

Pengaruh PVP dan DIECA terhadap Regenerasi Meristem Tebu *Effect of PVP and DIECA on Sugar Cane Meristem Regeneration*

Ika Roostika¹⁾, Rara Puspita Dewi Lima Wati²⁾, dan Deden Sukmadjaja¹⁾

¹⁾ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian,
Jln. Tentara Pelajar 3A Bogor-16111
Email: ikatambunan@yahoo.com

²⁾ Program Studi Pemuliaan Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura,
Fakultas Pertanian-Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB
Jln. Meranti Dramaga, Bogor

Diterima: 2 Juni 2014

Disetujui: 29 Oktober 2014

ABSTRAK

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman yang diperbanyak secara vegetatif sehingga berisiko besar akan terjadinya akumulasi virus di dalam jaringan tanaman. Kultur meristem merupakan salah satu teknik eliminasi virus yang umum digunakan, namun seringkali meristem memiliki daya hidup dan daya regenerasi yang rendah. Salah satu penyebabnya adalah karena akumulasi senyawa fenol. Akumulasi senyawa tersebut dapat direduksi melalui penggunaan senyawa adsorben dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *polyvinylpyrrolidone* (PVP) dan *diethyldithiocarbamate sodium* (DIECA) terhadap regenerasi meristem tebu. Bahan tanaman yang digunakan adalah tebu PS864. Eksplan yang digunakan adalah meristem dengan 1–2 primordia daun yang diisolasi di bawah mikroskop. Perlakuan meliputi PVP (100 dan 300 mg/l) dan DIECA (0 dan 20 mg/l) serta kombinasi antara kedua zat tersebut, dengan 3 ulangan (botol) dan setiap botol terdiri atas 3 meristem. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi PVP atau kombinasi perlakuan PVP dan DIECA dapat meningkatkan persentase eksplan hidup, daya regenerasi, dan jumlah tunas. Kombinasi perlakuan PVP 300 mg/l dan DIECA 20 mg/l merupakan perlakuan terbaik karena persentase hidup dan daya regenerasi eksplan yang paling tinggi (100%) dengan jumlah tunas 3,8 tunas/eksplan.

Kata kunci: Tebu, *Saccharum officinarum* L., kultur meristem, PVP, DIECA

ABSTRACT

Being vegetatively propagated, sugar cane faces a high risk of virus accumulation. Meristem culture is one method that usually applied for virus elimination. However, it often has low survival and regeneration rate due to an accumulation of phenolic compounds. Accumulation of those compounds can be reduced by apply adsorbent antioxidant. This research aimed at evaluating the effect of PVP and DIECA on the regeneration capacity of meristem. The plant material was sugar cane PS864. Meristems with 1–2 primordial leaves were used as the explants and isolated under microscope. The PVP (100–300 mg/l) and DIECA (0– 20 mg/l), or combined treatment of both antioxidants were used as treatments. Each treatment was replicated 3 times (bottles), and each bottle contained 3 meristems. The result showed that the higher concentration of PVP or combined treatment of PVP and DIECA could increase the percentage of survival, regeneration rate, and number of shoot. The combined treatment of 300 mg/l PVP, and 20 mg/l DIECA produced the highest level of survival rate (100%) which yielded 3.8 shoots/explants.

Keywords: Sugar cane, *Saccharum officinarum* L., meristem culture, PVP, DIECA

PENDAHULUAN

Penurunan produksi tebu dapat disebabkan oleh berbagai faktor. Salah satunya ada-

lah penyakit mosaik yang disebabkan oleh *sugar cane mosaic virus* (SCMV) dan *sugar cane streak mosaic virus* (SCSMV) (Haider *et al.*

2011; Goncalves *et al.* 2012). Virus tersebut mampu menurunkan rendemen gula hingga 10–30% (Bailey 2004; Putra & Damayanti 2009). Penggunaan benih yang sehat merupakan syarat utama untuk mendapatkan hasil yang optimal selama siklus budi daya (Goncalves *et al.* 2012). Oleh karena itu, diperlukan aplikasi teknik eliminasi virus.

