

**Research Article****Induksi Kalus Sisik Umbi *Lilium longiflorum* Thunb. oleh Auksin dan Sitokinin, serta Respons Pertumbuhannya Secara *In Vitro******Callus Induction of Lilium longiflorum Thunb. Bulb Scales by Auxin and Cytokinin, and Its Growth Responses In Vitro***Yeni Ekawati ¹, Anggraeni ^{1*}, Apriliana Dyah Prawestri ², Eddy Nurtjahya ¹¹Program Studi Biologi, Fakultas Pertanian, Perikanan, dan Biologi, Universitas Bangka Belitung, Kampus Terpadu UBB Balunijuk, Merawang, Bangka 33172²Pusat Riset Rekayasa Genetika, Organisasi Riset Ilmu Hayati dan Lingkungan, BRIN, Kawasan Sains dan Teknologi Soekarno, Jl. Raya Jakarta Bogor KM 46, Cibinong, Bogor 16911

Received: Agustus 12, 2021 / Received in revised : July 15, 2022 / Accepted: Desember 29, 2022

ABSTRACT

Lilium longiflorum Thunb. is a potential ornamental plant that has been developed in several industry, such as pharmaceutical industry and floriculture industry. Generative propagation of *L. longiflorum* is difficult and more effective when propagated asexually through tissue culture techniques. This research aimed to analyze callus induction from *L. longiflorum* bulb scale and its growth response to the addition of auxin and cytokinin in culture media. This research were tested in two treatments: MS + 3.0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.5 mg L⁻¹ BAP, incubated in dark condition for 24 hours (treatment 1) and MS + 1.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg L⁻¹ BAP, photoperiod 16/8 h (treatment 2). Furthermore, calli were planted on regeneration media (MS + 3.4 mg L⁻¹ BAP + 0.09 mg L⁻¹ NAA). The result showed that explant in treatment 2 (MS + 1.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg L⁻¹ BAP, photoperiod 16/8 hours dark/light) is more responsive than treatment 1 on callus induction and subculture treatment. This treatment also produced good quality of calli which were shown in a compact texture, yellowish green colour and 100 % survived. Regeneration media succeeded in regenerating calli into indirect shoots by 100 %, even though no direct shoots and roots were found in this experiment. This research suggest that treatment 2 can used as an effective protocol on developing *L. longiflorum*.

Keywords: Micropropagation, Tissue Culture, *Lilium longiflorum*, Organogenesis**ABSTRAK**

Lilium longiflorum Thunb. adalah florikultura potensial untuk dikembangkan di bidang industri farmasi dan florikultura. Perbanyakkan *L. longiflorum* secara generatif sulit dilakukan dan perbanyakkan vegetatif dengan kultur jaringan jauh lebih efektif. Oleh karena itu, diperlukan sebuah protokol perbanyakkan *L. longiflorum* secara *in vitro* yang efisien. Tujuan penelitian ini adalah mengamati induksi kalus dari eksplan sisik umbi dari planlet *L. longiflorum* dan respons pertumbuhannya terhadap penambahan auksin dan sitokinin dalam media kultur. Respons sisik umbi pada induksi kalus diuji dengan dua perlakuan, yaitu MS + 3,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ BAP dengan inkubasi dalam keadaan 24 jam gelap (perlakuan 1) dan MS + 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ BAP dengan fotoperiode 16/8 jam (perlakuan 2), selama 28 minggu. Kemudian, respons regenerasi kalus menjadi tunas diuji dengan penanaman kalus pada media regenerasi (MS + 3,4 mg L⁻¹ BAP + 0,09 mg L⁻¹ NAA) selama 12 minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan pada perlakuan 2 lebih responsif untuk menginduksi kalus dari

*Korespondensi Penulis.

E-mail : anggieib@gmail.comDOI: <https://doi.org/10.33019/agrosainstek.v6i2.316>

sisik umbi *L. longiflorum* dibandingkan eksplan pada perlakuan 1. Kalus yang dihasilkan bertekstur kompak dan berwarna hijau kekuningan dengan tingkat kesintasan 100 % dan daya proliferasi yang tinggi. Media regenerasi berhasil meregenerasikan kalus menjadi tunas sebesar 100 %, meskipun tidak terdapat pertumbuhan akar dalam penelitian ini. Perlakuan MS + 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ BAP dengan fotoperiode 16/8 jam direkomendasikan sebagai sebuah protokol yang efektif dalam pengembangan *L. longiflorum*.

