



Pertumbuhan Kalus Rejasa (*Elaeocarpus grandiflorus*) dari Eksplan Tangkai Daun pada Kondisi Gelap

Nur Wijawati[✉], Noor Aini Habibah, Fajar Musafa, Khoirul Mukhtar, Y. Ulung Anggraito, dan Talitha Widiatningrum

Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang

Info Artikel

Diterima: 1 Maret 2019
Disetujui: 30 Maret 2019
Dipublikasikan: 25 April 2019

Keywords:

2,4-dichlorophenoxyacetic acid, callus, dark condition, *Elaeocarpus grandiflorus*, petiolus, picloram, kondisi gelap, kalus, pikloram, tangkai muda..

Abstract

Rejasa (Elaeocarpus grandiflorus) is a Salatiga identity plant which is now rarely found. Rejasa produces secondary metabolites that have the potential as drugs. This study tested the growth of rejasa callus in the medium with the addition of various types and concentrations of growth regulators. The independent variables used were the type and concentration of growth regulators (2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with concentrations of 1.5; 2.5 and 3.5 ppm and Picloram with a concentration of 3.5; 5; and 7.5 ppm). The dependent variable in this study was the growth of callus regeneration (percentage of callus growth, time of callus formation and morphology of callus) observed for five months in dark conditions. Explants used were young petiolus and the medium used in this study was medium Murashige and Skoog (MS). The results showed the lowest percentage of callus induction was found in explants with the addition of Picloram growth regulators with a concentration of 7.5 ppm (14%). Explants maintained in the medium with the addition of Picloram with a concentration of 5 ppm resulted in the highest percentage of callus induction. The time of callus induction is in the range of 10-22 days. The explants with the addition of Picloram growth regulator substances with a concentration of 5 ppm had the best callus induction time, which was 12 days. Most of the callus formed was friable and yellowish. Based on the results of this research, the best medium for callus induction of rejasa in dark conditions was medium with the addition of 5 ppm Picloram.

Abstrak

Rejasa (*Elaeocarpus grandiflorus*) adalah tanaman identitas Salatiga yang mulai jarang ditemukan. Pertumbuhan populasinya memiliki perkembangan yang lambat. Perkembangan generatif melalui perkecambahan biji terjadi dalam tingkat yang sangat rendah. Dalam kelangkaannya, rejasa memiliki khasiat sebagai tanaman obat melalui metabolit sekunder yang dihasilkan. Penelitian ini menguji pertumbuhan kalus rejasa dalam variasi jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh. Variabel bebas yang digunakan adalah jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh (2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) dengan konsentrasi 1,5; 2,5; dan 3,5 ppm serta pikloram dengan konsentrasi 3,5; 5; dan 7,5 ppm). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan kalus rejasa (persentase tumbuh kalus, waktu berkalus, dan morfologi kalus) dalam medium yang diamati selama 5 bulan. Eksplan yang digunakan adalah tangkai muda yang ditanam dalam medium agar Murashige & Skoog dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan pikloram dalam berbagai konsentrasi dan dipelihara dalam kondisi gelap. Hasil penelitian menunjukkan persentase induksi kalus paling rendah terdapat pada eksplan dengan penambahan zat pengatur tumbuh pikloram dengan konsentrasi 7,5 ppm (14%). Eksplan yang dipelihara pada medium dengan penambahan pikloram konsentrasi 5 ppm menghasilkan persentase induksi kalus tertinggi. Waktu induksi kalus berada dalam rentang 10-22 hari. Eksplan dengan penambahan zat pengatur tumbuh pikloram konsentrasi 5 ppm memiliki rerata waktu induksi kalus paling baik yaitu 12 hari. Kalus yang terbentuk dominan berwarna kekuningan dengan jenis meremah. Berdasarkan hasil penelitian, medium yang paling baik untuk induksi kalus dalam kondisi gelap adalah medium MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh pikloram konsentrasi 5 ppm

© 2019 Universitas Negeri Semarang

p-ISSN 2252-6277

e-ISSN 2528-5009

[✉] Alamat korespondensi:

