

Pengaruh Berbagai Jenis Zat Pengatur Tumbuh terhadap Induksi Kalus *Piper betle* L. var. Nigra

Junairiah^{1*}, Ni'matuzahroh¹, Nabilah Istighfari Zuraidassanaaz¹, Lilis Sulistyorini²

¹Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga

²Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Airlangga

^{*}E-mail: alip.jun1@gmail.com

Diterima : Agustus 2022

Disetujui : November 2022

ABSTRAK

Kultur kalus merupakan salah satu teknik kultur jaringan tumbuhan yang dimanfaatkan untuk mempelajari aspek nutrisi tanaman, embriogenesis somatik, kultur suspensi sel, produksi metabolit sekunder dan transformasi genetik. Induksi kalus dilakukan melalui penambahan zat pengatur tumbuh. Sirih hitam (*Piper betle* L. var. Nigra) adalah salah satu tanaman obat yang berpotensi dalam menghasilkan metabolit sekunder. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan formula terbaik untuk induksi kalus *P. betle* L. var. Nigra. Zat pengatur tumbuh tunggal yang digunakan yaitu 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Benzyl Amino Purine (BAP), Indole Butyric Acid (IBA), Indole Acetic Acid (IAA) dan Naphthalene Acetic Acid (NAA) dengan variasi konsentrasi yang digunakan adalah 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/L. Masing-masing perlakuan terdiri atas 6 ulangan yang ditanam menggunakan medium Murashige and Skoog (MS) secara *in vitro* selama 8 minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan 1,5 mg/L 2,4-D menghasilkan berat segar (1389,5 mg) dan berat kering (55,7 mg) tertinggi. Kalus *P. betle* L. var. Nigra dalam berbagai perlakuan menunjukkan tekstur yang beragam seperti kompak dan remah dengan beragam warna kalus seperti putih, putih kehijauan, putih kecokelatan, hijau kekuningan, kuning kehijauan, kuning kecokelatan, cokelat kehijauan, cokelat dan abu-abu.

Kata kunci: Induksi kalus, *Piper betle* L. var. Nigra, Zat pengatur tumbuh.

Effect of Plant Growth Regulators on Callus Induction in *Piper betle* L. var. Nigra

ABSTRACT

Callus culture is one of the plant tissue culture techniques that used to study aspects of plant nutrition, somatic embryogenesis, cell suspension culture, secondary metabolite production, and genetic transformation. Callus induction was carried by adding growth regulators. Black betel (*Piper betle* L. var. nigra) is a medicinal plant that has the potential to produce secondary metabolites. The aim of this study was to obtain the best formula for callus induction of *P. betle* L. var. nigra. The single growth regulator used is 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Benzyl Amino Purine (BAP), Indole Butyric Acid (IBA), Indole Acetic Acid (IAA), and Naphthalene Acetic Acid (NAA) with variations the concentration used is 0; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5 mg/L. Each treatment consisted of 6 replicates grown using Murashige and Skoog (MS) medium *in vitro* for eight weeks. The results showed that the 1.5 mg/L 2,4-D treatment produced the highest fresh weight (1389.5 mg) and dry weight (55.7 mg). Callus *P. betle* L. var. Nigra in various treatments showed various textures such as compact and friable with callus colors such as white, greenish-white, brownish-white, yellowish-green, greenish-yellow, brownish-yellow, greenish-brown, brown, and gray.

Keywords: Callus induction, *Piper betle* L. var. Nigra, Plant Growth Regulators.

1. PENDAHULUAN

Piperaceae merupakan tumbuhan aromatik yang dimanfaatkan sebagai tanaman obat dan tanaman hias. Telah dilaporkan bahwa Piperaceae terdiri atas 13 genus dan 2658 spesies [1]. Beberapa diantaranya adalah jenis *Piper* yang dibudidayakan seperti *Piper betle* dan *Piper nigrum*. Masyarakat Indonesia menggunakan *Piper betle* untuk kegiatan ritual, tanda

kehormatan dan sebagainya, sedangkan *Piper nigrum* digunakan untuk kegiatan ekonomi misalnya perdagangan [2].

