

INDUKSI DAN PERTUMBUHAN KALUS TANAMAN STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bertoni M.) DENGAN PERBEDAAN KONSENTRASI PEG (*Polyethylene Glycol*) PADA KONDISI PENCAHAYAAN SECARA *IN VITRO*

In Vitro Callus Induction and Growth of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni M.) with Difference Concentrations of PEG (Polyethylene Glycol) and Light Conditions

Mohamad Ana Syabana¹⁾, Pipit Marianingsih²⁾, Nuniek Hermita¹⁾, Iim Rohimah³⁾

¹⁾Dosen Jurusan Agroekoteknologi Faperta Untirta;

²⁾Dosen Jurusan Pendidikan Biologi FKIP Untirta;

³⁾Alumni Jurusan Agroekoteknologi Faperta Untirta

Email: anasyabana@untirta.ac.id

Abstract

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert. M.) is known as a natural non-caloric sweetener. This plants contain glycoside such steviosida type, mainly on the leave contain sweetness level between 200-300 cane sugar but the calorie is very low. This research was aimed to determine difference effects of PEG (Polyethylene Glycol) concentrations and the light conditions on *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bert. M.) callus induction in vitro. This research was conducted from April to June 2016 at Biotechnology Laboratory Faculty of Agriculture, Sultan Ageng Tirtayasa University. This research used a completely randomized design (CRD), which consisted of two factors with three replications. Concentrations of PEG as first factor consisted of four levels (0 mg/L, 5 mg/L, 15 mg/L, and 25 mg/L). Light conditions as second factor consisted of two levels (Dark and Light). The results showed that the concentrations of PEG (Polyethylene Glycol) did not significantly effect the time of callus appearance and diameter of callus on 4, 5 and 6 weeks after planting. Dark condition was the best conditions for callus induction of stevia. The texture of callus was compact on all treatments and the callus dominant color produced is golden brown.

Keywords : *Stevia callus*, *PEG (Polyethylene Glycol)*, *Light conditions*

PENDAHULUAN

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) dikenal sebagai tanaman pemanis alami non-kalori yang berasal dari dataran tinggi Paraguay di Amerika Selatan. *Stevia* termasuk famili *Asteraceae*, yang termasuk tanaman tahunan dengan habitus semi herba

yang tingginya mencapai dua meter (Putri, 2015). Tanaman ini mengandung glikosida jenis steviosida terutama pada daun yang mengandung tingkat kemanisan antara 200 – 300 gula tebu, tetapi kalorinya sangat rendah (Rukmana, 2003). Kelebihan dari gula stevia antara lain adalah bersifat *non-*

karsinogenik dan rendah kalori. Sebagai pemanis, *steviosida* aman digunakan dan cocok untuk penderita diabetes karena secara klinis dapat mempertahankan kadar gula dalam darah.

Pada umumnya tanaman *stevia* di perbanyak dengan menggunakan stek batang. Namun demikian jumlah stek yang dihasilkan pertanaman sangat sedikit, sehingga menjadi kendala dalam hal penyediaan bibit bila ditanam dalam skala luas. Disamping itu penggunaan benih sebagai bahan tanam dalam budidaya *stevia* dalam skala luas masih sulit karena daya kecambahnya masih rendah sehingga banyak yang tidak tumbuh (Mishra *et al*, 2010). Selain masalah tersebut, hal lain yang menjadi kendala dalam budidaya *stevia* adalah ketersediaan air. Menurut Sumaryono dan Shinta (Tanpa tahun) tanaman *stevia* umumnya sensitiv terhadap kekeringan khususnya pada saat awal pertumbuhan.

Salah satu solusi untuk mengatasi permasalahan rendahnya ketersediaan bibit adalah dengan menggunakan perbanyak tanaman teknik *in vitro* atau kultur jaringan. Kelebihan menggunakan teknik ini yaitu dapat menghasilkan bahan tanam unggul secara massal dan cepat (Putri, 2015). Keuntungan lain yang terdapat pada teknik kultur jaringan yaitu produksi metabolit sekunder dapat dilakukan sepanjang tahun tanpa dipengaruhi oleh cuaca.