Kultur meristem merupakan salah satu teknik untuk eliminasi virus yang umum digunakan. Terdapat empat alasan mengapa teknik tersebut dapat mengeliminasi virus, yaitu 1) tingginya aktivitas metabolik di area meristem sehingga menghambat replikasi virus, 2) tiadanya sistem vaskular di daerah meristem sehingga virus tidak mampu menginvasi jaringan tersebut, 3) tingginya kandungan auksin endogenus dan eksogenus di dalam jaringan meristem sehingga virus tidak dapat bereplikasi, dan 4) meristem lolos dari infeksi virus oleh karena mekanisme RNA *silencing* (Goncalves *et al.* 2012). Kelebihan lain dari teknik kultur meristem adalah dapat mengeliminasi beberapa macam virus secara bersamaan (Ramgareeb *et al.* 2010; Cheong *et al.* 2012).

Teknik kultur meristem telah berhasil dilakukan pada tanaman tebu dengan menggunakan meristem yang berukuran kurang dari 2 mm (Ramgareeb *et al.* 2010), namun seringkali meristem tersebut memiliki daya hidup dan daya regenerasi yang rendah (Wang & Valkonen 2012). Ukuran eksplan yang terlalu kecil menyebabkan kendala teknis dalam proses regenerasi jaringan menjadi tanaman utuh atau planlet (Wang & Valkonen 2012). Kondisi demikian dapat terjadi sebagai akibat dari perlakuan pada saat isolasi maupun tingginya kandungan senyawa fenolik dalam jaringan meristem. Akumulasi senyawa fenolik dapat menghambat pertumbuhan tanaman dan bahkan bersifat toksik. Senyawa tersebut muncul ketika tanaman mendapatkan cekaman atau stres, salah satunya berupa luka pada jaringan (Sari *et al.* 2013). Akumulasi fenol pada tanaman dapat diatasi dengan memberikan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) dan *diethyldithio-*

carbamic acid (DIECA). Cara lainnya adalah dengan melakukan subkultur secara berulang atau periodik (Cheong *et al.* 2012). Namun demikian, cara tersebut akan berisiko terhadap terjadinya kontaminasi dan keragaman somaklonal. Oleh karena itu pada penelitian ini, digunakan PVP dan DIECA untuk mengurangi terjadinya pencokelatan, sesuai hasil penelitian Yoruk & Marshall (2003). PVP merupakan adsorban yang bersifat spesifik menyerap senyawa fenol (Zhou *et al.* 2010). PVP banyak digunakan dalam kultur *in vitro* tanaman untuk mengurangi pencokelatan yang dapat berefek negatif terhadap daya hidup eksplan. Secara praktis, penggunaan PVP lebih mudah daripada aplikasi DIECA karena PVP dapat dicampurkan ke dalam media yang akan disterilisasi menggunakan otoklaf, sedangkan DIECA perlu disterilisasi dengan menggunakan *millipore* terlebih dahulu sebelum diteteskan pada eksplan. Menurut Sari *et al.* (2013) penggunaan PVP 100 mg/l hingga 20 g/l dapat mengurangi pencokelatan pada biakan jati. Pada penelitian ini, peningkatan konsentrasi PVP atau aplikasi kombinasi perlakuan PVP dan DIECA diharapkan dapat menekan pencokelatan dan meningkatkan daya regenerasi meristem. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi kultur meristem tebu sebelum diaplikasikan untuk eliminasi virus. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh PVP dan DIECA terhadap regenerasi meristem tebu PS864.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Unit Produksi Benih Unggul Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian dan Laboratorium Kultur Jaringan, Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian di Bogor.

Bahan tanaman yang digunakan adalah tebu varietas PS864 yang diperoleh dari kebun koleksi Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Perkebunan (Puslitbangun) Cibi-

nong, Bogor. Bahan tanaman merupakan tebu *ratoon* ke-2 yang ditanam di dalam *polybag* yang berisi media tanah dan pupuk kandang sapi (2:1). Untuk memacu pembentukan tunas, mata tunas disemprot dengan larutan *benzyladenine* (BA) 0,25 mg/l. Penyemprotan tersebut dilakukan setiap 2 minggu hingga terbentuk banyak tunas samping.

Tunas muda diisolasi dan disterilisasi dengan cara dibakar menggunakan alkohol 96%. Selanjutnya, meristem diisolasi di bawah mikroskop binokular dengan cara mengupas ligula dan helaian daunnya satu persatu hingga diperoleh meristem. Oleh karena ukuran meristem tebu sangat kecil, maka bagian yang diisolasi adalah meristem dengan 1–2 primordia daun (Gambar 1). Untuk meminimalkan stres yang disebabkan oleh luka mekanis, bagian basal disisakan sekitar 1 mm. Pada saat penanaman, bagian basal tersebut dipegang dengan menggunakan pinset. Meristem ditiriskan di atas kertas saring, lalu ditanam pada media regenerasi, yaitu media MS (Murashige & Skoog 1962) dengan penambahan BA 0,3 mg/l dan *indole butyric acid* (IBA) 0,5 mg/l.