Piper betle terdiri atas dua macam yaitu sirih hijau dan sirih hitam. Sirih hitam merupakan tanaman multifungsi karena selain digunakan sebagai tanaman hias juga dapat digunakan untuk mengobati

berbagai macam penyakit. Hal ini disebabkan daun sirih hitam mengandung metabolit sekunder. Tanaman ini mengandung berbagai macam vitamin, mineral dan metabolit sekunder (flavonoid, tannin, saponin, dan alkaloid) [3]. Tanaman sirih hitam mempunyai berbagai aktivitas biologi seperti untuk antibakterial, antifungal, antioksidan dan sebagainya.

Selama ini untuk memperoleh metabolit sekunder dengan mengekstraksi langsung dari tanaman asli. Namun upaya ini menimbulkan masalah karena membutuhkan bahan tanaman lebih banyak. Oleh sebab itu, perlu alternatif untuk mengatasi masalah tersebut. Salah satu upaya yang dilakukan adalah dengan kultur kalus. Kultur kalus merupakan salah satu teknik kultur jaringan tanaman. Pembentukan kalus diperlukan zat pengatur tumbuh berupa auksin dan sitokinin [4, 5]. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh beragam zat pengatur tumbuh tunggal dalam menginduksi kalus daun *Piper betle* L. var. Nigra. Zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D), Benzyl Amino Purine (BAP), Indole Butyric Acid (IBA), Indole Acetic Acid (IAA), dan Naphthalene Acetic Acid (NAA). Zat pengatur tumbuh tersebut dapat memberikan pengaruh pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur jaringan. Auksin seperti 2,4-D, IAA, IBA, dan NAA digunakan untuk perpanjangan sel, pembentukan akar adventif, menghambat pembentukan tunas adventif dan tunas ketiak. Sedangkan sitokinin seperti BAP berperan dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis, selain itu juga untuk merangsang terbentuknya tunas, berpengaruh dalam metabolisme sel, dan merangsang sel dorman..

2. METODE PENELITIAN

2.1. Persiapan bahan

Bahan tanaman sirih hitam (*Piper betle* L. var. Nigra) diperoleh dari Pasar Bunga Bratang Surabaya, Jawa Timur, Indonesia. Eksplan yang digunakan adalah daun yang masih bersifat meristematis. Pada penelitian ini disiapkan bahan kimia yang merupakan komponen dari medium *Murashige and Skoog* yang terdiri atas hara makro, mikro, myo-inositol, sukrosa, vitamin, zat besi. Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan adalah 2,4-D, BAP, IBA, IAA dan NAA.

2.2. Persiapan media

Pembuatan media *Murashige and Skoog* (MS)

dilakukan dengan cara menyiapkan larutan stok terlebih dahulu. Unsur-unsur makronutrien ditimbang satu per satu dan dilarutkan ke dalam 500 mL aquades sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian menambahkan larutan stok yang sudah disiapkan yang terdiri atas larutan stok zat besi 5 mL, mikronutrien 1 mL, vitamin 1 L dan zat pengatur tumbuh 2,4-D, IAA, NAA, IBA, BAP, Kinetin sesuai konsentrasi yang dibutuhkan, yaitu 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 ppm. Myo-inositol 100 mg, dan sukrosa 30 gram ditimbang, kemudian dilarutkan kedalam larutan media tersebut secara berurutan. Setelah semua larut, kemudian mengukur pH larutan (5,6-5,8) dengan *universal indicator strip*.

Jika larutan menunjukkan kadar yang terlalu asam maka ditambahkan beberapa tetes KOH 1 N dan apabila terlalu basa maka ditambahkan HCl 1 N dengan menggunakan pipet. Selanjutnya larutan tersebut ditambahkan 8 gram Agar kemudian dipanaskan dengan menggunakan kompor listrik sambil diaduk hingga larut. Larutan yang sudah jadi tersebut kemudian dituang kedalam botol kultur hingga volume 10 mL. Setelah itu, botol kultur yang sudah berisi media bagian mulut tabungnya ditutup dengan menggunakan *aluminium foil* serta diberi label sesuai dengan perlakuan yang diberikan. Terakhir, medium disterilisasikan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Medium yang steril disimpan di ruang penyimpanan.