Teknik kultur jaringan juga dapat digunakan untuk melakukan simulasi cekaman kekeringan yaitu dengan menurunkan tekanan potensial air pada media menggunakan *Polyethilen Glycol* (PEG). Setiap tanaman memiliki respon yang berbeda terhadap kondisi cekaman kekeringan. Penelitian Zulhilmi *et al* (2012) menunjukkan bahwa perlakuan PEG 5% sudah dapat menurunkan bobot basah kalus gatang secara signifikan selama 3 MST. Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Gupta *et al* (2015) menunjukkan bahwa

perlakuan PEG 10% dapat menyebabkan terjadinya penurunan pada parameter bobot basah, bobot kering dan indek pertumbuhan kalus stevia. Penelitian yang dilakukan oleh Laila dan Savitri (2014) pada tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bert. M.) menyatakan bahwa penambahan PEG 15 dan 25 mg/L yang dikombinasikan dengan 2,4 D 1-3 mg/L dapat membuat perbedaan yang signifikan pada bobot basah saat 4 MST dibandingkan pada konsentrasi PEG lebih rendah.

Selain PEG, kondisi lingkungan yang menentukan keberhasilan kultur jaringan meliputi cahaya, suhu dan komponen atmosfer. Keberadaan cahaya menentukan terbentuknya kalus. Beberapa tanaman memerlukan cahaya dalam induksi kalus, ada yang menggunakan fotoperiode tertentu dan ada pula yang tidak memerlukan cahaya (gelap total). Pada perbanyakan tanaman secara *in vitro*, kultur umumnya diinkubasikan pada ruang penyimpanan dengan penyinaran kecuali

pada teknik perbanyakan yang diawali dengan pertumbuhan kalus. Penelitian terhadap pertumbuhan kalus dan pembentukan senyawa alkaloid kinolina pada *Cinchona ledgeriana* dipengaruhi oleh umur kalus dan ada tidaknya cahaya (Pudyastuti *et al*, 2012).

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian tentang induksi kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bert. M.) dengan perbedaan konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) dan kondisi pencahayaan.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Juni 2016 di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Sultan Ageng Tirtayasa, Serang Banten.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), autoklaf, oven, rak kultur jaringan, kompor gas, panci, spatula, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, erlenmeyer, botol

kultur, *hotplate*, skalpel, lampu bunsen, corong, cawan petri, pipet, suntikan, gelas ukur, gelas jam, sendok, botol semprot, pinset, polybag kecil ukuran 15,5 x 4,5, penggaris, gunting, kamera dan alat tulis.

Sedangkan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah eksplan stevia steril koleksi Laboratorium Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Untirta, larutan stok media MS, PEG, 2,4-D, BAP, PVP, PPM, gula pasir, agar-agar, alkohol 70%, alkohol 96%, korek api, spirtus, aquades steril, pemutih pakaian, deterjen, alumunium foil, kertas pH indikator, plastik wrap, tisyu dan label.

Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 faktor dengan 3 ulangan. Faktor pertama menggunakan konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) terdiri dari 4 taraf, yaitu :

1. $P_1 = 0$ mg/L
2. $P_2 = 5$ mg/L
3. $P_3 = 15$ mg/L
4. $P_4 = 25$ mg/L

Faktor kedua menggunakan kondisi cahaya terdiri dari dua taraf, yaitu :

1. $K_1 =$ Gelap
2. $K_2 =$ Terang.

Kalus di induksi dengan cara menumbuhkan bagian daun eksplan stevia pada media MS. Setelah itu dilakukan pengamatan terhadap waktu muncul kalus, diameter kalus, bobot basah,

HASIL DAN PEMBAHASAN

Selama penelitian berlangsung, kendala yang dialami adalah eksplan yang ditanam mengalami (*stagnasi*). *Stagnasi* merupakan suatu keadaan eksplan dimana eksplan tersebut tidak mati tetapi tidak tumbuh dari mulai tanam sampai kurun waktu tertentu. Pada penelitian ini, *stagnasi* pada eksplan diduga karena faktor dari media yang digunakan. Hal ini sejalan dengan pendapat Arimarsetiowati (2012), yang menyatakan bahwa media dapat menjadi penyebab terjadinya *stagnasi* pertumbuhan, karena dari kondisi media

suatu sel dapat atau tidak terdorong melakukan proses pembelahan. Selain media, faktor lain yang menyebabkan *stagnasi* pada eksplan diduga yaitu umur eksplan yang digunakan. Menurut Zulkarnain (2009), kondisi fisiologis eksplan memiliki peranan penting bagi keberhasilan teknik kultur jaringan. Eksplan yang mengalami *stagnasi* sampai akhir pengamatan tidak menunjukkan pertumbuhan kalus. Menurut Smith (2013) tidak terbentuknya kalus dikarenakan sel-sel eksplan tidak kompeten untuk

mengekspresikan totipotensi sehingga tidak terjadi induksi kalus.

