

PENGARUH KOMBINASI BAP (6-Benzylaminopurine) DAN 2,4-D (Dichlorophenoxy acetic acid) UNTUK PEMBENTUKAN KALUS TEBU (*Saccharum officinarum* L.) MELALUI METODE THIN CELL LAYER

EFFECT OF COMBINATION OF BAP (6-Benzylaminopurine) AND 2,4-D (Dichlorophenoxy acetic acid) ON CALLUS FORMATION OF SUGARCANE (*Saccharum officinarum* L.) THROUGH THIN CELL LAYER METHOD

Velia Nurul Hidayah¹ dan Parawita Dewanti^{2*}

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember,

²Fakultas Pertanian, Universitas Jember, Jember, Indonesia

Email : parawita.faperta@unej.ac.id

* Corresponding Author, Diterima: 16 Okt. 2021, Direvisi: 22 Des. 2021, Disetujui: 29 Jan. 2022

ABSTRACT

Sugarcane is one of commercial crops in Indonesia. Tissue culture method has been used widely for sugarcane propagation. Thin Cell Layer (TCL) was one of the tissue culture techniques for sugarcane that used 1-2 mm explants taken from pieces of plant organs. The aim of this study was to obtain the best combination media to propagate sugarcane from in vitro explant by using TCL technique. This research was conducted at the CDAST, University of Jember using a Completely Randomized Design (CRD) with two factors, namely the concentration of BAP (0 ppm and 0,5 ppm) and the concentration of 2,4-D (3 ppm and 3,5 ppm). There were 4 treatment combinations with 3 replications, there were 12 experimental units. The data obtained will then be analyzed using the Analysis of Variance (ANOVA) and continued with the Duncan Multiple Range Test (DMRT) at a 95% confidence level. The best results in sugarcane micro propagation through TCL method were in the A1B2 treatment (0 ppm BAP and 3,5 ppm 2,4-D) with an average callus formation time of 3 days and an average callus formation percentage of 93%.

Key words: 2,4-D, BAP, sugarcane, Thin Cell Layer

ABSTRAK

Tanaman tebu merupakan salah satu tanaman perkebunan komersial di Indonesia. Kultur jaringan telah banyak dilakukan untuk memperbanyak tanaman tebu.. *Thin Cell Layer* (TCL) merupakan salah satu teknik dari kultur jaringan untuk tanaman tebu yang menggunakan eksplan berukuran 1-2 mm yang diambil dari potongan organ tanaman. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan kombinasi media untuk memperbanyak tebu dari eksplan *in vitro* menggunakan teknik TCL. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan CDAST Universitas Jember dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor yaitu konsentrasi BAP (0 ppm dan 0,5 ppm) dan konsentrasi 2,4-D (3 ppm dan 3,5 ppm). Terdapat 4 kombinasi perlakuan dengan 3 kali ulangan sehingga terdapat 12 satuan percobaan. Data yang diperoleh selanjutnya akan di analisis dengan menggunakan *Analisis Of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan Duncan Multiple Range Test (DMRT) pada tingkat kepercayaan 95%. Hasil yang terbaik dalam mikropropagasi tebu melalui metode *Thin Cell Layer* yakni pada perlakuan A1B2 (0 ppm BAP dan 3,5 ppm 2,4-D) dengan rerata waktu pembentukan kalus selama 3 hari dan rerata persentase pembentukan kalus 93%.

Kata kunci: 2,4-D, BAP, tebu, Thin Cell Layer

1. PENDAHULUAN

Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan salah satu tanaman perkebunan yang banyak di budidayakan di Indonesia. Perbanyakan tebu dapat dilakukan dengan sistem konvensional menggunakan bagal. Bagal merupakan bibit tebu yang berasal dari batang tebu dengan 2-3 mata tunas yang belum tumbuh (Thomas, 1992), namun menurut Azizi *et al.* (2017) perbanyakan tebu dengan menggunakan bagal memiliki kekurangan yakni memerlukan lahan yang luas, memerlukan tanaman induk dan tenaga kerja yang banyak, waktu tanam dipengaruhi musim, dan mudah terserang penyakit, selain dapat dilakukan dengan menggunakan bagal perbanyakan tebu dapat dilakukan melalui kultur jaringan. Salah satu teknik kultur jaringan yang saat ini banyak digunakan yaitu melalui somatik embriogenesis. Teknik somatik embriogenesis merupakan suatu proses sel tubuh tanaman yang dapat berkembang menjadi individu baru melalui tahap perkembangan embrio tanpa melalui penyatuan gamet. Menurut Purnamaningsih (2002) keuntungan dari somatik embriogenesis yakni mampu menghasilkan jumlah propagula yang tidak terbatas dalam waktu yang singkat.