Kata kunci: Mikropropagasi, Kultur Jaringan, *Lilium longiflorum*, Organogenesis

1. Pendahuluan

Lili (*Lilium longiflorum* Thunb.) merupakan tanaman florikultura dari Famili *Liliaceae* yang potensial untuk dikembangkan. Tanaman tersebut memiliki nilai jual yang tinggi sebagai bunga potong (Haryati 2015). Lestari *et al.* (2020) melaporkan bahwa *Lilium* merupakan salah satu bunga potong yang penting dan terbaik dalam perdagangan florikultura dunia, serta telah digunakan sebagai tanaman hias selama berabad-abad karena memiliki ukuran bunga yang besar. Budidaya *L. longiflorum* saat ini juga semakin maju dengan pengembangan dan eksplorasi dalam industri farmasi. Pemanfaatan saponin dalam umbi *L. longiflorum* dapat dikembangkan sebagai obat kanker (Kim *et al.* 2015), antiinflamasi, antitusif dan sedatif. *L. longiflorum* menjadi sangat populer karena memiliki masa simpan yang lama sebagai bunga potong (*long vase life*), mampu beradaptasi dan memiliki nilai ornamental yang tinggi.

Beberapa tantangan dalam perbanyakan *L. longiflorum* di antaranya adalah individu *self-incompatible* (Anggraeni & Iriawati 2017), *hermaprodit* dan *heterostyly* (Deswiniyanti *et al.* 2012). Perbanyakan *Lilium* secara generatif melalui biji menjadi kurang optimal karena ukuran biji yang relatif kecil, memiliki tingkat perkecambahan yang lambat dan menghasilkan variabilitas genetik yang tidak diinginkan (Ali *et al.* 2013), serta pengadaan biji tergantung musim (Bakhshaie *et al.* 2016). Sifat-sifat tersebut secara langsung akan menghambat waktu dalam budidaya dan perbanyakan secara generatif. Oleh karena itu, perlu dilakukan perbanyakan vegetatif melalui kultur jaringan secara *in vitro*.

Pendekatan melalui teknik kultur jaringan secara *in vitro* merupakan upaya perbanyakan tanaman yang potensial untuk mendukung pengadaan benih *L. longiflorum*. Teknik ini dapat memproduksi tanaman dengan kualitas yang baik (Kanchanapoom *et al.* 2011), menjanjikan bibit secara massal, cepat dan memiliki keseragaman genetik yang bebas dari kontaminan (Minarsih *et al.* 2016), serta terbukti paling efisien untuk propagasi dan multiplikasi pada genus *Lilium* (Bhandari & Aswath 2018).

Keberhasilan kultur jaringan juga didukung dengan pemilihan eksplan yang tepat. Pramanik dan Rachmawati (2010) menyatakan bahwa di dalam eksplan sisik umbi terdapat kandungan sitokinin endogen yang tinggi sehingga dapat menginduksi tunas dengan cepat. Paric *et al.* (2011) melaporkan bahwa eksplan sisik umbi memiliki kemampuan yang tinggi dalam regenerasi sebesar 100 %. Aslam *et al.* (2013) menyatakan bahwa metode propagasi yang paling baik dan proliferaif pada *Lilium* adalah kultur sisik umbi, dan data terbaru menunjukkan bahwa eksplan sisik umbi *L. longiflorum* merupakan eksplan terbaik dalam membentuk tunas dan umbi mikro *in vitro* (Lestari & Deswiniyanti 2020).

Keberhasilan tersebut akhirnya digunakan sebagai awal mula dalam pengembangan *L. longiflorum*. Secara kuantitatif, pembentukan kalus mampu menghasilkan jumlah planlet yang lebih banyak dibandingkan dengan perbanyakan secara konvensional (Kurniati *et al.* 2012), serta menghasilkan kandungan metabolit sekunder yang jauh lebih banyak daripada metabolit sekunder yang diambil langsung dari tanaman (Mahadi *et al.* 2016). Induksi kalus dapat dilakukan pada bagian tanaman manapun (Rasud & Bustaman 2020) dan memiliki sifat perakaran yang sama dengan bibit yang berasal dari biji (Lestari 2011).

Respons pertumbuhan pada induksi kalus sisik umbi *L. longiflorum* dengan zat pengatur tumbuh (ZPT) 2,4-D dan BAP secara spesifik belum pernah dilaporkan. Selain itu, tingkat sensitivitas setiap tumbuhan bahkan eksplan terhadap pemberian auksin dan sitokinin berbeda-beda sehingga respons pertumbuhan pun berbeda juga. Oleh karena, itu penelitian respons pertumbuhan terhadap induksi kalus ini sangat menarik dan penting dilakukan untuk memperoleh suatu protokol yang efisien dalam perbanyakan *L. longiflorum*. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis respons pertumbuhan kalus dari induksi eksplan sisik umbi *L. longiflorum* oleh kombinasi perlakuan 2,4-D dan BAP *in vitro*, dan menganalisis respons pertumbuhan dan regenerasi kalus akibat penambahan zat pengatur tumbuh BAP dan NAA.

2. Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2018 sampai Juni 2020. Proses induksi, subkultur dan regenerasi dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Perikanan dan Biologi, Universitas Bangka Belitung.

2.1. Eksplan

Eksplan yang digunakan untuk induksi kalus, yaitu sisik umbi dari planlet *L. longiflorum in vitro* steril. Sebelum diinduksi, rumpun planlet *in vitro* disubkultur terlebih dahulu pada media MS (Murashige & Skoog 1962) tanpa zat pengatur tumbuh selama 2 minggu sebelum dipindahkan ke media induksi kalus (Delidha 2016).

2.2. Induksi kalus

Perlakuan untuk induksi kalus adalah kombinasi penambahan ZPT dalam media dan pencahayaan selama inkubasi kultur. Perlakuan 1: MS + 3,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ BAP, inkubasi dalam keadaan gelap 24 jam (Tang *et al.* 2010), dan perlakuan 2: MS + 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ BAP, inkubasi dengan fotoperiode 16/8 jam gelap/terang (Panwar *et al.* 2017). Masing-masing perlakuan induksi kalus memiliki 3 ulangan dengan 5 eksplan setiap ulangan. Variabel pengamatan yang diamati berupa ukuran (panjang, lebar dan tinggi), kesintasan, dan persentase kalus yang mengalami pencoklatan (*browning*). Pengamatan tersebut dilakukan setiap 4 minggu sekali.

Kalus yang berhasil terinduksi kemudian disubkultur sebanyak 3 kali dengan periode subkultur 1 bulan (4 minggu) (Rachmawati *et al.* 2014). Parameter yang diamati selama periode subkultur ini yakni ukuran, kesintasan, persentase kalus yang mengalami pencoklatan (*browning*) dan jumlah tunas.

2.3. Regenerasi kalus menjadi tunas

Kalus *L. longiflorum* dari subkultur ketiga (usia 12 minggu) pada perlakuan 2 dipindah pada media regenerasi yang terdiri dari 3,4 mg L⁻¹ BAP + 0,09 mg L⁻¹ NAA (Kanchanapoom *et al.* 2011). Kalus kemudian diinkubasi selama 4 minggu dalam ruang inkubasi pada suhu 20 °C dalam keadaan terang

24 jam hingga membentuk tunas (Fauziah *et al.* 2019).

Variabel penelitian yang diamati, yaitu jumlah tunas, panjang daun, jumlah daun, jumlah akar, kesintasan kalus, dan persentase *browning*. Penghitungan jumlah tunas dilakukan pada kalus yang terdapat tonjolan berwarna hijau muda (Prayoga 2009). Perhitungan jumlah daun dilakukan pada tunas yang sudah memiliki daun sepanjang 1 cm. Panjang daun yang diukur dari pangkal hingga ujung daun menggunakan mistar.

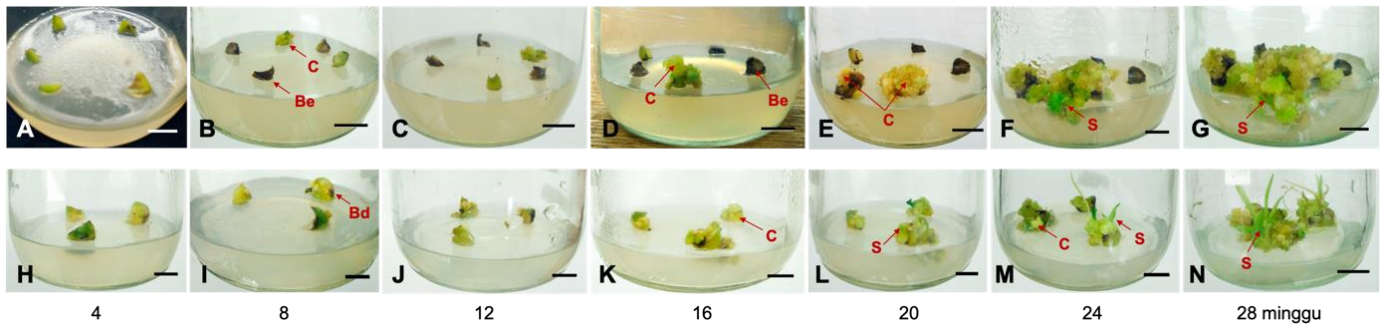
2.4. Analisis data

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor tunggal, yaitu pemberian zat pengatur tumbuh (ZPT) yang dikombinasikan dengan foto periode saat proses inkubasi kultur. Data kuantitatif dianalisis dengan analisis ragam (*analysis of variant*) dengan taraf 5 % menggunakan program SPSS versi 17 untuk mengetahui pengaruh beda pada setiap perlakuan, sedangkan data kualitatif dianalisis secara deskriptif.