Selain itu, kendala lain yang muncul adalah (*browning*). *Browning* merupakan peristiwa pencoklatan pada eksplan atau tanaman. Warna kecoklatan pada kalus (*browning*) ini akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat berlebihan, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan. Menurut Syabana *et al* (2015), senyawa fenol yang berlebihan akan bersifat racun yang dapat merusak jaringan eksplan dan akhirnya menyebabkan kematian pada eksplan.

Waktu Muncul Kalus (HST)

Tabel 1. Pengaruh perbedaan konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) dan kondisi cahaya secara *in vitro* pada waktu muncul kalus (Hari Setelah Tanam)

Cahaya	PEG (<i>Polyethylene Glycol</i>)				Rerata
	P ₁ (0 mg/L)	P ₂ (5 mg/L)	P ₃ (15 mg/L)	P ₄ (25 mg/L)	
K ₁ (Gelap)	14,00	14,00	12,00	14,00	13,58 _b
K ₂ (Terang)	-	21,00	14,00	14,00	16,33 _a
Rerata	14,00	16,80	13,00	14,00	

Keterangan :

- Angka-angka yang didampingi oleh huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata pada uji lanjut DMRT taraf 5%.
- (-) Tidak muncul kalus.

Dari data hasil sidik ragam Tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan kondisi cahaya (K) berpengaruh nyata terhadap

waktu muncul kalus tanaman stevia.

Sedangkan perlakuan konsentrasi PEG (P) tidak memberikan pengaruh nyata terhadap

waktu muncul kalus tanaman stevia. Begitu juga dengan interaksi antara PEG dengan kondisi cahaya (P*K) menunjukkan tidak ada interaksi terhadap waktu muncul kalus tanaman stevia.

Tabel 1 menunjukkan bahwa waktu muncul kalus dengan perlakuan kondisi cahaya gelap (K₁) cenderung lebih cepat dan berpengaruh nyata dengan nilai rata-rata 13,58 HST, sedangkan pada perlakuan kondisi cahaya terang (K₂) cenderung lambat dengan nilai rata-rata 16,33 HST. Hal ini di duga bahwa cahaya dapat menghambat pertumbuhan kalus. Santoso

dan Nursandi (2004) menyatakan bahwa cahaya berpengaruh pada metabolisme sel dan efektivitas kerja ZPT dalam media. Sinar atau cahaya dapat merusak auksin dan dapat pula menyebabkan pemindahan auksin ke jurusan yang menjauhi sinar, metode kultur jaringan dalam kondisi gelap merupakan salah satu cara untuk mengefektifkan kerja auksin sehingga dapat mempercepat pembentukan kalus. Dalam hal ini auksin yang dimaksud yaitu auksin endogen maupun eksogen yang diserap dari media.

Diameter Kalus (MST)

Tabel 2. Pengaruh perbedaan konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) dan kondisi cahaya secara *in vitro* pada diameter kalus (Minggu Setelah Tanam)

Cahaya	PEG (<i>Polyethylene Glycol</i>)				Rerata
	P ₁ (0 mg/L)	P ₂ (5 mg/L)	P ₃ (15 mg/L)	P ₄ (25 mg/L)	
4 MST					
K ₁ (Gelap)	0,62	0,55	0,60	0,61	0,60 _a
K ₂ (Terang)	0,00	0,00	0,00	0,23	0,06 _b
Rerata	0,31	0,28	0,30	0,42	
5 MST					
K ₁ (Gelap)	0,72	0,65	0,65	0,66	0,67 _a
K ₂ (Terang)	0,00	0,00	0,00	0,69	0,17 _b
Rerata	0,36	0,33	0,33	0,67	
6 MST					
K ₁ (Gelap)	0,85	0,80	0,70	0,73	0,77 _a
K ₂ (Terang)	0,00	0,55	0,30	0,70	0,39 _b
Rerata	0,43	0,68	0,50	0,72	

Keterangan :

- Angka-angka yang didampingi oleh huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata pada uji lanjut DMRT taraf 5%.