Menurut Saadat & Hennerty (2002) faktor yang mempengaruhi tingkat multiplikasi tunas *in vitro* yakni komposisi media, jenis hormon, jenis eksplan dan ukuran eksplan yang digunakan. Metode *Thin Cell Layer* (TCL) merupakan metode perbanyakan tanaman secara mikro dengan menggunakan eksplan <1-2 mm yang dihasilkan dari potongan organ. Organ yang digunakan seperti pada bagian batang (epikotil/hipokotil), akar, daun, organ bunga (stigma dan ovary), kotiledon dan embrio (da Silva, 2008). Penggunaan metode TCL dapat diterapkan pada somatik embriogenesis untuk tujuan mendapatkan embrio somatik yang tinggi dan memiliki tingkat regenerasi yang tinggi.

Kelebihan dari metode TCL yakni mampu menghasilkan planlet yang lebih banyak, selain itu juga efisien dalam penggunaan eksplan, dengan metode TCL hanya memerlukan eksplan yang sedikit yang diambil dari tanaman *in vitro*, dibandingkan dengan metode kultur jaringan biasanya yang membutuhkan eksplan dari lapang. Pemanfaatan TCL lainnya juga dapat memungkinkan isolasi sel dari sel spesifik atau ada lapisan spesifik yang diinginkan, karena melalui potongan yang sangat tipis sehingga diharapkan terdapat sifat-sifat tertentu dari adanya potongan tipis tersebut. Hasil dari metode TCL dapat

digunakan sebagai bahan transformasi gen. Efisiensi transformasi dapat ditingkatkan dari penggunaan TCL dikarenakan dengan penggunaan eksplan yang sangat tipis akan lebih kecil terjadi adanya kimera. Secara jauh lagi penggunaan TCL dapat digunakan sebagai proses pembungaan secara *in-vitro* Metode TCL banyak digunakan pada tanaman monokotil dan dikotil yang memiliki nilai jual yang tinggi. Metode TCL sering digunakan pada tanaman anggrek, tanaman obat dan tembakau, namun baru-baru ini metode TCL juga digunakan tanaman sayur-sayuran dan pangan (Dobranszki & da Silva, 2015).

Penggunaan zat pengatur tumbuh dalam kultur jaringan merupakan faktor yang berpengaruh terhadap pembentukan embrio somatik dan planlet pada tanaman tebu (Sholeha *et al.*, 2015). Penambahan zat pengatur tumbuh kombinasi auksin dan sitokinin yakni 2,4-D dan BAP mampu mempengaruhi proses pembentukan embrio somatik paling baik (Naz *et al.*, 2008) Menurut Jalaja *et al* (2008) penggunaan 2,4-D dengan konsentrasi 3-4 mgL⁻¹ paling efektif untuk menginduksi pembentukan kalus tanaman tebu. Hal tersebut diperkuat oleh penelitian Widuri (2010) Penggunaan 2,4-D pada waktu induksi kalus dengan konsentrasi 3 mgL⁻¹ mampu mempercepat waktu induksi kalus dengan waktu 15 hari. Menurut Rao (2015) Penggunaan kombinasi 2,4-D dan BAP dengan konsentrasi 2,4-D 3,5 mgL⁻¹ + 0,5 mgL⁻¹ BAP merupakan konsentrasi terbaik dalam menginduksi kalus tebu. Oleh karena itu, dapat dilakukan uji konsentrasi yang sesuai pada penggunaan zat pengatur tumbuh BAP dan 2,4-D melalui metode *Thin Cell Layer*, untuk perbanyakan tebu menjadi lebih efisien dan dapat menjadi sebuah inovasi baru dalam perbanyakan tanaman tebu melalui kultur jaringan

2. BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Bioteknologi, CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember mulai Bulan Februari 2020 sampai April 2021.