Gedung D11 FMIPA Universitas Negeri Semarang
E-mail: nurwijawatiexo@gmail.com

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki kelimpahan sumber daya hayati yang tersebar di seluruh wilayahnya, namun penurunan jumlah terus terjadi. Sebagai optimalisasi konservasi sumber tanaman biologi, setiap kota menetapkan satu spesies tanaman sebagai identitas di daerah mereka masing-masing (Rahayu *et al.*, 2017). Tanaman rejasa (*Elaeocarpus grandiflorus*) merupakan tanaman identitas kota Salatiga yang memiliki ukuran populasi yang kecil. Di Indonesia dan Malaysia, kulit batang dan daun digunakan sebagai tapel dan ekstraknya diminum sebagai tonik (obat yang menguatkan dan merangsang selera makan, di Jawa digunakan untuk mengatasi sariawan. Di Sumatera, infusa dari parutan kulit kayu diminum untuk demam, dan remukan daun muda, dioleskan di dahi untuk mengobati sakit kepala. Kayu digunakan untuk konstruksi interior ringan dan kayu triplek/lapis. Cocok untuk membuat papan partikel, papan serat dan bubur kertas. Selain itu dimanfaatkan juga untuk reboisasi dan tanaman hias serta sarana upacara agama Hindu (Siswoyo, 2012).

Rejasa merupakan tumbuhan liar dan banyak ditemukan di alam. Tanaman ini dapat digunakan sebagai tanaman obat karena mengandung metabolit sekunder yang berfungsi dalam membantu penyembuhan beberapa penyakit. Kandungan metabolit sekunder yang telah berhasil diisolasi terdiri dari kelompok fenolik, terpenoid, dan alkaloid (Sagala, 2018). Hampir semua bagian/organ rejasa mengandung senyawa bioaktif. Dalam daun rejasa telah berhasil diisolasi tannin, geraniin, dan 3,4,5-trimethoxy geraniin (Shah *et al.*, 2011). Ditemukan pula saponin, flavonoid, polifenol, dan tannin pada daunnya (Vickery & Vickery, 1981); buah mengandung saponin, flavonoid, dan tannin; sedangkan kulit batang mengandung saponin, flavonoid, dan polifenol. Kemudian, ditemukan pula senyawa golongan alkaloid, tannin galat dan sedikit flavonoid dari ekstrak serbuk rejasa (Sagala, 2018).

Berdasarkan survei terdahulu pada awal tahun 2016, tanaman rejasa ini merupakan tanaman identitas Salatiga yang selain belum diketahui banyak orang, juga memiliki ukuran populasi terkecil dari yang lainnya (Rahayu *et al.*, 2017). Berdasar penelitian Rahayu *et al.* (2017), jumlah populasi rejasa hanya 20-30 pohon di seluruh wilayah Salatiga dan Tegal dengan perbanyakan generatif melalui perkecambahan biji terjadi dalam tingkat yang sangat rendah. Penelitian tentang tanaman ini masih sangat jarang dilaporkan (Habibah *et al.*, 2018).

Keberhasilan dari suatu teknik kultur jaringan bergantung pada penggunaan zat pengatur tumbuh (ZPT). Kombinasi antara media dasar dan ZPT akan mengoptimalkan pertumbuhan eksplan, ZPT dapat merangsang ataupun menghambat proses fisiologis tanaman. Zat pengatur tumbuh eksogen yang digunakan pada teknik kultur jaringan adalah auksin dan sitokinin. Efisiensi auksin dan sitokinin dalam induksi kalus tergantung pada usia sumber eksplan dan jenis organ yang digunakan sebagai eksplan (Wilson *et al.*, 1971). Induksi kalus merupakan tahapan penting dalam hibridisasi somatik melalui fusi protoplas untuk menghasilkan tanaman hibrida serta pembentukan embrio dalam embriogenesis somatik (Waryastuti *et al.*, 2017).

Karakteristik pada setiap kalus berbeda-beda, terdapat kalus dengan tekstur lembut (*soft*), dan remah (*friable*), keras dan kompak (Thomas & Davey, 1975). Karakteristik kalus sendiri tergantung pada

komposisi media pengulturan, khususnya zat pengatur tumbuh, dan jenis eksplan. Sehingga dari induksi kalus yang dilakukan melalui kultur jaringan inilah nantinya akan didapatkan metabolit sekunder (Sugiyarto & Kuswandi, 2014).