3. Hasil

3.1. Induksi kalus dari sisik umbi *in vitro Lilium longiflorum*

Zat pengatur tumbuh (ZPT) pada perlakuan 1 (3,0 mg L⁻¹ 2,4-D dan 0,5 mg L⁻¹ BAP, 24 jam gelap) mampu menginduksi kalus dari eksplan sisik umbi *in vitro L. longiflorum* dalam waktu 8 minggu sebanyak 20 %, namun hanya 6,66 % saja yang berhasil hidup hingga 28 minggu (Tabel 1). Pada perlakuan 2 (1,5 mg L⁻¹ 2,4-D dan 1,0 mg L⁻¹ BAP, fotoperiode 16/8 jam) ZPT mampu menginduksi kalus dalam 4 minggu dengan pembentukan kalus mencapai 100 % (Tabel 1). Hasil induksi kalus pada perlakuan 1 (Gambar 1A) menunjukkan secara jelas pada minggu ke-4 mulai terdapat titik-titik cokelat pada eksplan (*brown dot*). Kalus mulai terbentuk pada minggu ke-8, berwarna hijau kekuningan dan bertekstur kompak (Gambar 1B) dengan tingkat kesintasan yang rendah (6,66 %) hingga minggu ke-28 (Tabel 1). Kalus mulai berproliferasi pada minggu ke-20 (Gambar 1E) dan mulai terbentuk tunas berwarna hijau pada minggu ke-24 (Gambar 1F).



Gambar 1. Pertumbuhan kalus dari eksplan sisik umbi in vitro *L. longiflorum* selama 28 minggu pada perlakuan media induksi kalus. A-G: Eksplan ditanam pada perlakuan 1, media MS + 3,0 mg L-1 2,4-D + 0,5 mg L-1 BAP dalam keadaan 24 jam gelap. H-N: Eksplan ditanam pada perlakuan 2, media MS + 1,5 mg L-1 2,4 + 1,0 mg L-1 BAP dengan fotoperiode 16/8 jam. Tanda panah merah menunjukkan: Brown dot (Bd); Browning explant (Be); Callus (C); Shoot (S). Skala: 10 mm.

Tabel 1. Pengaruh perlakuan kombinasi ZPT (2,4-D dan BAP) dan pencahayaan pada persentase tingkat kesintasan dan browning pada kalus dari eksplan sisik umbi selama 28 minggu.

Perlakuan	Minggu ke-	Kesintasan (%)	Browning (%)
Perlakuan 1 MS + 3,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ BAP, 24 jam gelap	4	0	0
	8	20	80
	12	6,66	93,33
	16	6,66	93,33
	20	6,66	93,33
	24	6,66	93,33
	28	6,66	93,33
Perlakuan 2 MS + 1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L ⁻¹ BAP, fotoperiode 16/8 jam	4	100	0
	8	100	0
	12	100	0
	16	100	0
	20	100	0
	24	100	0
	28	100	0

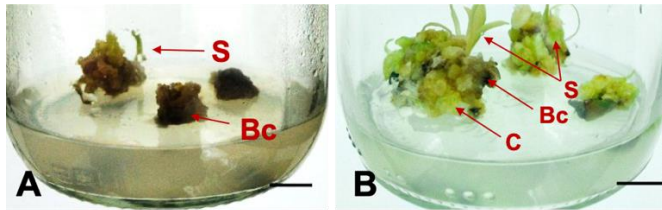
Pada perlakuan 2, respons pembentukan kalus terjadi lebih cepat dibandingkan pada perlakuan 1. Eksplan sisik umbi *L. longiflorum* membengkak (*swelling*) dan mulai terbentuk kalus berwarna hijau kekuningan dan bertekstur kompak pada minggu ke-4 (Gambar 1H). Selama 28 minggu kalus

terus berproliferasi (Gambar 1N) dengan tingkat kesintasan sebesar 100 % (Tabel 1) sehingga berpengaruh pada ukuran kalus yang lebih besar dibandingkan dengan ukuran kalus pada perlakuan 1 dan secara statistik berbeda nyata (Tabel 2).