Diameter kalus diamati pada minggu ke-4, ke-5 dan ke-6 karena pada minggu-minggu tersebut rata-rata kalus tumbuh paling banyak dibandingkan dengan minggu ke-1, ke-2 dan ke-3. Berdasarkan data sidik ragam Tabel 2 menunjukkan bahwa perlakuan kondisi cahaya (K) berpengaruh nyata terhadap diameter kalus tanaman stevia pada minggu ke-4, ke-5 dan ke-6. Sedangkan perlakuan konsentrasi PEG (P) dan interaksi antara konsentrasi PEG dan kondisi cahaya (P*K) menunjukkan tidak berpengaruh nyata terhadap diameter kalus tanaman stevia.

Tabel 2 menunjukkan bahwa kondisi cahaya gelap (K_1) memberikan pengaruh nyata pada pengamatan diameter kalus yang dilakukan pada minggu ke-4, ke-5 dan ke-6 dengan nilai rata-rata diameter kalus berturut-turut yaitu 0,60 cm, 0,67 cm dan 0,77 cm. Sedangkan pada kondisi cahaya terang (K_2) rata-rata diameter kalus berturut-turut dari minggu ke-4, ke-5 dan ke-6 yaitu

0,06 cm, 0,17 cm dan 0,39 cm. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa kondisi cahaya gelap lebih menstimulasi pertumbuhan kalus dibandingkan dengan kondisi cahaya terang. Hal ini diduga berkaitan dengan produksi hormon auksin yang lebih distimulasi pada kondisi gelap dibanding terang.

Hasil pengamatan pada diameter kalus (Tabel 2), menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi PEG 25 mg/L menghasilkan diameter kalus paling besar dibandingkan dengan tanpa pemberian PEG 0 mg/L. Menurut Arianti (2015) Penambahan beberapa konsentrasi PEG dalam media kultur memiliki pengaruh terhadap kuantitas kalus, karena PEG menciptakan cekaman kekeringan yang menyebabkan kalus tanaman mengalami osmosis yang dicirikan dengan dihasilkannya poliamin. Poliamin memiliki peran yang besar pada pembelahan sel dan perkembangan organ. Diduga dengan

semakin tingginya senyawa poliamin, maka pembelahan sel pada kalus juga semakin besar. Selain itu data tersebut menunjukkan

bahwa perlakuan PEG sampai 25 mg/L belum membuat kalus stevia tercekam kekeringan.

Warna Kalus

Tabel 3. Pengaruh perbedaan konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) dan kondisi cahaya secara *in vitro* pada warna kalus (6 Minggu Setelah Tanam)

PEG (<i>Polyethylene Glycol</i>)	Kondisi Cahaya					
	K ₁ (Gelap)			K ₂ (Terang)		
	1	2	3	1	2	3
P ₁ (0 mg/L)	KK	KK	KK	-	-	-
P ₂ (5 mg/L)	KK	B	B	B	B	-
P ₃ (15 mg/L)	HK	KK	HK	-	HK	HK
P ₄ (25 mg/L)	B	KK	KK	B	KK	-

Keterangan : P : Konsentrasi PEG
 K : Kondisi Cahaya
 HK : Hijau Keputihan(2,5GY 8/4)
 KK : Kuning Kecoklatan (5Y 6/8)
 B : *Browning*
 - : Tidak muncul kalus

Pengamatan pada warna kalus dilakukan pada akhir pengamatan yaitu pada 6 minggu setelah tanam, penentuan warna kalus ditetapkan berdasarkan pedoman *Munsell Color Chart For Plant Tissue*. Hasil pengamatan yang telah dilakukan secara *visual*, warna kalus yang dihasilkan yaitu hijau keputihan (HK) dan kuning kecoklatan (KK).

Pada penelitian ini, warna kalus yang dominan adalah kuning kecoklatan dari semua perlakuan. Warna kuning kecoklatan

pada kalus disebabkan oleh cekaman osmosis dari PEG dalam media tumbuh. Menurut Ariningsih *et al* (2003), perubahan warna pada kalus juga tergantung pada media perkembangannya. Cekaman yang diberikan oleh media pada kalus menginduksi kalus akan berubah warna lebih tua dari kalus segar. Dengan demikian semakin tua perubahan warna kalus pada suatu media menunjukkan adanya aktifitas biosintesis metabolit sekunder lebih tinggi dan lebih besar.