Alat yang digunakan standart kultur jaringan dan *Laminar Air Flow* (LAF). Bahan tanam yang digunakan yakni tunas basal invitro tebu varietas bulu lawang, media dasar MS (*Murashige & Skoog*), agar kultur jaringan, casein hidrolisat, L-prolin, L-Glutamine, Arginin, Sukrosa, PVP, Alkohol 70%, Alkohohl 96% , 2,4-D dan BAP.

Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor yaitu faktor pertama konsentrasi BAP (0 ppm dan 0,5 ppm) dan faktor kedua yakni konsentrasi 2,4-D (3 ppm dan 3,5 ppm).

Terdapat 4 kombinasi perlakuan yang masing-masing kombinasi perlakuan diulang 3 kali, sehingga terdapat 12 satuan percobaan dengan tiap ulangan terdapat 10 eksplan. Kombinasi yang didapatkan yakni A1B1 (BAP 0 ppm dan 2,4-D 3 ppm), A1B2 (BAP 0 ppm dan 2,4-D 3,5 ppm), A2B1 (BAP 0,5 ppm dan 2,4-D 3 ppm), A2B2 (BAP 0,5 ppm dan 2,4-D 3,5 ppm).

Bahan tanam yang digunakan yakni tunas basal *in-vitro* tebu varietas bulu lawang, tunas basal diambil dari plantlet yang berumur satu bulan. Plantlet tebu kemudian dilakukan subkultur dengan media MS 0 untuk mendapatkan tunas baru. Tanaman yang memenuhi kriteria diambil dari botol kultur kemudian dibersihkan dari sisa media didalam LAF, setelah itu dilakukan pemotongan pada bagian basalnya dengan ukuran 0,5 cm dari pangkal dengan menggunakan pisau *scalpel*. Pemotongan eksplan sekitar 1-2 mm. Satu batang tebu hanya bisa diambil dengan 3 irisan saja. Gambar 1 merupakan bahan tanam yang digunakan dalam penelitian.

Induksi kalus dilakukan pada media dengan komposisi media MS + Vitamin Pyridoxine + Thiamine + Casein Hidrolisate + Agar + Sukrosa. Eksplan untuk tahapan induksi kalus diambil pada bagian basal tanaman tebu, yaitu merupakan bagian bawah batang yang berbatasan langsung dengan akar. Bagian ini dipilih karena memiliki banyak sel meristematik yang memiliki kemampuan tumbuh lebih baik dibandingkan bagian atas batang. Induksi kalus dilakukan selama 17 hari pada kondisi ruang gelap dengan suhu 23°C-25°C. Indikator keberhasilan eksplan yakni dengan dicirikan warna putih kekuningan dan mengkilat atau *glossy* dengan tekstur remah, selanjutnya kalus akan dipindah pada media proliferasi.

Variabel pengamatan yang diamati yaitu waktu pembengkakan eksplan, persentase pembentukan kalus, dan morfologi kalus hasil induksi kalus.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

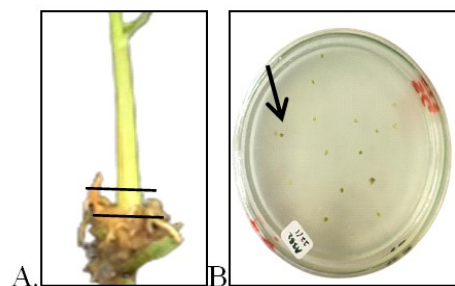
Berdasarkan hasil Anova diketahui bahwa faktor tunggal BAP, faktor tunggal 2,4-D dan intraksi antara BAP dan 2,4-D berpengaruh sangat nyata terhadap waktu pembengkakan eksplan dan persentase pembentukan kalus tebu. Gambar 2 merupakan grafik dari waktu pembengkakan eksplan.