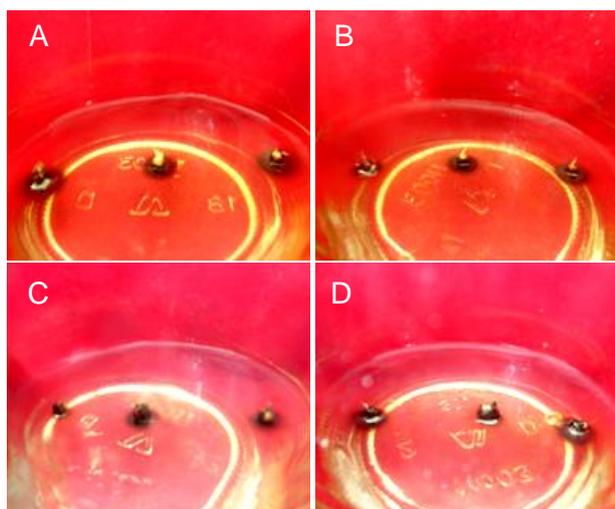
Perlakuan yang digunakan meliputi kombinasi dari PVP (100 dan 300 mg/l) dan DIECA (0 dan 20 mg/l) dengan 3 ulangan (botol) dan setiap botol terdiri atas 3 meristem. PVP ditambahkan pada media regenerasi, sedangkan DIECA diberikan dengan cara diteteskan ke bagian atas meristem yang telah ditanam pada media regenerasi, sebanyak 1 tetes, sehingga larutan DIECA tersebut mengenai eksplan dan media di sekitarnya. Pengamatan visual dilakukan terhadap pencokelatan yang terjadi pada eksplan dan media. Peubah yang diamati meliputi persentase eksplan hidup, jumlah eksplan yang berkalus, jumlah eksplan yang berakar, dan jumlah tunas pada 1–7 minggu setelah tanam (MST). Eksplan yang bertahan hidup ditandai dengan warna krem yang kemudian menjadi hijau atau krem kecokelatan terlebih dahulu lalu menjadi hijau. Warna coklat atau hitam menandakan eksplan tersebut mati. Tunas mu-

lai dapat dihitung ketika muncul daun, kira-kira dengan ukuran lebih dari 0,5 cm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada 1 MST, pencokelatan sudah terjadi pada bagian basal eksplan. Hal ini bertentangan dengan hasil yang dilaporkan oleh AlMaarri *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa kultur meristem tanaman kentang tidak mengalami pencokelatan. Kentang merupakan tanaman herbaceous sedangkan tebu memiliki batang yang lebih keras dengan kandungan sukrosa yang tinggi. Menurut Zhou *et al.* (2010), pencokelatan pada jaringan tanaman terjadi sebagai akibat dari konversi senyawa fenol menjadi quinon melalui reaksi enzimatis oleh polifenol oksidase, yang diikuti dengan konversi quinon menjadi hidroksil quinon melalui polimerisasi non-enzimatis menjadi senyawa yang berwarna coklat gelap, yaitu melanin. Goncalves *et al.* (2012) menjelaskan bahwa meristem yang berukuran kecil bersifat lebih sensitif terhadap desikasi, perlakuan selama isolasi, dan oksidasi senyawa fenol. Oksidasi senyawa fenol dapat menghasilkan quinon yang bersifat toksik terhadap jaringan tanaman. Jika pencokelatan terjadi sangat parah maka jaringan tanaman akan menjadi mati. Cheong *et al.* (2012) melaporkan bahwa subkultur secara berulang atau periodik dapat mereduksi pencokelatan, namun cara tersebut berisiko terhadap terjadinya kontaminasi dan keragaman somaklonal. Penggunaan PVP dan DIECA lebih disarankan oleh Yoruk & Marshall (2003) untuk mengurangi pencokelatan.