Berdasarkan penelitian Zulhilmi *et al* (2012) pada kalus batang didapatkan hasil dari segi warna, kalus yang diberi perlakuan PEG 0-3% berwarna kuning kecoklatan

pada bagian bawah dan putih pada bagian atas. Bagian putih menunjukkan sel-sel yang baru terbentuk. Sedangkan kalus yang diberi perlakuan PEG 4-5% berwarna coklat.

Tekstur Kalus

Tabel 4. Pengaruh perbedaan konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) dan kondisi cahaya secara *in vitro* pada tekstur kalus (6 MST)

Cahaya	PEG (<i>Polyethylene Glycol</i>)											
	P ₁			P ₂			P ₃			P ₄		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
K ₁	k	k	k	K	k	k	k	k	k	k	k	k
K ₂	-	-	-	K	k	-	-	k	k	-	k	k

Keterangan : P : Konsentrasi PEG
 K : Kondisi Cahaya
 k : Kompak (Susunan sel yang rapat, padat)
 - : Tidak muncul kalus

Pengamatan pada tekstur kalus dilakukan secara *visual* dan pengamatan ini dilakukan pada akhir pengamatan setelah eksplan berumur 6 MST (minggu setelah tanam). Eksplan yang ditanam dalam berbagai konsentrasi PEG dan kondisi cahaya setelah berumur 6 minggu menunjukkan kalus yang terbentuk yaitu

kompak dari semua perlakuan. Kalus bertekstur kompak yang terbentuk diduga karena adanya cekaman dari PEG. Kalus yang mengalami cekaman osmosis akan bertekstur kompak akibat dari senyawa metabolit sekunder yang dikeluarkan tanaman tersebut sebagai bentuk perlindungan diri.

Persentase Ekplan Berkalus (%)

Tabel 5. Pengaruh perbedaan konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) dan kondisi cahaya secara *in vitro* pada persentase eksplan berkalus (%)

Perlakuan	∑ Eksplan Ditanam	∑ Eksplan Berkalus	% Eksplan Tumbuh Kalus
P ₁ K ₁	3	3	100%
P ₂ K ₁	3	3	100%

P ₃ K ₁	3	3	100%
P ₄ K ₁	3	3	100%
P ₁ K ₂	3	0	0%
P ₂ K ₂	3	2	66,67%
P ₃ K ₂	3	2	66,67%
P ₄ K ₂	3	2	66,67%
Total	24	18	75%

Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan pada persentase eksplan berkalus, maka dapat diketahui persentase eksplan berkalus dari semua perlakuan yaitu 75%. Dan Persentase eksplan berkalus yang paling tinggi yaitu eksplan yang ditanam pada media perlakuan P₁K₁ (0 mg/L PEG + kondisi gelap), P₂K₁ (5 mg/L PEG + kondisi gelap), P₃K₁ (15 mg/L PEG + kondisi gelap) dan P₄K₁ (25 mg/L PEG + kondisi gelap) dengan rata-rata persentase eksplan berkalus yaitu 100%. Kemudian persentase eksplan berkalus selanjutnya yaitu eksplan yang ditanam pada media P₂K₂ (5 mg/L PEG + kondisi terang), P₃K₂ (15 mg/L PEG + kondisi terang), dan P₄K₂ (25 mg/L PEG + kondisi terang) dengan persentase eksplan berkalus yaitu 66,67%. Dan persentase

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat di ambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap parameter waktu muncul kalus (HST) dan diameter kalus (MST) pada minggu ke-4, ke-5 dan ke-6.
2. Kondisi cahaya berpengaruh nyata terhadap parameter waktu muncul kalus (HST) dan diameter kalus pada minggu ke-4, ke-5 dan ke-6. Kondisi gelap merupakan kondisi terbaik untuk induksi kalus stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni M.) pada parameter waktu

eksplan berkalus yang paling rendah yaitu eksplan yang ditanam pada media perlakuan P₁K₂ (0 mg/L PEG + kondisi terang) dengan rata-rata persentase eksplan berkalus 0%, dimana pada perlakuan ini tidak terjadi pertumbuhan kalus, eksplan daun hanya menggulung hingga hari terakhir pengamatan yaitu hari ke-42. Menurut Laila dan Savitri (2014), kemampuan kalus dapat bertahan hidup pada media selektif PEG tergantung dari konsentrasi PEG, jenis tanaman dan lamanya kalus mengalami tekanan seleksi dalam media yang diberi tekanan osmosis. Bila tanaman dihadapkan pada kondisi kering maka tanaman mengubah distribusi asimilat baru untuk mendukung penyerapan air dari media ketanaman (Zulhilmi *et al*, 2012).

muncul kalus dan diameter kalus pada minggu ke-4, ke-5 dan ke-6.