2.3. Sterilisasi eksplan

Daun sirih hitam dicuci dengan sabun cair, kemudian dibilas dengan air mengalir hingga 3 kali ulangan. Sterilisasi selanjutnya dilakukan didalam *Laminar Air Flow* (LAF), yakni meliputi perendaman daun sirih dengan alkohol 70% selama 5 menit, kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya daun-daun tersebut direndam dengan kloroks 10% selama 10 menit. Kemudian dilakukan pencucian dengan aquades steril selama 5 menit sebanyak 3 kali.

2.4. Penanaman dan pemeliharaan eksplan

Sebelum digunakan untuk penanaman eksplan, ruang kerja harus dalam keadaan bersih, dinding dan lantai dibersihkan dengan desinfektan. Meja LAF disterilkan dengan alkohol 70%. Semua alat (pinset, scalpel, gelas ukur, cawan petri, botol kultur, bunsen dan alkohol 70%) dimasukkan dalam *Laminar Air Flow* / LAF yang sebelumnya

disemprotkan dahulu dengan alkohol 70% menggunakan *sprayer*. Lalu lampu UV di dalam LAF dinyalakan selama 30 menit. Setelah itu, lampu UV dimatikan dan mengganti dengan menyalakan lampu neon.

Penanaman eksplan dilakukan secara aseptis didalam LAF. Permukaan daun sirih hitam yang telah disterilkan diletakkan dalam cawan petri steril yang telah dilapisi kertas saring atau kertas serap steril untuk menyerap aquades. Kemudian eksplan dipotong-potong diatas cawan petri dengan ukuran 1 cm². Eksplan ditanam dalam botol kultur yang telah berisi media dengan berbagai perlakuan. Setiap botol kultur diisi dengan tiga eksplan kemudian diletakkan dalam ruang *incubator*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian meliputi lama waktu induksi kalus, persentase eksplan membentuk kalus, berat segar kalus, berat kering kalus, morfologi meliputi tekstur dan warna kalus dari eksplan daun *Piper betle* L. var. Nigra yang ditanam pada medium MS dengan zat pengatur tumbuh 2,4-D, BAP, IBA, IAA dan NAA. Waktu induksi kalus adalah lama waktu yang diperlukan oleh eksplan suatu tanaman untuk membentuk kalus. Pada penelitian ini eksplan daun sirih hitam ditanam pada medium MS dengan variasi konsentrasi ZPT 2,4-D, BAP, NAA, IBA, IAA dengan konsentrasi 0; 0,5; 1; 1,5 ; 2 ; 2,5 mg/L.

Tabel 1. Waktu induksi kalus dan persentase eksplan membentuk kalus eksplan daun *Piper betle* L. var Nigra yang ditanam pada medium MS dengan variasi konsentrasi ZPT

Konsentrasi (mg/L)	Waktu induksi kalus (hari)	Persentase terbentuknya kalus (%)
0 (Kontrol)	0	0
2,4-D 0,5	17	100
2,4-D 1	19	100
2,4-D 1,5	18	100
2,4-D 2	16	100
2,4-D 2,5	16	100
BAP 0,5	18	100
BAP 1	21	100
BAP 1,5	21	100
BAP 2	20	100
BAP 2,5	18	100
NAA 0,5	0	0
NAA 1	22	83,33
NAA 1,5	26	16,67
NAA 2	3	83,33
NAA 2,5	0	0
IBA 0,5	0	0
IBA 1	24	16,67
IBA 1,5	0	0
IBA 2	17	50
IBA 2,5	17	50
IAA 0,5	24	50
IAA 1	21	100
IAA 1,5	0	0
IAA 2	18	50
IAA 2,5	0	0

Induksi kalus diawali dengan penebalan eksplan pada bagian potongan daun di daerah yang mengalami pelukaan. Penebalan tersebut merupakan interaksi eksplan dengan media tumbuh, zat pengatur tumbuh dan lingkungan tumbuh sehingga eksplan bertambah besar. Pemberian ZPT dengan dosis tunggal pada eksplan

daun sirih hitam memberikan respon yang berbeda-beda pada perkembangan masing-masing perlakuan. Respon yang berbeda tersebut ditunjukkan dengan eksplan yang melengkung, menggulung, melebar, membengkak, tumbuh kalus pada bagian permukaan atau bagian tepi eksplan, kemudian kalus yang terbentuk tiap minggu

mengalami perubahan warna, sedangkan indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* yaitu berupa warna dan tekstur kalus.