3.1 Waktu Pembengkakan Eksplan (Hari)

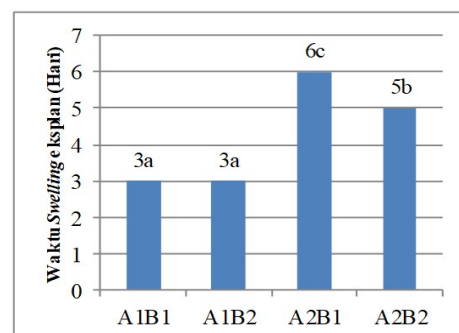
Hasil analisis menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi BAP 0 ppm dan 2,4-D 3,5 ppm pada perlakuan A1B2 dan konsentrasi BAP 0 ppm dan 2,4-D 3 ppm pada perlakuan A1B1 memberikan pengaruh dengan rerata tercepat dalam waktu pembengkakan eksplan yakni dengan rerata waktu 3 hari, sedangkan penambahan BAP 0,5 ppm memberikan pengaruh waktu pembengkakan lebih lambat yakni selama 5-6 hari.

3.2 Persentase Pembentukan Kalus

Hasil analisis (Gambar 3) menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi BAP 0 ppm dan 2,4-D 3,5 ppm pada perlakuan A1B2 memberikan persentase terbaik dalam pembentukan kalus dengan rerata persentase 93%, sedangkan dengan adanya penambahan BAP 0,5 ppm memberikan respon terbaik dalam persentase pembentukan kalus



Gambar 1. Bahan Tanam dan Hasil Induksi. (A) Bagian basal yang digunakan induksi dibagian tanda hitam, (B) Contoh hasil induksi pada hari 0.



Gambar 2. Waktu Pembengkakan Eksplan

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan hasil yang berbeda tidak nyata pada Uji Jarak Berganda Duncan (UJD) dengan taraf nyata 5%.

tebu yakni sebesar 70% yang ditujukan pada perlakuan A2B2 dengan konsentrasi penambahan BAP 0,5 ppm dan 2,4-D 3,5 ppm.

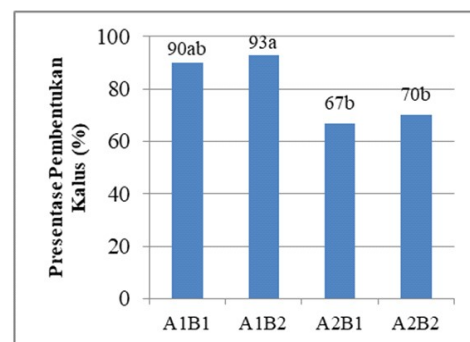
3.3 Morfologi Kalus

Hasil penelitian pada pengamatan morfologi kalus tebu terdapat 2 jenis morfologi kalus yaitu, kalus yang bersifat embriogenik dan kalus yang bersifat non embriogenik. Kalus yang bersifat embriogenik dicirikan karakteristik kalus remah (*friable*), *glossy* (mengkilat) dan berwarna putih kekuningan dapat dilihat pada Gambar 4A, sedangkan kalus yang bersifat non embriogenik memiliki ciri kalus kompak, kalus tampak basah dan berwarna coklat hingga kehitaman yang menandakan bahwasannya kalus mengalami *browning* sehingga tidak dapat berdiferensiasi ke tahap selanjutnya dapat dilihat pada Gambar 4B. Pengamatan morfologi kalus berlangsung selama 17 hari yakni selama waktu induksi kalus. Sedangkan untuk Gambar 5A merupakan morfologi dari penanaman eksplan yang dilakukan secara melintang yakni memiliki karakteristik volume kalus lebih kecil dibanding dengan penanaman eksplan yang dilakukan secara membujur dapat dilihat pada Gambar 5B, namun penanaman eksplan secara melintang lebih cepat merespon dalam pembentukan somatic embriogenesis dibandingkan dengan penanaman yang dilakukan secara membujur dikarenakan penanaman yang dilakukan secara melintang bagian eksplan yang terlukai terkena langsung oleh media sehingga memudahkan proses penyerapan proses penyerapan nutrisi pada media, sedangkan penanaman yang dilakukan secara membujur eksplan yang terkena media hanya bagian sisi samping kiri dan kanan saja sehingga memperlambat proses penyerapan nutrisi pada media.