Pada periode inkubasi berikutnya (2 MST), zona pencokelatan di sekitar meristem tebu semakin meluas. Zona pencokelatan yang terjadi pada meristem yang diberi perlakuan PVP 100 mg/l tampak lebih besar daripada yang diberi perlakuan PVP 300 mg/l (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi PVP dari 100 mg/l menjadi 300 mg/l dapat menekan pencokelatan pada meristem tebu. Penekanan pencokelatan tersebut



Gambar 1. Pengaruh PVP dan DIECA terhadap pertumbuhan meristem tebu PS864, 2 MST: PVP 100 mg/l (A), PVP 100 mg/l + 1 tetes DIECA 20 mg/l (B) PVP 300 mg/l (C), PVP 300 mg/l + 1 tetes DIECA 20 mg/l (D)

diharapkan dapat meningkatkan daya regenerasi meristem.

Respon regenerasi meristem menjadi tunas dimulai dengan perubahan warna eksplan menjadi krem kemudian langsung menjadi hijau atau krem kecokelatan terlebih dahulu kemudian menjadi hijau. Pertumbuhan meristem ditandai dengan membengkaknya titik tumbuh disertai dengan perubahan warna menjadi hijau dan diikuti dengan elongasi tunas. Meristem dapat tumbuh tanpa disertai dengan pembentukan kalus maupun akar. Hal ini mengindikasikan bahwa media regenerasi yang digunakan pada penelitian ini telah optimal, sehingga rasio sitokinin dan auksin di dalam jaringan meristem diduga melebihi satu. Penemuan klasik menunjukkan bahwa perkembangan jaringan tanaman tergantung pada rasio sitokinin-auksin. Taraf sitokinin yang lebih tinggi akan memacu formasi tunas, sedangkan

taraf auksin yang tinggi akan memacu formasi akar, dan jika keduanya seimbang maka akan terbentuk kalus atau jaringan yang tidak terdiferensiasi. Kedua hormon tersebut saling berinteraksi dalam menentukan perkembangan tanaman (Moubayidin *et al.* 2009). Fitch *et al.* (2001) memperoleh regenerasi yang berkalus dari eksplan meristem karena media tumbuhnya mengandung auksin sintetik, yaitu *di-chloro phenoxyacetic acid* (2,4-D) 3 mg/l selain BA 0,2 mg/l.

Nilai persentase eksplan hidup menunjukkan kemampuan suatu zat dalam mencegah pencokelatan dan mendukung regenerasi meristem. Jika pencokelatan semakin parah maka persentase eksplan hidup akan rendah. Sebaliknya, jika zat yang digunakan mampu mencegah pencokelatan maka meristem dapat mempertahankan daya hidupnya. Tabel 1 menunjukkan bahwa penggunaan PVP dengan konsentrasi yang lebih tinggi (300 mg/l) memberikan persentase eksplan hidup yang lebih tinggi (89%) daripada konsentrasi PVP yang lebih rendah, yaitu 100 mg/l (56%) pada 10 MST. Hal ini mengindikasikan bahwa peningkatan konsentrasi PVP dapat meningkatkan persentase hidup eksplan. Menurut Sari *et al.* (2013) penggunaan PVP 100 mg/l hingga 20 g/l dapat menanggulangi pencokelatan pada biakan jati. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan PVP dan DIECA terbukti mampu mempertahankan daya hidup meristem hingga 100% pada 10 MST (Tabel 1).

Tidak semua meristem yang hidup dapat tumbuh atau beregenerasi dengan baik. Meristem yang hidup tetapi tidak tumbuh, ditandai dengan warna eksplan yang krem hingga hijau tetapi tidak mengalami elongasi tunas hingga 10 MST. Sebagian meristem bahkan

Tabel 1. Pengaruh PVP dan DIECA terhadap persentase eksplan hidup meristem tebu PS864

Perlakuan	Rata-rata ± Sd Persentase eksplan hidup (%)				
	1 MST	3 MST	5 MST	7 MST	10 MST
PVP 100 mg/l	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	67 ± 58	56 ± 51
PVP 100 mg/l + DIECA 20 mg/l	83 ± 24	67 ± 47	67 ± 47	67 ± 47	100 ± 0
PVP 300 mg/l	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	89 ± 19	89 ± 19
PVP 300 mg/l + DIECA 20 mg/l	89 ± 19	89 ± 19	89 ± 19	100 ± 0	100 ± 0