Data berat segar dan berat kering kalus dapat dilihat pada Tabel 2. Pada perlakuan ZPT

tunggal 2,4-D dengan konsentrasi 1,5 mg/L menghasilkan berat segar dan berat kering kalus tertinggi.

Tabel 2. Berat segar dan berat kering kalus eksplan daun *Piper betle* L. var *Nigra* yang ditanam pada medium MS dengan variasi konsentrasi ZPT

Konsentrasi	Berat (mg)	
	Berat segar (mg)	Berat kering (mg)
0 (Kontrol)	0	0
2,4-D 0,5	90,80	13,80
2,4-D 1	65,00	10,40
2,4-D 1,5	1389,50	55,70
2,4-D 2	256,00	25,30
2,4-D 2,5	144,90	17,30
BAP 0,5	68,90	11,60
BAP 1	129,90	15,80
BAP 1,5	231,90	21,35
BAP 2	105,50	13,70
BAP 2,5	607,60	35,60
NAA 0,5	0	0
NAA 1	46,40	6,62
NAA 1,5	17,20	4,90
NAA 2	107,70	7,10
NAA 2,5	0	0
IBA 0,5	0	0
IBA 1	12,50	3,10
IBA 1,5	0	0
IBA 2	5,80	0,80
IBA 2,5	13,90	2,80
IAA 0,5	14,10	3,20
IAA 1	27,50	4,80
IAA 1,5	0	0
IAA 2	7,80	3,00
IAA 2,5	0	0

Penanaman eksplan daun sirih hitam pada medium MS dengan zat pengatur tumbuh 2,4-D; BAP; NAA; IBA; IAA memberikan respon yang bervariasi pada masing-masing perlakuan. Perbedaan lama waktu eksplan dalam membentuk kalus diduga dipengaruhi oleh komposisi zat pengatur tumbuh dalam media serta kondisi fisiologis dari eksplan tersebut. Sebagian besar perlakuan mampu menginduksi kalus. Hal ini sesuai dengan penelitian yang menggunakan zat pengatur tumbuh yang sama. Zat pengatur tumbuh 2,4-D konsentrasi 1,5; 2,5; 3 dan 3,5 mg/L dapat menginduksi kalus pada *Triticum aestivum* [6]. Sementara itu pada konsentrasi 2 mg/L dapat menginduksi kalus dengan waktu induksi kalus 14,3 hari dengan persentase terbentuknya kalus sebesar 83,3% pada eksplan daun *Vanda* sp. [7]. Penggunaan 2,4-D pada konsentrasi 4 mg/L yang menggunakan eksplan daun, internodus dan tangkai

Orthosiphon stamineus dapat menginduksi kalus, masing-masing dengan persentase induksi kalus 99,6%; 99,1% dan 99,9%. Zat pengatur tumbuh BAP konsentrasi 0,5-1,0 mg/L dapat menginduksi kalus yang menggunakan eksplan daun *Durio zibethinus* [8]. Penggunaan NAA konsentrasi 1,5 mg/L dapat menginduksi kalus eksplan batang *Phyla nodiflora* pada medium MS. Zat pengatur tumbuh NAA dan IAA konsentrasi 3 mg/L pada eksplan daun *Tephrosia hookeriana* menghasilkan persentase induksi kalus sebesar 60% dan 27% [9]. Induksi kalus dengan zat pengatur tumbuh IBA konsentrasi 2 mg/L dan 2,5 mg/L menghasilkan persentase induksi kalus sebesar 41% dan 43% [10].