Potensi pelestarian tanaman rejas dapat dilakukan dengan mengkultur guna menemukan formulasi optimal pertumbuhan kalus rejas. Penelitian dalam keadaan terang telah dilakukan. Untuk itu, penelitian dengan menggunakan kondisi gelap dilakukan guna mengetahui konsentrasi optimal zat pengatur tumbuh dalam pertumbuhan kalus tangkai rejas.

METODE

Tanaman

Eksplan tangkai rejas diperoleh dari bibit berumur 2 tahun yang terdapat pada Rumah Kaca Universitas Negeri Semarang. Tangkai rejas yang digunakan merupakan tangkai muda nomor 3-5 dari pucuk. Variabel bebas yang digunakan adalah jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh. Dua tipe auksin yang digunakan adalah 2,4-D dengan konsentrasi 1,5; 2,5; dan 3,5 ppm, serta pikloram dengan konsentrasi 3,5; 5; dan 7,5 ppm. Variabel terikat yang ada antara lain persentase eksplan yang tumbuh, waktu inisiasi kalus, dan morfologi kalus. Variabel kontrol: pH medium, temperatur ruang penanaman dan tempat inkubasi: 23-25°C

Sterilisasi Permukaan pada Eksplan

Tangkai muda disterilisasi dengan mencuci pada air mengalir dan dilanjutkan dengan perendaman menggunakan fungisida dan bakterisida selama 30 menit. Setelah itu, tangkai dibilas dengan air steril. Tangkai muda tersebut disterilisasi permukaan dengan Clorox 20% selama 10 menit di dalam *laminar air flow* diikuti dengan pembilasan taangkai muda dengan air steril kembali.

Induksi Kalus

Medium yang digunakan sebagai induksi kalus adalah medium MS (Murashige and Skoog, 1962) untuk pertumbuhan eksplan. Pengatur tumbuh tanaman 2,4-D dan pikloram digunakan sebagai penginduksi kalus. Eksplan steril yang sudah dibilas kemudian dikultur ke dalam medium yang telah disiapkan dengan ukuran pemotongan eksplan sepanjang 2 cm. Botol kultur berisi eksplan dibungkus kertas *wrap* dan disimpan dalam ruang inkubasi dengan suhu 24-25°C. Kultur dipelihara selama lima bulan. Pemantauan dilakukan untuk melihat pertumbuhan kalus dan morfologi yang terbentuk. Persentase eksplan yang terbentuk, kecepatan pembentukan kalus, dan morfologi kalus dicatat sebagai data.

Analisis Data dan Uji Statistik

Analisis varian dihitung pada persentase pertumbuhan kalus dan kecepatan pertumbuhan kalus. Perhitungan menggunakan analisis anova dua jalur dengan taraf kesalahan 0.05% dari tiga pengulangan. Data dianalisis dengan sistem SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Pertumbuhan Kalus dan Waktu Inisiasi Kalus

Perlakuan yang diuji menghasilkan rerata persentase tertinggi eksplan yang tumbuh kalus yaitu pada perlakuan pikloram 5 ppm (63%) (Tabel 1). Persentase tersebut tidak berbeda jauh dengan pikloram 3,5 ppm yang memiliki persentase pertumbuhan kalus 62,5%. Hasil konsentrasi lain tidak memiliki jarak cukup jauh dengan interaksi eksplan 2,4-D 1,5 ppm sebesar 60%; 2,4-D 3,5 ppm sebesar 55%; dan 2,4-D 2,5 ppm sebesar 50%. Dapat dilihat pada Gambar 1 bahwa persentase pertumbuhan kalus terendah dihasilkan oleh perlakuan pikloram 7,5 ppm dengan persentase 14%. Eksplan yang mengalami pertumbuhan kalus ditandai dengan munculnya jaringan kecil berwarna terang pada tangkai muda eksplan. Perlakuan 2,4-D menghasilkan daya hidup yang tinggi karena auksin endogen yang terdapat pada jaringan eksplan dapat berpengaruh dan menyebabkan sel terus aktif membelah (Waryastuti *et al.*, 2017).

