http://www.grow-it-organically.com/broccoli-varieties.html>

Murashige, T. (1974). *Plant propagation through tissue culture* [Pembiakan tanaman melalui kultur jaringan]. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135-166.

- Noerhadi, E., & Toruan, L. N. (1975). *Embryo development and the growth of growing tissue of coconut seedlings in vitro: Problems in palm tree breeding* [Perkembangan embrio dan pertumbuhan jaringan bibit kelapa secara in vitro]. Roma, Italy: FAO.
- Nurmahyudi, R. (2012). *Faktor-faktor yang mempengaruhi kultur jaringan* [Sebuah blog web]. Diambil dari <http://rifki-nurwahyu.blogspot.com/2012/05/faktor-faktor-yang-mempengaruhi-kultur.html>
- Pierik, R. L. M. (1987). *In vitro culture of higher plants* [Kultur in vitro dari tumbuhan-tumbuhan yang tinggi]. Dordrecht, Netherlands: Martinus Nijhoff.
- Riyadi, I. (2014). *Media tumbuh: Penggunaan zat pengatur tumbuh dan bahan-bahan lain*. Materi yang disampaikan pada Pelatihan Kultur Jaringan Tanaman Perkebunan BPBPI, Bogor, Indonesia.
- Rukmana, R. (1995). *Kubis (Seri budidaya)*. Yogyakarta, Indonesia: Kanisius.
- Schwann, T., & Schleyden, M. J. (1847). *Microscopical researches into the accordance in the structure and growth animals and plants* [Penelitian mikroskopikal tentang penyesuaian struktur dan pertumbuhan binatang dan tumbuhan]. London, England: Sydenham Society.
- Sepdian, L. (2009). *Faktor-faktor penentu kultur jaringan*. Diambil dari <http://kultur-jaringan.blogspot.com/2009/08/faktor-faktor-penentu-keberhasilan.html>
- Sumadi., & Marianti, A. (2007). *Biologi sel*. Yogyakarta, Indonesia: Graha Ilmu.
- Tim Penyusun Kamus PS. (2013). *Kamus pertanian umum*. Jakarta, Indonesia: Penebar Swadaya.
- Trimulyono, G., Solichatun., & Marlina, S. D. (2004). Pertumbuhan kalus dan kandungan minyak atsiri nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Bth.) dengan perlakuan asam a-naftalen asetat (NAA) dan kinetin. *Biofarmasi*, 2(1), 9-14.
- Winarsi, H. (2007). *Antioksidan alami dan radikal bebas*. Yogyakarta, Indonesia: Kanisius.