Tahap awal sebelum pembentukan kalus diawali terlebih dahulu dengan adanya pembengkakan (pembengkakan) atau munculnya jaringan putih bening seperti titik-titik air atau lendir pada bekas sayatan pada permukaan eksplan yang akan berkembang membentuk bulatan kecil dan bergagregat jelas (Waryastuti *et al.*, 2017). Respon pembengkakan pada eksplan berbeda-beda sesuai dengan penambahan zat pengatur tumbuh yang digunakan pada media tanam. Penambahan zat pengatur tumbuh pada media merupakan faktor yang paling penting dalam pembelahan sel, morfogenesis eksplan dan dapat menentukan keberhasilan dalam proses diferensiasi sel pada

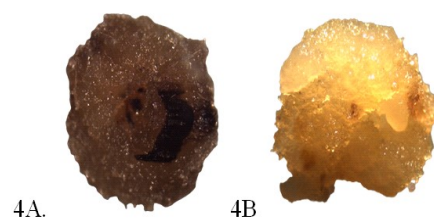
jaringan tanaman yang dikulturkan (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D tunggal memiliki respon pembengkakan lebih cepat dibandingkan dengan pemberian zat pengatur tumbuh kombinasi BAP dan 2,4-D. Penggunaan 2,4-D tunggal mampu merespon eksplan untuk membengkak selama 3 hari saja, sedangkan untuk penambahan zat pengatur tumbuh kombinasi BAP dan 2,4-D mampu merespon eksplan basal untuk membengkak selama 5-6 hari.

Berdasarkan hasil penelitian dari 4 media yang digunakan, media yang paling baik untuk induksi

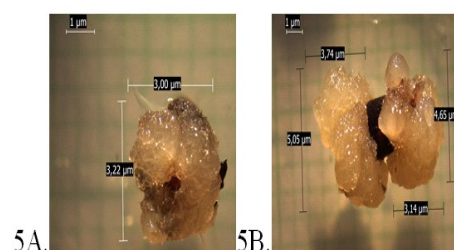


Gambar 3. Persentase Pembentukan Kalus

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan hasil yang berbeda tidak nyata pada Uji Jarak Berganda Duncan (UJD) dengan taraf nyata 5%.



Gambar 4. Morfologi Kalus Embriogenik (A) dan Non Embriogenik(B)



Gambar 5. Morfologi Kalus Melintang (A) dan Membujur (B)

kalus tebu yakni pada media A1B2 dengan konsentrasi 2,4-D 3,5 mg/l dengan rata-rata waktu pembengkakan 3 hari dengan persentase pembentukan kalus 93%. Kalus muncul dari bagian eksplan yang telah dilukai karena bagian tersebut menyerap lebih banyak nutrisi. Penambahan 2,4-D yang tinggi akan semakin mempercepat proses induksi kalus, penambahan 2,4-D yang tinggi akan mempermudah proses difusi ke dalam jaringan tanaman pada area yang telah dilukai sehingga 2,4-D yang telah ditambahkan akan membantu auksin endogen menstimulasi dan merangsang pembelahan sel terutama pada area yang telah dilukai (Yelnitis, 2021). Auksin dalam hal ini 2,4-D mampu meningkatkan pembentukan embrio somatik setelah induksi kalus embriogenik (Almeida *et al.*, 2018). Penambahan 2,4-D juga dapat meningkatkan jumlah sel embriogenik yang tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol tanpa 2,4-D pada saat proliferasi dengan menggunakan media cair (Alfian *et al.*, 2019).

Penggunaan zat pengatur tumbuh golongan auksin terutama pada 2,4-D banyak digunakan dalam menginduksi kalus dikarenakan dapat mengaktifkan ekspresi gen *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase* yang dapat mendukung terjadinya somatik embriogenesis (Gill *et al.*, 2004). 2,4-D dapat digunakan sebagai ZPT dan herbesida yang mampu mengaktifkan hormon ABA dan etilen. Peningkatan hormon ABA mampu menginduksi ekspresi protein LEA (*Leaf embriogenesis Abundant*). LEA merupakan protein yang bertanggung jawab terhadap perkembangan somatik embriogenesis (Grossmann, 2000). Selain itu, 2,4-D bersifat stabil dan tidak mudah rusak oleh cahaya saat sterilisasi serta dapat merangsang pemecahan dan pembesaran sel sehingga baik digunakan untuk induksi (Maulana *et al.*, 2019).