Tabel 2. Pengaruh perlakuan kombinasi ZPT (2,4-D dan BAP) dan pencahayaan pada pertambahan ukuran kalus selama 28 minggu.

Ukuran (mm)	Perlakuan	Waktu Induksi (minggu)						
		4	8	12	16	20	24	28
Panjang	1	0,00±0,00 b	0,26±0,32 b	0,20±0,40 b	0,33±0,66 b	1,33±2,66 b	2,33±4,66 b	3,46±6,93 b
	2	2,13±0,65 a	3,33±0,76 a	5,40±0,16 a	7,33±2,14 a	8,93±2,31 a	10,50±2,62 a	12,53±2,72 a
Lebar	1	0,00±0,00 b	0,33±0,42 b	0,26±0,53 b	0,66±1,33 b	1,13±2,26 b	1,66±3,33 b	1,66±3,33 b
	2	1,66±0,21 a	2,60±0,48 a	3,60±0,67 a	4,86±0,93 a	6,20±1,10 a	7,53±0,97 a	9,33±1,05 a
Tinggi	1	0,00±0,00 b	0,26±0,32 b	0,20±0,40 b	0,73±1,46 b	1,06±2,13 b	1,26±2,53 b	2,00±4,00 b
	2	1,80±0,45 a	3,20±0,71 a	4,60±0,99 a	6,26±0,95 a	7,86±1,20 a	9,10±0,94 a	10,86±1,43 a

Keterangan: rerata±standar deviasi. Angka-angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji ANOVA dengan $\alpha = 5\%$.



Gambar 2. Perkembangan kalus selama 4 minggu setelah subkultur. A) Eksplan ditanam pada perlakuan 1, media MS + 3,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ BAP dalam keadaan 24 jam gelap. B) Eksplan ditanam pada perlakuan 2, media MS + 1,5 mg L⁻¹ 2,4 + 1,0 mg L⁻¹ BAP dengan fotoperiode 16/8 jam. Tanda panah merah menunjukkan: *Brown callus* (Bc); *Callus* (C); (S) *Shoot*. Skala: 10 mm.

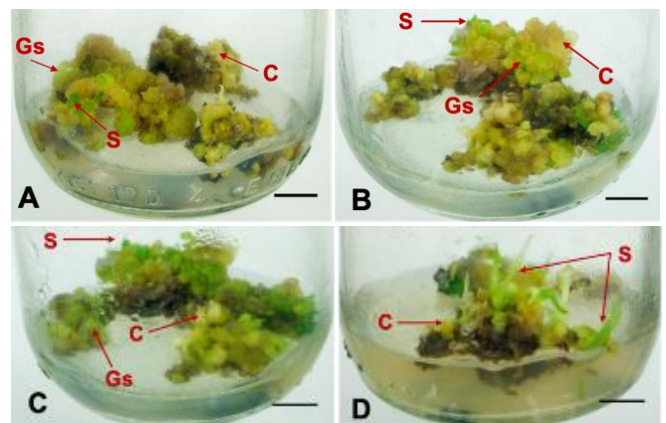
Setelah proses induksi, kalus disubkultur pada media dan kondisi pencahayaan yang sama selama 12 minggu. Hasil yang diperoleh dari tahap subkultur minggu ke-4 pada perlakuan 1, yaitu seluruh kalus mengalami *browning* dan mati (Gambar 2A) sehingga tidak terdapat kalus yang berhasil dilanjutkan dalam tahap subkultur minggu ke-8 dan ke-12 (Tabel 3). Sementara itu, respons pertumbuhan tampak pada kalus hasil induksi perlakuan 2, ditandai dengan ukuran kalus yang semakin besar karena proliferasi sel (Gambar 2B). Namun demikian, kalus pada perlakuan 2 juga mulai mengalami *browning* pada minggu ke-4 subkultur (6,6 %) dan terus meningkat hingga mencapai 40 % pada minggu ke-12 sehingga menyisakan 60 % kalus yang bertahan hidup (Tabel 3).

3.2. Regenerasi kalus membentuk tunas

Pembentukan tunas ditandai dengan adanya tonjolan berwarna hijau pada permukaan kalus. Hasil pada Gambar 1 dan 2 menunjukkan bahwa respons organogenesis pada kalus dipengaruhi oleh faktor cahaya. Pada perlakuan 1, eksplan ditanam pada keadaan gelap, regenerasi kalus menjadi tunas

mulai tampak pada minggu ke-24 (Gambar 1F). Sementara itu, respons organogenesis terjadi lebih cepat pada eksplan yang ditanam pada perlakuan 2 (pencahayaan fotoperiode 16/8 jam), dimana tunas mulai tumbuh pada kalus yang berusia 20 minggu dan pada minggu ke-24 sudah terbentuk daun (Gambar 2L-M).