Tabel 2. Pengaruh PVP dan DIECA terhadap daya regenerasi meristem tebu PS864

Perlakuan	Rata-rata ± Sd Daya regenerasi (%)				
	1 MST	3 MST	5 MST	7 MST	10 MST
PVP 100 mg/l	100 ± 0	67 ± 58	67 ± 58	67 ± 58	44 ± 51
PVP 100 mg/l + DIECA 20 mg/l	83 ± 24	67 ± 47	67 ± 47	67 ± 47	100 ± 0
PVP 300 mg/l	72 ± 25	89 ± 19	89 ± 19	89 ± 19	78 ± 19
PVP 300 mg/l + DIECA 20 mg/l	78 ± 19	78 ± 19	78 ± 19	100 ± 0	100 ± 0

Tabel 3. Pengaruh PVP dan DIECA terhadap jumlah tunas yang terbentuk dari eksplan meristem tebu PS864

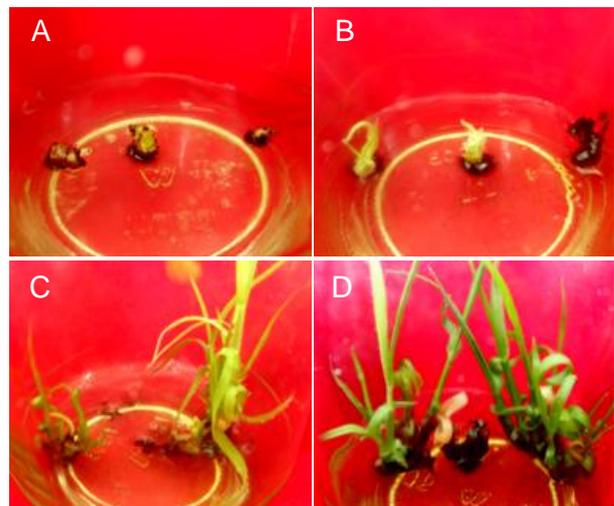
Perlakuan	Jumlah tunas (Rata-rata ± Sd)				
	1 MST	3 MST	5 MST	7 MST	10 MST
PVP 100 mg/l	1,0 ± 0,0	0,7 ± 0,6	0,7 ± 0,6	0,9 ± 0,8	1,5 ± 0,7
PVP 100 mg/l + DIECA 20 mg/l	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,3 ± 0,5	1,5 ± 0,7	1,8 ± 1,1
PVP 300 mg/l	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,3	4,3 ± 3,9
PVP 300 mg/l + DIECA 20 mg/l	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,8	2,1 ± 0,8	3,8 ± 2,8

berhenti pertumbuhannya pada periode inkubasi berikutnya, yaitu meristem yang diberi perlakuan PVP 100 mg/l dan DIECA 20 mg/l. Tabel 2 juga menunjukkan bahwa penggunaan PVP 300 mg/l dapat meningkatkan daya tumbuh meristem, mencapai 89% pada 7 MST. Kombinasi perlakuan PVP 300 mg/l dan DIECA 20 mg/l mampu meningkatkan daya tumbuh hingga 100% pada 7 MST.

Selain persentase eksplan hidup dan daya regenerasi, peningkatan konsentrasi PVP juga dapat meningkatkan jumlah tunas yang terbentuk. Pada taraf PVP 300 mg/l, jumlah tunas yang dihasilkan lebih banyak (1,8 tunas/eksplan) daripada yang dihasilkan oleh perlakuan PVP 100 mg/l (1,5 tunas/eksplan) pada 10 MST (Tabel 3). Kombinasi perlakuan PVP 300 mg/l dan DIECA 20 mg/l juga mampu meningkatkan jumlah tunas menjadi 3,8 tunas/eksplan pada 10 MST (Tabel 3). Meristem yang berasal dari perlakuan PVP 300 mg/l bahkan mampu berproliferasi dengan jumlah tunas mencapai 4,3 tunas/eksplan setelah periode inkubasi 10 MST (Tabel 3).

Secara umum, kombinasi perlakuan PVP 300 mg/l dan DIECA 20 mg/l memberikan daya regenerasi yang tertinggi (100%) pada 10 MST (Tabel 2) dengan jumlah tunas yang cukup tinggi, yaitu 3,8 tunas/eksplan (Tabel 3). Pada Gambar 2 tampak bahwa penampilan biakan yang berasal dari perlakuan tersebut lebih tegar dan lebih hijau dengan jumlah tunas

yang lebih banyak daripada perlakuan lainnya. Oleh karena itu, kombinasi perlakuan PVP 300 mg/l dan DIECA 20 mg/l merupakan perlakuan terbaik dan direkomendasikan untuk meregenerasikan meristem tebu.