Eksplan yang mati ditandai dengan pencoklatan dan gosong pada permukaannya. Perlakuan dengan tingkat kematian lebih tinggi adalah pikloram 7,5 ppm. Perlakuan sebelumnya dengan pikloram 3,5 ppm, serta 5 ppm memiliki nilai tumbuh kalus yang relatif tinggi di atas 60% (berturut-turut 62,5% dan 63%) yang berbanding terbalik pada pikloram 7,5 ppm dengan persentase tumbuh kalus sebesar 14% (Gambar 2). Hal ini karena terjadi banyak kontaminasi jamur pada eksplan tangkai muda rejas pada perlakuan pikloram 7,5 ppm dengan tingkat kematian sebesar 86% (Tabel 2).

Waktu Inisiasi Kalus

Munculnya kalus pada eksplan ditandai dengan pembengkakan atau munculnya jaringan berwarna putih bening seperti titik-titik air/lendir pada bekas irisan eksplan dan sayatan di permukaan tangkai eksplan yang kemudian berkembang menjadi bulatan-bulatan kecil yang jelas dan agregat kalus. Pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D dan pikloram pada eksplan memberikan variasi waktu inisiasi yang nyata terhadap kalus.

Perlakuan pikloram 5 ppm menghasilkan rerata waktu inisiasi kalus paling cepat dengan waktu selama 12 HIS (Tabel 1). Perlakuan dengan penambahan pikloram 7,5 ppm tidak memiliki perbedaan jauh dengan waktu inisiasi 13 HSI. Perlakuan 2,4-D 2,5 ppm dan 3,5 ppm yang memiliki perbedaan yang tidak terlalu signifikan pada persentase tumbuh kalus, memiliki waktu inisiasi kalus yang sama dengan rerata lama waktu 16,25 HSI. Disusul dengan perlakuan pikloram 3,5 ppm dan 2,4-D 1,5 ppm dengan lama waktu berturut-turut 18 HSI dan 19 HSI. Perlakuan 2,4-D memiliki waktu inisiasi kalus paling lama dengan 19 HSI.

Pada penelitian ini penggunaan pikloram lebih baik dibandingkan 2,4-D. Hal ini terlihat dari rerata waktu inisiasi kalus dan pada dua perlakuan pikloram 3,5 ppm dan 5 ppm dengan persentase tumbuh kalus tertinggi, mengabaikan pada kontaminasi pada pikloram 7,5 ppm. Pikloram memiliki respon pembentukan kalus 0,21 kali lebih cepat dibandingkan 2,4-D, namun untuk rerata tumbuh kalus, 2,4-D memiliki persentase tumbuh kalus 15% lebih tinggi daripada pada perlakuan pikloram. Pemilihan ZPT yang tepat dapat menentukan keberhasilan persentase tumbuh kalus dan waktu inisiasi kalus.

Berdasarkan data pada Tabel 1 terlihat bahwa tangkai muda rejas lebih responsif apabila dikultur pada media pikloram 5 ppm dibandingkan yang lain. Rerata tumbuh kalus pada perlakuan pikloram 5 ppm sebesar 63% dengan waktu inisiasi kalus 12 HSI.

Tabel 1. Waktu Inisiasi Kalus serta Persentase Tumbuh Kalus pada Berbagai ZPT dan Konsentrasi