Setelah kalus dipindah pada media regenerasi dengan pencahayaan penuh (24 jam), kalus tampak lebih responsif dalam membentuk tunas (Gambar 3 dan Tabel 4). Tabel 4 menunjukkan bahwa pembentukan tunas terus meningkat selama 4 minggu, yaitu rata-rata tunas sebanyak 16,29 tunas per kalus dengan tingkat kesintasan 100 %. Rata-rata pembentukan daun juga teramati semakin banyak, yaitu 5,43 daun per tunas dengan rata-rata panjang daun adalah 19,58 mm. Pada media regenerasi dengan pencahayaan penuh ini teramati tidak ada kalus yang membentuk akar.



Gambar 3. Regenerasi kalus selama empat minggu pada media regenerasi MS + 0,09 mg L⁻¹ NAA + 3,4 mg L⁻¹ BAP dengan pencahayaan penuh (24 jam). Kalus usia: A) 1 minggu; B) 2 minggu; C) 3 minggu; D) 4 minggu. Tanda panah merah menunjukkan: *Callus* (Ca); *Green spot* (Gs); *Shoot* (S). Skala: 10 mm.

Tabel 3. Pengaruh perlakuan kombinasi ZPT (2,4-D dan BAP) dan pencahayaan pada daya hidup (kesintasan) dan pertumbuhan kalus selama 12 minggu setelah subkultur pada media yang sama.

Perlakuan	Minggu ke-	Kesintasan (%)	<i>Browning</i> (%)	Rerata ukuran kalus (mm)		
				Panjang	Lebar	Tinggi
Perlakuan 1 MS + 3,0 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L ⁻¹ BAP, 24 jam gelap	4	0	100	3,46±6,93	1,66±3,33	2,00±4,00
	8	0	100	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	12	0	100	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Perlakuan 2 MS + 1,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L ⁻¹ BAP, fotoperiode 16/8 jam	4	93,4	6,6	13,90±2,83	10,90±0,98	13,06±1,25
	8	86,7	13,3	15,16±4,54	11,60±2,78	13,93±3,76
	12	60,0	40,0	26,08±5,25	17,79±3,78	18,37±4,16

Keterangan: rerata±standar deviasi.

Tabel 4. Pengaruh kombinasi ZPT (BAP dan NAA) dan pencahayaan penuh pada daya hidup (kesintasan) dan regenerasi kalus selama 4 minggu setelah dipindah pada media regenerasi.

Media Regenerasi	Minggu ke-	Kesintasan (%)	<i>Browning</i> (%)	Rerata			
				Jumlah tunas	Jumlah daun	Panjang daun (mm)	Jumlah akar
MS + 3,4 mg L ⁻¹ BAP + 0,09 mg L ⁻¹ NAA	1	100	0	5,25 ± 1,49	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	2	100	0	7,83 ± 2,62	1,6 ± 1,24	10,20 ± 0,16	0,00 ± 0,00
	3	100	0	12,00 ± 2,83	2,4 ± 1,49	13,12 ± 0,12	0,00 ± 0,00
	4	100	0	16,29 ± 2,41	5,43 ± 3,95	19,58 ± 0,32	0,00 ± 0,00

Keterangan: rerata ± standar deviasi.

4. Pembahasan

4.1. Induksi kalus dari sisik umbi *in vitro* *Lilium longiflorum*

Eksplan *in vitro* sisik umbi *L. longiflorum* secara umum mampu membentuk kalus pada perlakuan 1 (MS + 3,0 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,5 mg L⁻¹ BAP, diinduksi dalam 24 jam gelap) dan perlakuan 2 (MS + 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ BAP, fotoperiode 16/8 jam) dengan respons pertumbuhan yang bervariasi. Respons awal pada tahap induksi kalus berbeda-beda. Bagian eksplan yang dipotong mengalami pembengkakan (*swelling*) dan tumbuh kalus dari bagian bawah sisik umbi yang tertanam dalam media. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Sitinjak *et al.* (2015) bahwa kalus yang terbentuk dimulai pada bagian yang kontak dengan media dengan ciri morfologi berupa pembengkakan eksplan yang menandakan adanya aktivitas proliferasi sel dalam eksplan. Munculnya kalus pada eksplan secara *in vitro* merupakan respons dari adanya penambahan jenis dan konsentrasi ZPT eksogen, cahaya, serta adanya pelukaan pada eksplan sehingga menstimulasi jaringan di dalam eksplan untuk memunculkan reaksi pembentukan kalus sebagai respons untuk penutupan luka (Indah & Ermavitalini 2013; Ikeuchi *et al.* 2013; Chen *et al.* 2019).