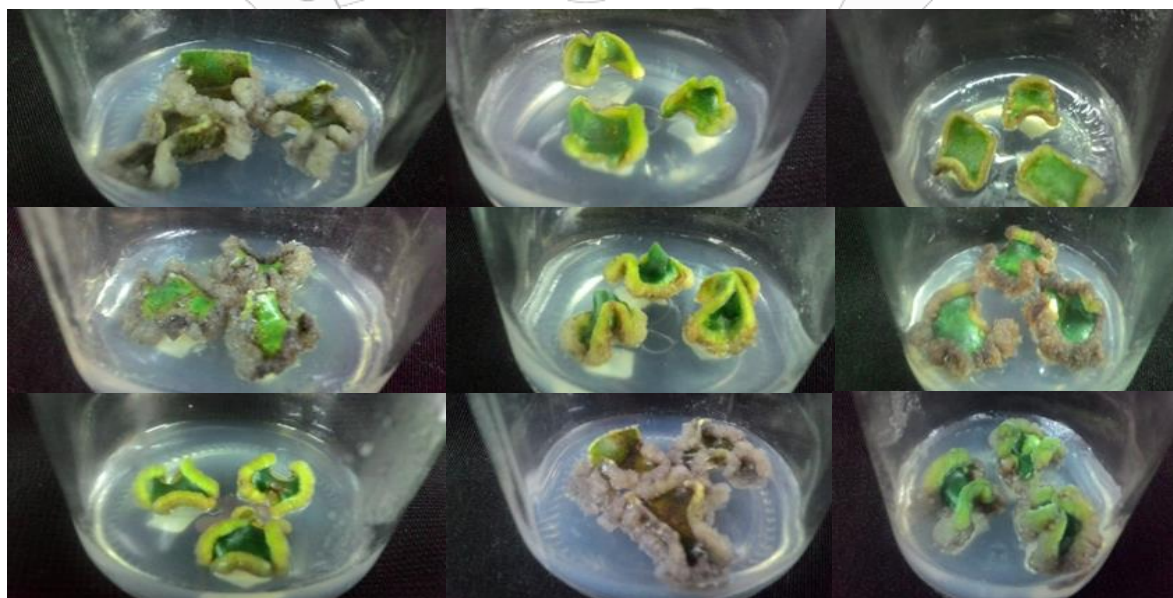
Pemberian ZPT dengan dosis tunggal pada eksplan daun sirih hitam memberikan respon yang berbeda-beda pada perkembangan masing-masing perlakuan (Tabel 3 dan Gambar 1). Respon yang

berbeda tersebut ditunjukkan dengan eksplan yang melengkung, menggulung, melebar, membengkak, tumbuh kalus pada bagian permukaan atau bagian tepi eksplan, kemudian kalus yang terbentuk tiap

minggu mengalami perubahan warna, sedangkan indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* yaitu berupa warna dan tekstur kalus.

Tabel 3. Morfologi kalus eksplan daun *Piper betle* L. var *Nigra* yang ditanam pada medium MS dengan variasi konsentrasi ZPT

Konsentrasi (mg/L)	Morfologi kalus	
	Warna	Tekstur
0	-	-
2,4 D 0,5	Cokelat, putih, putih kehijauan, putih kecokelatan	Kompak, remah
2,4 D 1	Cokelat, putih, putih kehijauan, putih kecokelatan	Kompak
2,4 D 1,5	Putih, putih kecokelatan	Remah, kompak
2,4 D 2	Putih, putih kecokelatan	Remah, kompak
2,4 D 2,5	Putih, putih kecokelatan, putih kehijauan	Remah, kompak
BAP 0,5	Cokelat, putih kehijauan	Kompak
BAP 1	Cokelat, hitam, putih kecokelatan	Kompak
BAP 1,5	Hitam, cokelat	Kompak
BAP 2	Putih, cokelat, putih kehijauan, putih kecokelatan	Kompak
BAP 2,5	Putih	Remah
NAA 0,5	-	-
NAA 1	Putih kecokelatan (tumbuh akar), coklat	Kompak
NAA 1,5	-	-
NAA 2	Cokelat, putih kecokelatan (tumbuh akar)	Kompak
NAA 2,5	-	-
IAA 0,5	Cokelat	Kompak
IAA 1	Cokelat, hitam, putih kehijauan	Kompak
IAA 1,5	-	-
IAA 2	Cokelat	Kompak
IAA 2,5	-	-
IBA 0,5	-	-
IBA 1	Cokelat	Kompak
IBA 1,5	-	-
IBA 2	Cokelat	Kompak
IBA 2,5	Cokelat, putih	Kompak