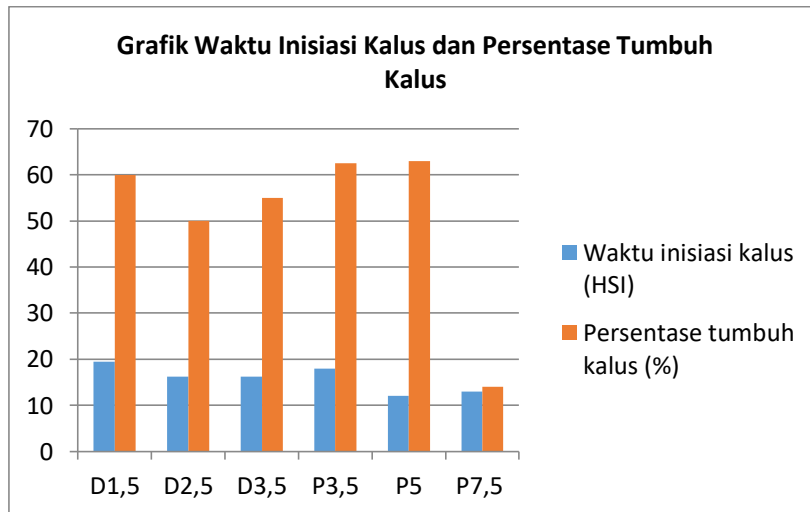
ZPT dan konsentrasi	Waktu inisiasi kalus (HSI)	Persentase tumbuh kalus (%)
D1,5	19.5	60
D2,5	16.25	50
D3,5	16.25	55
P3,5	18	62.5
P5	12	63
P7,5	13	14

Keterangan: HSI = hari setelah inokulasi

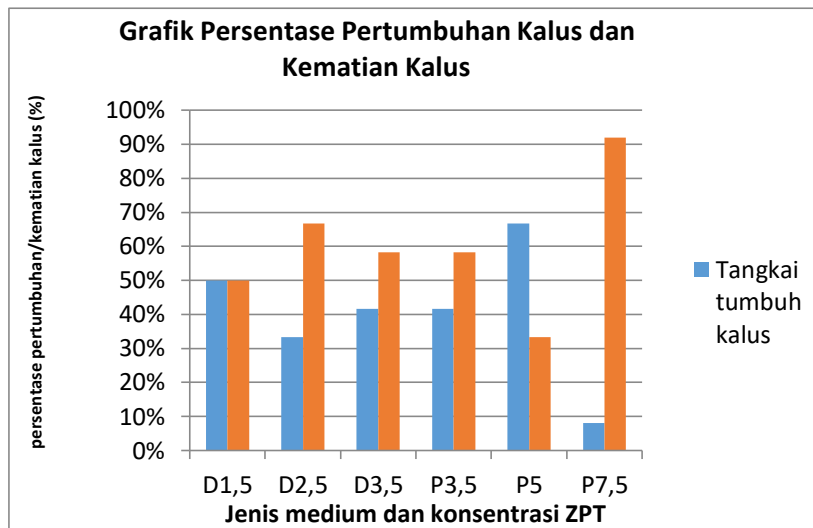
Tabel 2. Persentase tangkai tumbuh kalus dan kalus mati pada berbagai ZPT dan konsentrasi pada 20 MSI

ZPT dan konsentrasi (ppm)	Tangkai tumbuh kalus (%)	Kalus mati (%)
D1,5	50	50
D2,5	33,3	66,7
D3,5	41,7	58,3
P3,5	41,7	58,3
P5	66,7	33,3
P7,5	8	92

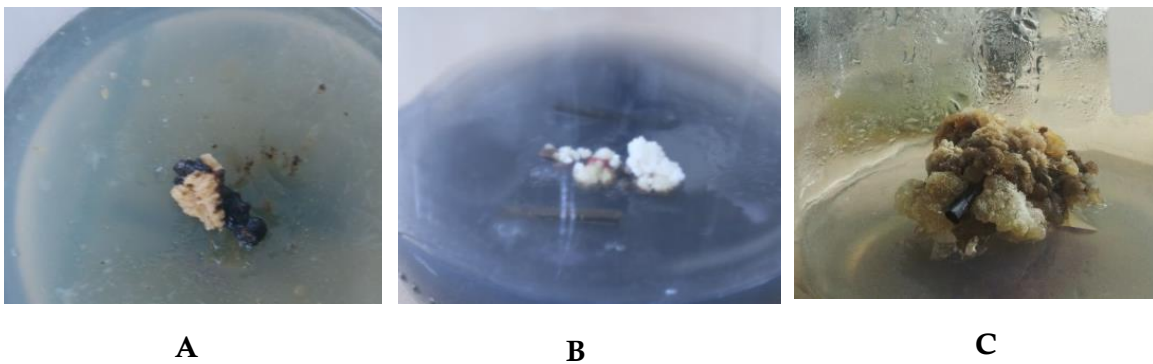
Keterangan: MSI = minggu setelah inokulasi