Dalam penelitian ini, dua perlakuan induksi menghasilkan respons pembentukan kalus yang berbeda. Konsentrasi 2,4-D yang tinggi dalam media kultur serta keadaan gelap (perlakuan 1) menginduksi pembentukan kalus lebih lambat (8 minggu) dibandingkan dengan konsentrasi 2,4-D yang lebih rendah pada fotoperiode 16/8 jam (perlakuan 2) (4 minggu). Hal ini kemungkinan disebabkan konsentrasi auksin 2,4-D yang melebihi batas optimum pada pembentukan kalus dari eksplan. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Harahap *et al.* (2019) bahwa tingginya konsentrasi auksin 2,4-D dapat menyebabkan penundaan dan penghambatan dalam

pembentukan kalus pada eksplan umbi nanas Sipahutar. Menurut Zuyasna *et al.* (2014), konsentrasi auksin eksogen yang lebih tinggi dari batas optimum akan mengakibatkan jaringan memproduksi senyawa etilen yang menghambat pertumbuhan sel.

Perlakuan 1 juga menghasilkan respons kematian eksplan yang jauh lebih tinggi dibandingkan pada perlakuan 2. Kematian eksplan disebabkan oleh *browning* yakni jaringan mengalami pencokelatan sebagai respons pengaruh fisik, seperti pelukaan yang memicu oksidasi senyawa fenolik (Ahmad *et al.* 2013), konsentrasi ZPT eksogen yang tidak optimal (Chen *et al.* 2019), serta kalus memasuki fase stasioner (penuaan) (Purnamaningsih & Ashrina 2011). Senyawa fenolik, seperti flavonoid merupakan metabolit sekunder yang terdapat di seluruh organ terutama pada Famili *Liliaceae*, *Leguminosae*, *Polygonaceae* dan *Scrophulariaceae* (Lestari *et al.* 2018). Jin *et al.* (2012) melaporkan bahwa 6 spesies *Lilium* (*L. regale*, *L. concolor*, *L. pumilum*, *L. leucanthum*, *L. davidii* var. *unicolor* dan *L. lancifolium*) memiliki senyawa fenolik yang tinggi pada bagian sisik umbi. Konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan pada media kultur juga dapat menjadi penyebab *browning*. Zuyasna *et al.* (2014) menyatakan konsentrasi auksin yang tinggi meningkatkan sintesis etilen yang menyebabkan *browning* dan penghambatan pertumbuhan sel. Walaupun senyawa 2,4-D lebih efektif bekerja dalam keadaan gelap (Kurniati *et al.* 2012), namun berdampak buruk jika diberikan dalam konsentrasi yang tidak tepat.

Hasil induksi kalus perlakuan 1 banyak eksplan gagal membentuk kalus. Hal tersebut kemungkinan akibat perbedaan kemampuan jaringan menyerap unsur hara dan zat pengatur tumbuh dalam media induksi (Ibrahim *et al.* 2010), jumlah sel kompeten dalam setiap eksplan tidak selalu sama (Budiarto *et al.* 2015), serta perbedaan kemampuan jaringan dalam menyerap air dan unsur hara seperti proses

difusi, osmosis dan tekanan turgor sel (Marthani *et al.* 2016). Selain itu, tingginya konsentrasi auksin 2,4-D yang melebihi batas optimum diduga mengakibatkan sel dipaksa melakukan pemanjangan dan peregangan secara terus menerus dan cepat, sehingga sel tidak mendapatkan kesempatan untuk kembali ke proses yang normal (Harahap *et al.* 2019).

Dari hasil penelitian didapatkan kalus cokelat pada perlakuan pertama dan berwarna hijau kekuningan pada kedua perlakuan. Widyawati (2010) menyatakan bahwa kalus berwarna hijau disebabkan akibat pengaruh pemberian sitokinin dalam pembentukan klorofil. Anggraeni dan Iriawati (2017) menegaskan bahwa pemberian sitokinin berperan penting dalam memperlambat senescence (penuaan) dengan cara menghambat perombakan butir klorofil dan protein dalam sel. Sedangkan, kalus yang berwarna kuning menandakan bahwa kalus masih tetap memiliki kemampuan proliferasi yang baik. Warna kuning merupakan hasil dari akumulasi pigmen flavonoid pada sel parenkim penyusun kalus (Wijayanto 2016).