Menurut Chitra *et al.* (2005), tinggi rendahnya persentase pembentukan kalus embriogenik dapat dipengaruhi oleh konsentrasi hormon auksin sintetik yang berfungsi untuk menginduksi kalus embriogenik. Penggunaan 2,4-D dengan konsentrasi lebih dari 4 ppm mampu menyebabkan persentase kalus EC (Embriogenik) yang rendah dan dapat menurunkan kemampuan induksi kalus pada proses embriogenesis tebu. (Maulidya *et al.*, 2020). Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D maka persentase kalus yang dihasilkan semakin tinggi pula, dapat dilihat pada perlakuan A1B2 (BAP 0 ppm dan 2,4-D 3,5 ppm) pembentukan kalus 93%. Sedangkan untuk perlakuan kombinasi 2,4-D dan BAP hasil

yang paling baik yakni pada perlakuan A2B2 dengan konsentrasi BAP 0,5 mg/l dan 2,4-D 3,5 mg/l dengan rata-rata waktu pembengkakan eksplan 5 hari dengan rata-rata pembentukan kalus sebesar 70%.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan dengan pemberian BAP yang tinggi maka pembentukan kalus semakin lama. Hal ini dikarenakan ketidakseimbangan hormon endogen dan eksogen terutama BAP yang diberikan. Menurut Abidin (1985) zat pengatur tumbuh dalam kondisi tertentu dengan tinggi rendahnya konsentrasi ZPT maupun sifat ZPT itu sendiri mampu menghambat kerja hormon endogen dan mengganggu pertumbuhan dan perkembangan sel karena sitokinin endogen dalam tanaman sudah cukup tinggi. Menurut George (1993) pembentukan kalus pada beberapa tanaman khususnya pada tanaman monokotil, hanya membutuhkan sitokinin eksogen dalam konsentrasi yang sangat rendah (0-0,1 mg/l). Ariati *et al.* (2012) menyebutkan konsentrasi ZPT yang diperlukan tergantung dari jenis eksplan, genotipe, kondisi kultur serta jenis ZPT yang digunakan.

Pengamatan morfologi menjadi salah satu faktor penting dalam penelitian ini. Morfologi kalus dapat dibedakan menjadi 2 jenis yaitu kalus embriogenik dan non embriogenik. Karakteristik morfologi kalus embriogenik memiliki ciri kalus remah (*friable*), mengkilat, dan berwarna putih kekuningan. Sebaliknya non embriogenik yakni kalus kompak, basah dan berwarna coklat hingga kehitaman yang menandakan kalus tidak berkembang ke tahap somatik embriogenesis. Adanya peristiwa *browning* menghambat penyerapan nutrisi oleh eksplan, hal tersebut menyebabkan penurunan proses pengkalusan. Selama proses pemotongan batang basal zat fenolik yang sebagian besar berada di vakuola akan tercampur dengan isi dari plastida dan organel-organel lainnya, oleh karena itu warna gelap akan muncul. Peristiwa tersebut akan menghambat aktivitas enzim dan dapat menyebabkan kematian pada eksplan (Gill *et al.*, 2004).