Gambar 1. Grafik rerata waktu tumbuh kalus dan persentase tumbuh kalus selama 20 MSI



Gambar 2. Grafik rerata persentase pertumbuhan kalus dan kematian kalus selama 20 MSI



Gambar 3. Morfologi kalus rejasa (A) kalus yang tumbuh pada perlakuan Pikloram 3,5 ppm dengan kalus meremah warna kekuningan (B) kalus yang tumbuh pada perlakuan 2,4-D 3,5 ppm dengan kalus meremah warna putih (C) kalus yang tumbuh pada perlakuan pikloram 5 ppm dengan kalus meremah warna hijau kekuningan.

Morfologi Kalus Rejasa

Berdasarkan tekstur dan komposisi selnya, kalus dapat dibedakan menjadi kalus yang kompak dan remah. Kalus kompak mempunyai tekstur padat dan keras, yang tersusun dari sel-sel kecil yang sangat rapat, sedangkan kalus remah mempunyai tekstur lunak dan tersusun dari sel-sel dengan ruang antar sel yang banyak. Perbedaan struktur kalus menimbulkan adanya perbedaan kemampuan memproduksi metabolit sekunder (Sugiyarta & Kuswandi, 2014). Struktur kalus dalam penelitian ini ada dua jenis, yaitu remah dan kompak. Berdasarkan warna, kalus tangkai muda rejasa memiliki warna yang berbeda-beda, yaitu putih, kuning, coklat, dan hitam. Warna kalus yang terbentuk rereta merupakan kombinasi beberapa warna dari keempat warna tersebut.

Penampakan kalus pada semua perlakuan, awalnya berwarna putih bening hingga 5 MSI, kemudian memasuki 6 MSI warna kalus berubah warna menjadi kuning kecoklatan. Hal ini disebabkan adanya metabolisme senyawa fenol yang berlebihan pada jaringan yang mulai terbentuk. Warna kalus yang berwarna kekuningan terdapat pada hampir semua perlakuan yang terbentuk kalus dan sering terangsang akibat sterilisasi eksplan (Indah & Ermavitalini, 2013). Penambahan ZPT dalam media kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan

dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami flavonoid (Bekti *et al.*, 2003). Hal serupa juga disampaikan oleh (Pierik, 1987), yang menyatakan bahwa 2,4-D dapat menyebabkan elongasi sel, pembengkakan jaringan, dan pembentukan kalus.

Penambahan pikloram sebagai ZPT memberi warna kekuningan dan tekstur meremah pada hampir seluruh eksplan pada semua konsentrasi. Pada perlakuan pikloram 3,5 ppm tekstur kalus yang dihasilkan meremah dengan warna kekuningan (Gambar 3a). Hal ini tidak jauh berbeda dengan perlakuan pada kalus pikloram 5 ppm dengan tekstur meremah warna hijau kekuningan. Pertumbuhan kalus yang dialami perlakuan pikloram 5 ppm mengalami pengembangan rerata sampai 3 kali lebih banyak daripada perlakuan yang lainnya (Gambar 3c). Perlakuan pikloram 7,5 ppm juga memberi warna kekuningan dengan tekstur meremah.

Pada penambahan 2,4-D sebagai ZPT, pembentukan kalus memiliki taktur meremah dan kompak pada setiap konsentrasinya. Perlakuan 2,4-D 1,5 ppm didominasi tekstur kalus dengan tekstur kompak dengan warna kuning kecoklatan. Tekstur meremah rerata berada pada perlakuan 2,4-D 2,5 ppm dan 3,5 ppm. Pada perlakuan 2,4-D 2,5 ppm dijumpai warna putih pada kalus, namun warna tersebut tidak dominan (Gambar 3b). Dominasi warna kalus pada perlakuan 2,4-D 2,5 ppm adalah kuning kehitaman. Selanjutnya pada perlakuan 2,4-D 3,5 ppm rerata memiliki tekstur meremah dengan warna kecoklatan. Berdasarkan data hasil penelitian, rerata kalus yang dihasilkan memiliki tekstur meremah dengan warna kekuningan.