3. Tidak terdapat interaksi antara konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) dengan kondisi cahaya yang diberikan.

SARAN

1. Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan kondisi gelap, khususnya pada penelitian induksi kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni M.).
2. Perlu ditambahkan konsentrasi PEG (*Polyethylene Glycol*) untuk mencari titik kritis pada induksi kalus tanaman stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan riset dan Pengembangan Kementerian Riset,

DAFTAR PUSTAKA

- Arianti, A. M. 2015. Pengaruh Berbagai Konsentrasi PEG (*Polyethylen Glykol*) 6000 Terhadap Kualitas dan Kuantitas Kalus Serta Uji Kualitatif Metabolit Sekunder Vernodalin Pada Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*). Skripsi. Univ. Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. 102 Hal.
- Arimarsetiowati, R. 2012. Kultur Jaringan Tanaman Kopi. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Hal. 13-17.
- Ariningsih, I. S dan Anggarwulan E. 2003. Pertumbuhan Kalus dan Produksi Antrakuonin Mengkudu (*Morinda citrifolia*) pada Media Murashige-Skoog (MS) dengan Penambahan Ion Ca²⁺ dan Cu²⁺. J Biofarmasi 1(2): 39-43.
- Gupta P., Sharma S., Saxena S. 2015. Biomass yield and steviol glycoside production in callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* treated with proline and polyethylene glycol. Appl Bioch Biotech 26(2):863-874
- Laila, F. N dan Savitri SS. 2014. Produksi Metabolit Sekunder Steviosida Pada Kultur Kalus *Stevia rebaudiana* Bert. M.) Dengan Penambahan ZPT 2,4-D dan PEG (*Polyethylene Glykol*) 6000 Pada Media MS (*Murashige & Skoog*). El-Hayah 4(2): 57-65.
- Mishra, P. K., Rita. S., Umesh, K dan Veeru, P. 2010. *Stevia Rebaudiana – A Magical Sweetener. Glo J Of Biotech & Biochem.* 5(1): 62-74.
- teknologi, dan Pendidikan Tinggi sesuai dengan kontrak Penelitian Nomor 104/SP2H/LT/DRPM/IV/2017 atas pendanaan yang diberikan untuk pelaksanaan penelitian yang dilakukan.
- Pudyastuti. S., Noor A. H dan Sumadi. 2012. Efektivitas ZPT 2.4 D Pada Medium MS dan Lama Pencahayaan Untuk Menginduksi Kalus Dari Kotiledon Kedelai. J Biosaintifika 4 (1).
- Putri, Y. S. 2015. Pertumbuhan Kalus *Stevia rebaudiana* Bertoni Dari Eksplan Daun dan Ruas Batang Dengan Periode Subkultur Berbeda. Skripsi. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB. Bogor. 14 hal.
- Rukmana, R. 2003. Budidaya Stevia. Yogyakarta: Kanisius.
- Santoso, U dan Nursandi, F 2004. Kultur Jaringan Tanaman. Malang: Universitas Muhammadiyah.
- Smith R, 2013. *Plant Tissue Culture Third Edition: Techniques and Experiments.* California: Elsevier Inc
- Sumaryono dan Sinta MM. Tanpa tahun. Budidaya teknis tanaman Stevia. Bogor: Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia
- Syabana, M. A., Imas R dan Endah P. N. 2015. Pertumbuhan Tanaman Marasi (*Curculigo latifolia*) dengan Perbedaan Konsentrasi NAA (*Naphthalena Acetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) Secara *In Vitro*. J Agroekotek 7(1): 6–15.
- Zulhilmi., Suwirman dan Netty W. Surya. 2012. Pertumbuhan dan Uji Kualitatif Kandungan Metabolit Sekunder Kalus

Gatang (*Spilanthus acmella* Murr.)
dengan Penambahan PEG untuk
Menginduksi Cekaman Kekeringan. J
Biol. 1(1): 1-8.

Zulkarnain. 2009. Kultur Jaringan Tanaman.
Jakarta: Bumi aksara