Gambar 1. Warna kalus *Piper betle* L. var. *Nigra*. (A) kuning kehijauan, (B) putih kehijauan, (C) kuning kecokelatan, (D) putih, (E) cokelat, (F) hijau kekuningan, (G) abu-abu, (H) putih kecokelatan, (I) cokelat kehijauan

Pada hasil pengamatan menyatakan bahwa semua perlakuan menghasilkan kalus yang kompak. Tekstur kalus kompak merupakan efek dari sitokinin yang berperan dalam transport zat hara. Sistem transport sitokinin dari bagian basal ke apeks membawa air dan zat hara melalui pembuluh pengangkut dan mempengaruhi potensial osmotik dalam sel. Penambahan sukrosa dalam medium akan mengalir melalui pembuluh floem dan menimbulkan tekanan turgor. Tekanan turgor muncul akibat adanya perbedaan konsentrasi larutan, sehingga air dan zat hara (sukrosa) dari medium akan masuk ke dalam sel melalui cara osmosis. Hal ini membuat dinding-dinding sel semakin kaku, sehingga sel kalus akan menjadi kompak [11].

Keberhasilan pembentukan kalus tergantung sumber eksplan dan jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan. Umumnya, pembentukan kalus terjadi pada bekas luka ibu tulang daun yang bersentuhan dengan medium. Terjadinya kalus di tempat bekas irisan bertujuan untuk menutup luka sebagai akibat proliferasi sel-sel jaringan induk atau eksplan [12]. Munculnya kalus tepi eksplan (bagian yang terluka) seperti yang telah teramati pada berbagai perlakuan ditandai dengan membengkaknya eksplan, bergelombang dan kemudian tumbuh kalus. Selain itu, kalus juga dapat muncul pada bagian permukaan eksplan seperti yang telah teramati pada beberapa kalus dengan perlakuan yang berbeda. Hal tersebut diduga karena adanya rangsangan dari jaringan pada eksplan. Bagian eksplan yang membentuk kalus disebabkan sel-sel yang kontak dengan media terdorong untuk menjadi meristematik dan selanjutnya aktif mengadakan pembelahan. Pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi dari adanya respon terhadap luka dan suplai hormon alamiah atau buatan dari luar ke dalam eksplan [13, 14].

Kalus kompak merupakan ciri kalus organogenik, sehingga pertumbuhannya tampak lambat karena sel kalus pertumbuhannya lebih mengarah pada proses diferensiasi. Kalus yang bertekstur kompak dicirikan dengan permukaan kalus rata atau berupa gerigi halus yang mengkilap. Warna kalus putih diduga sebagai jaringan parenkim yang mengandung butiran pati yang merupakan simpanan polisakarida pada tumbuhan [15]. Pada minggu ke-7 warna kalus sudah mulai menjadi putih kecokelatan dan ada yang berwarna coklat serta abu-abu. Hal ini disebabkan eksplan semakin tua dan menunjukkan gejala pencokelatan

(*browning*). Pencokelatan yang terjadi pada kalus ini karena adanya reaksi enzimatis yang mengarah pada pembentukan senyawa fenol. Eksplan yang mengalami pencokelatan disebabkan oleh kondisi eksplan yang mempunyai kandungan fenol yang tinggi. Senyawa fenol yang terbentuk pada kalus dalam penelitian ini merupakan bentuk respon eksplan terhadap luka. Jika fenol yang terbentuk mengalami oksidasi maka dapat menyebabkan warna coklat pada kalus [16].

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perlakuan 1,5 mg/L 2,4-D menghasilkan berat segar tertinggi sebesar 1389,5 mg dan berat kering tertinggi sebesar 55,7 mg. Tekstur pada kalus sirih hitam dalam berbagai perlakuan adalah kompak dan remah dengan ragam warna kalus seperti putih, putih kehijauan, putih kecokelatan, hijau kekuningan, kuning kehijauan, kuning kecokelatan, coklat kehijauan, coklat dan abu-abu.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Kepada Masyarakat (DRPM) Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui Skema Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT).