Gambar 2. Pengaruh PVP dan DIECA terhadap regenerasi meristem tebu PS864, pada 10 MST: PVP 100 mg/l (A), PVP 100 mg/l + DIECA (B) PVP 300 mg/l (C), PVP 300 mg/l + DIECA (D).

KESIMPULAN

Peningkatan konsentrasi PVP atau kombinasi perlakuan PVP dan DIECA dapat meningkatkan persentase eksplan hidup, daya regenerasi, dan jumlah tunas. Kombinasi perlakuan PVP 300 mg/l dan DIECA 20 mg/l me-

rupakan perlakuan terbaik untuk kultur meristem tebu karena menghasilkan persentase hidup dan daya regenerasi eksplan yang tertinggi (100%) dengan jumlah tunas 3,8 tunas/eksplan pada 10 MST. Formulasi media dan metode yang dihasilkan pada penelitian ini dapat diaplikasikan pada tanaman tebu yang terserang virus sehingga menghasilkan benih yang bebas virus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian kegiatan yang didanai oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian melalui program Kerja Sama Kemitraan Penelitian dan Pengembangan Pertanian 2013 dengan nomor kontrak 810/LB.620/I.1/2/2013, 26 Februari 2013. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dayat dan Joko Tamami yang telah membantu dalam pemeliharaan tanaman induk tebu dan preparasi media kultur *in vitro* untuk mendukung kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- AlMaarri, K, Massa, R & AlBiski, F 2012, Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate *Potato Y potyvirus* from infected potato plants, *Plant Biotechnology* 29:237–243.
- Bailey, RA 2004, Diseases, in: James, G (Ed.), *Sugarcane*, Iowa (US), Blackwell, p. 54–74.
- Cheong, EJ, Mock, R & Li, R 2012, Elimination of five viruses from sugarcane using *in vitro* culture of axillary buds and apical meristems, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 109:439–445.
- Damayanti, TA, Putra, LK & Juliadi, D 2007, *Kajian sifat bioteknologi dan biomolekuler virus mosaik bergaris pada tebu di Indonesia*, Ringkasan Eksekutif Hasil-hasil Penelitian Kerja Sama Kemitraan Penelitian Pertanian, Badan Litbang Pertanian, Jakarta.
- Fitch, MMM, Lehrer, AT, Komor, E & Moore, PH 2001, Elimination of sugarcane yellow leaf virus from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay, *Plant Pathology* 50:676–680.
- Goncalves, MC, Pinto, LR, Souza, SC & Landell, MGA 2012, Virus diseases of sugarcane: A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil, *Functional Plant Science and Biotechnology* 6(2):108–116.
- Haider, SM, Afghan, S, Riaz, H, Tahir, M, Javed, MA, Rashid, N & Iqbal, J 2011, Identification of two sugarcane mosaic virus (SCMV) variants from naturally infected sugarcane crop in Pakistan, *Pak. J. Bot* 43(2):1157–1162.
- Moubayidin, L, Mambro, RD & Sabatini, S 2009, Cytokinin-auxin crosstalk, *Trends in Plant Science* 14(10):557–562.
- Murashige, T & Skoog, F 1962, A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum* 15(3): 473–497.
- Putra, LK & Damayanti, TA 2009, Penyakit *streak mosaic* pada tebu di Indonesia: seleksi lapang, deteksi virus, uji penularan, kisaran inang, dan ketahanan varietas, *MGP* 45(1):19–35.
- Ramgareeb, S, Snyman, SJ, van Antwerpen, T & Rutherford, RS 2010, Elimination of virus and rapid propagation of disease-free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture, *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 100:175–181.
- Sari N, Ratnasari, E & Isnawati 2013, Pengaruh penambahan berbagai kombinasi konsentrasi 2,4-Diklorofenoksiasetat(2,4-D) dan 6-Bensil Aminopurin (BAP) pada media MS terhadap tekstur dan warna kalus eksplan batang jati (*Tectona grandis* Linn. (F.)), *LenteraBio* 2(1): 69–73.
- Wang, Q & Valkonen, JPT 2012, Cryopreservation of shoot tips: Novel pathogen eradication method, *Trends in Science* 14(3):119–122.
- Yoruk, R & Marshall, M 2003, Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase, A review, *Journal of Food Biochemistry* 27:361–422.
- Zhou, B, Wei, X, Wang, R & Jia, J 2010, Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint., *Asian Journal of Traditional Medicines* 5(3): 109–116.