SIMPULAN

Kalus tangkai muda rejas memberikan persentase tumbuh kalus (63%) dan waktu tumbuh kalus (12 HSI) paling optimal pada perlakuan pikloram 5 ppm. Rerata waktu tumbuh kalus optimal dengan penambahan zat pengatur tumbuh pikloram dibandingkan dengan 2,4-D. Kemudian, pertumbuhan kalus memiliki tekstur meremah dengan warna kekuningan pada hampir setiap perlakuan. Perlakuan dengan pikloram berbagai konsentrasi memberikan tekstur meremah dan warna kekuningan pada keseluruhan kalus yang terbentuk.

DAFTAR PUSTAKA

- Bekti, R., Solichatun, E. & Anggarwulan. (2003). Pengaruh 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*, 1(1), 1-6.
- Habibah, N.A., Widiatningrum, T., Anggraito, Y.U., Rahayu, E.S., Mukhtar, K., Wijawati, N., Musafa, F. (2018). Growth of *Elaeocarpus grandiflorus* callus cultures in MS medium with various concentrations of growth regulators. *International Conference on Mathematics, Science and Education 2018 (ICMSE2018)*. 984-1.
- Indah, P.N. & Ermavitalini, D. (2013). Induksi kalus daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(1), 23-37.
- Pierik, R.M.L. (1987). *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers.

- Rahayu, E.S., Dewi, N.K. & Bodijantoro, F.P.M.H. (2017). Profile of *Elaeocarpus grandiflorus* and *Ziziphus mauritiana* as identity plants of Salatiga and Tegal towns, Central Java Province, Indonesia. *International Conference on Mathematics, Science and Education 2017 (ICMSE2017)*. 983-1.
- Sagala, D. (2018). Deskripsi, metabolit sekunder dan kegunaan anyang-anyang (*Elaeocarpus grandiflorus* J.E. Smith). INA-Rxiv. *February 10. osf.io/preprints/inarxiv/3unv8*.
- Shah, G., Singh, P.S., Mann, A.S., Shri, R. (2011). Scientific basis for the chemical constituent and therapeutic use of *Elaeocarpus* species: A Review. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 1(1), 267-278.
- Siswoyo, P.D.M. (2012). Reintroduksi tanaman langka di Hutan Lindung Batukaru, Tabanan, Bali. *Udayana Mengabdi*, 11(2), 80-85.
- Sugiyarto, L. & Kuswandi, P.C. (2014). Induksi kalus daun binahong (*Anredera cordifolia* L.) dalam upaya pengembangan tanaman obat tradisional. *Jurnal Sains Dasar*, 3(1), 55-60.
- Thomas, E. & Davey, M.R. (1975). *From Single Cell to Plant*. London: Wykehan Publisher Ltd.
- Vickery, M.L. & Vickery, B. (1981). Secondary plant metabolism. The Mac Milan Press.
- [WARINTEK] Warung informasi Teknologi Kementerian Riset dan Teknologi. 2014. *Elaeocarpus grandiflorus* J.E. Smith. *On line at* <http://www.warintek.ristek.go.id/pangan_kesehatan/tanaman_obat/depkes/3-011.pdf> [Diakses 20 Maret 2014].
- Waryastuti, D.E., Setyobudi, L. & Wardiyati, T. (2017). Pengaruh tingkat konsentrasi 2,4-D dan BAP pada media MS terhadap induksi kalus embrionik temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Jurnal Produksi Tanaman*, 5(1), 140-149.
- Wilson, S.B., King, P.J. and Street, H.E. (1971). Studies on the growth in culture of plant cells. XII. A versatile system for the large-scale batch or continuous culture of plant cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 22(70), 177-207.
- Yelnititis. (2012). Pembentukan kalus remah dari eksplan daun ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.) [Friable callus induction from leaf explant of ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.)]. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 6(3), 181-194.