6. PENDANAAN

Penelitian ini didanai oleh DRPM Dikti melalui Skema PDUPT (No. Kontrak: 458/UN3.15/PT/2021)

7. KONFLIK KEPENTINGAN

Seluruh penulis menyatakan tidak terdapat potensi konflik kepentingan dengan penelitian, kepenulisan (*authorship*), dan atau publikasi artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jadhav SB, Shah N, Rathi A, Rathi V, Rathi A. Serratiopeptidase: Insights into the therapeutic applications. *Biotechnology Reports*. 2020: 00544.
2. Simpson MG. *Plant systematics*. United States: Elsevier Academic Press; 2006.
3. Munawaroh E. The diversity and conservation of *Piper* (Piperaceae) in Bukit Barisan Selatan National Park, Lampung Province. *Media Konservasi*. 2017;22(2):118-28.
4. Junairiah, Ni'matuzahroh, Zuraidassanaaz NI, Sulistyorini L. Isolation and identification of secondary metabolites of black betel (*Piper*

- betle* L. var. *Nigra*). Jurnal Kimia Riset. 2018;3(2):131-38.
5. Sari YP, Kusumawati E, Saleh C, Kustiawan W, Sukartingsih S. Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant *Myrmecodia tuberosa*. Nusantara Bioscience. 2018;10(3):183-92.
 6. Sharma PR, Patil AV, Patil DA. Effect of culture media and growth hormones on callus induction in *Crataeva tapia* L. Int. J. Pharm. Res. 2017;9:70-6.
 7. Malik SI, Rashid H, Yasmin TA, Minhas NM. Effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction from mature wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. Int. J. Agric. Biol. 2003;6:156-9.
 8. Budisantoso I, Amalia N, Kamsinah K. In vitro callus induction from leaf explants of *Vanda* sp stimulated by 2, 4-D. Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education. 2017;9(3):492-7.
 9. Zulkarnain Z, Neliyati N, Lizawati L. Callus proliferation from immature leaf explants of durian (*Durio zibethinus* Murr. cv. Selat) with the addition of Picloram and BAP. Jurnal Hortikultura Indonesia. 2013;4(3):107-14.
 10. Thirupathy S, Sisubalan N, Ghouse BM. Callus induction from a wild medicinal plant *Tephrosia hookeriana* (weight and arn). International Journal of Recent Scientific Research. 2014;5(6):1027-30.
 11. Gauchan DP, Dhakal A, Sharma N, Bhandari S, Maskey E, Shrestha N, Gautam R, Giri S, Gurung S. Regenerative callus induction and biochemical analysis of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Advanced Laboratory Research in Biology. 2014;5(3):41-5.
 12. Purwianingsih W, Hamdiyati Y. Metode elisitasi menggunakan ragi *Sacharomyces cerevisiae* untuk meningkatkan kandungan bioaktif kuinon kalus *Morinda cirrifolia* L. (mengkudu). Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung. 2007;1-14.
 13. Elangomathavan R, Kalaivanan P, Hariharan P, Beulah SN. High efficient protocol for callus induction and regeneration of a medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences. 2017;4(1):113-22.
 14. Nasution NH, Nasution IW. The effect of plant growth regulators on callus induction of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). InIOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2019;305(1):012049.
 15. Lin J, Wu L, Liang J, Wang J. Effect of different plant growth regulators on callus induction in *Catalpa bungei*. African Journal of Agricultural Research. 2010;5(19):2694-704.
 16. Ivan GR, Carlos RM, Tatiana CD, Marsen GP, Norma A. Compact callus cultures and evaluation of the antioxidant activity of *Hovenia dulcis* Thunb.(Rhamnaceae) under in vivo and in vitro culture conditions. Journal of Medicinal Plants Research. 2015;9(1):8-15.
 17. Ahmed AB, Pallela R, Rao AS, Rao MV, Taha RM. Optimized conditions for callus induction, plant regeneration and alkaloids accumulation in stem and shoot tip explants of *Phylla nodiflora*. Spanish Journal of Agricultural Research. 2011;9(4):1262-70..