4. KESIMPULAN

Perlakuan A1B2 (BAP 0 ppm dan 2,4-D 3,5 ppm) memberikan respon terbaik dalam mikropropagasi tebu melalui metode *Thin Cell Layer* dengan rerata waktu pembengkakan eksplan tercepat selama 3 hari dan rerata persentase pembentukan kalus tertinggi 93%.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh Hibah Pendukung IDB Batch 2 tahun 2020 dengan nomer kontrak 2598/UN25.3/LT/2020 dari Dr. Ir Parawita Dewanti M.P, Prof Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc dan Wahyu Indra Duwi Fanata, SP. M.Sc., Ph.D Universitas Jember.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1985. *Dasar-Dasar Pengetahuan tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Angkasa Bandung. Bandung.
- Alfian, F. Narulita, N. N. Afdhoria, P. Dewanti, D. P. Restanto, & B. Sugiharto. 2019. Liquid Culture of Somatic Embryogenesis Cell Proliferation of Sugarcane (*Saccharum officinarum*). *International Journal of Agriculture and Biology*. 21 (4): 905-910.
- Almeida, R. O., S. D. A. Silva, & L. F. Dutra. 2018. Induction of Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of sugarcane cv. RB925345 from somatic embryos. *Scientia Agraria Paranaensis*. 17 (2): 165–169.
- Ariati, S. N., Waenati, Muslimin, & I. N. Suwastika. 2012. Induksi Kalus Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) pada Media MS dengan Penambahan 2,4-D, BAP dan Air Kelapa. *Natural Science: Journal of Science and Technology*. 1 (1): 78–84.
- Azizi, A. A. Aini, I. Roostika T, & D. Efendi. 2017. Multiplikasi Tunas In Vitro Berdasarkan Jenis Eksplan pada Enam Genotipe Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Industrial Crops Research Journal*. 23 (2): 90–97.
- Chitra, M., K. P. Martin, C. Sunandakumari, & P. V. Madhusoodanan. 2005. Somatic Embryogenesis, Encapsulation, and Plant Regeneration of *Rotula aquatica*., a Rare Rhoeophytic Woody Medicinal Plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 41 (1): 28–31.
- da Silva, JA. T. 2008. Plant Thin Cell Layers: Challenging the Concept. *International Journal of Plant Developmental Biology*. 2 (1): 79–81.
- Dobranszki, J., & J. A. T. da Silva. 2015. Adventitious Shoot Regeneration from Leaf Thin Cell Layers in Apple. *Scientia Horticulturae*. 127 (3): 460–463.
- George, E. F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1: The technology (No. Ed. 2) Exegetics Limited.
- Gill, N. K., R. Gill, & S. S. Gosal. 2004. Factors Enhancing Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Indian Journal of Biotechnology. 3 : 119–123.
- Grossmann, K. 2000. Mode of Action of Auxin Herbicides: a New Ending to a Long, Drawn Out Story. *Trends in Plant Science*. 5 (12): 502–508.
- Jalaja, N. C., D. Neelamathi, & T. V. Screenivasan. 2008. Micropropagation for Quality Seed Production in Sugarcane in Asia and the Pacific. FAO/APCoAB/APAARI.
- Maulana, R., D. P. Restanto, & Slameto. 2019. Pengaruh Konsentrasi 2,4- Dichlorophenoxy-acetic Acid (2,4-D) terhadap Induksi Kalus Tanaman Sorgum. *Jurnal Bioindustri (Journal of Bioindustry)*. 1 (2): 138–148.
- Maulidya, A. U. K., B. Sugiharto, P. Dewanti, & T. Handoyo. 2020. Expression of Somatic Embryogenesis-related Genes in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 23 : 207–204.
- Naz, S., A. Ali., & A. Siddique. 2008. Somatic Embryogenesis and Planlet Formation in Different Varieties of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) HSF-243 and HSF-245. *Sarhad Journal of Agriculture*. 24 (4): 593–598.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Bul. Agrobio* 5 (2): 51–58.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos, & V. M. Loyola-Vargas. 2006. Embryo Production through Somatic Embryogenesis Can be Used to Study Cell Differentiation in Plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86 : 285–301.
- Rao, A. S. 2015. Callus Induction and Organogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) var 93v297. *International Letters of Natural Sciences*. 48: 14–22.
- Saadat, Y. A. & M.J. Hennerty. 2002. Factors Affecting the Shoot Multiplication of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Horticulturae*. 95 (3): 251–260.
- Sholeha, W., B. Sugiharto, D. Setyati, & P. Dewanti. 2015. Induksi Somatik Embriogenesis Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) dan Kinetin pada Eksplan Gulungan Daun Muda

- Tanaman Tebu. *Ilmu Dasar*. 16 (1): 17–22.
- Thomas, A. N. S. 1992. Tanaman Obat Tradisional II. Kanisius. Yogyakarta. Hal. 9–10.
- Waryastuti, D. E., L. Setyobudi, & T. Wardiyati. 2017. Pengaruh Tingkat Konsentrasi 2,4-D dan BAP pada Media MS terhadap Induksi Kalus Embriogenik Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Doctoral dissertation*. Universitas Brawijaya.
- Widuri, L. I. 2010. Induksi Somatik Embriogenesis Tanaman Tebu Transgenik Bebas Virus (*Saccharum officinarum* L.) Sut Event 02 Menggunakan 2,4-D dan BAP. *Skripsi*. Agroteknologi. Universitas Jember.
- Yelnititis. 2021. Pembentukan Embrio Somatik dari Eksplan Daun Ramin, Spesies Tanaman Langka. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*. 6 (1): 129–135.