Salah satu variabel pengamatan yang berguna untuk menggambarkan kondisi kalus adalah tekstur kalus. Tekstur kalus yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah kompak. Kalus kompak menurut Fiah *et al.* (2014) merupakan kalus yang memiliki tonjolan-tonjolan nodular yang akan berkembang menjadi calon organ apabila dirangsang dengan ZPT, padat dan keras, tersusun dari sel-sel kecil yang rapat, dan tidak dapat dipisahkan menjadi 1 sel (Wijawati *et al.* 2019). Tekstur kalus kompak karena lignifikasi, kalus memiliki tekstur lebih keras oleh sitokinin yang berperan dalam transport zat hara (Mahadi *et al.* 2016).

Kalus kompak pada penelitian ini mengalami organogenesis tidak langsung dengan membentuk tunas. Diduga efek sitokinin endogen dan eksogen serta interaksinya dengan auksin berperan penting dalam pertumbuhan tunas, dan hanya sel yang kompeten saja yang mampu menghasilkan tunas (Sari *et al.* 2014). Balilashaki *et al.* (2015) menjelaskan bahwa pertumbuhan kalus dapat mengarah ke pembentukan tunas jika konsentrasi sitokinin dan auksin tepat dalam menginduksi pertumbuhan tunas. Sejalan dengan penelitian Muliati *et al.* (2017) bahwa konsentrasi BAP yang rendah mampu merangsang terbentuknya kalus dan tunas, tunas merangsang pertumbuhan daun sehingga jumlah daun menjadi bertambah. Nurchayati *et al.* (2018) menjelaskan bahwa BAP mampu mengaktifkan gen-gen untuk membentuk tunas dan berperan dalam menstimulasi diferensiasi sel.

Proses subkultur kalus dalam penelitian ini sangat penting dalam meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan kalus. Hasil subkultur setelah minggu ke-4 dari perlakuan 1 mengalami penurunan kesintasan kalus hingga 0 % akibat *browning* walaupun berasal dari sumber kalus yang berwarna hijau. Hal ini diduga karena sel masih beradaptasi pada media baru dengan konsentrasi auksin yang tinggi, sehingga memunculkan respons pencokelatan dan kematian kalus. Menurut Fauzy *et al.* (2016), sel-sel muda yang sehat dan berwarna kuning dapat berubah menjadi cokelat seiring dengan pertumbuhan kalus yang semakin tua dan diduga sebagai respons stres terhadap faktor eksternal sel. Selain itu, diduga karena ZPT dalam perlakuan 1 belum mencapai keseimbangan konsentrasi dalam membentuk kalus.

Hasil subkultur perlakuan kedua juga mengalami penurunan kesintasan kalus menjadi 60 %. Namun, daya proliferasi pada subkultur kalus *L. longiflorum* mengalami peningkatan pada minggu ke-4 hingga minggu ke-12 dilihat dari ukuran kalus yang semakin besar. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Wulansari *et al.* (2015) bahwa subkultur berulang pada kalus jeruk tidak mengurangi kemampuan proliferasi dan morfologinya. Hal ini kemungkinan karena perlakuan 1 meningkatkan respons pertumbuhan pada kalus sehingga sel-sel kalus masih memiliki kemampuan proliferasi yang baik dan mempertahankan sifat kompeten untuk beregenerasi ke tahap pembentukan tunas.

4.2. Regenerasi tunas dari kalus *L. longiflorum in vitro*

Kalus yang kompeten adalah kalus yang memiliki kemampuan untuk beregenerasi menjadi tunas. Awal pembentukan tunas ditandai dengan perubahan warna kalus dari hijau kekuningan menjadi hijau (*green spot*). Menurut Hapsoro dan Yusnita (2016), warna hijau pada kalus merupakan akibat dari peningkatan sintesis klorofil karena pengaruh sitokinin. *Green spot* pada kalus selanjutnya membentuk tunas dan berdiferensiasi menjadi daun. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kalus yang berasal dari perlakuan 2 memiliki tingkat regenerasi yang tinggi dengan jumlah tunas yang semakin banyak selama 4 minggu pada media regenerasi, sementara keseluruhan kalus dari perlakuan 1 mengalami kematian bahkan sebelum dipindah ke media regenerasi.

Faktor ZPT juga mempengaruhi pembentukan dan pertumbuhan tunas. Dalam penelitian ini, konsentrasi sitokinin pada perlakuan 2 lebih tinggi daripada perlakuan 1. Selain itu, konsentrasi sitokinin pada media regenerasi lebih tinggi daripada konsentrasi auksin. Menurut Nabila *et al.*

(2020) konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi daripada auksin dapat memicu pembentukan tunas. Hal ini sesuai dengan penelitian Anisah *et al.* (2015) bahwa tunas *Dendrobium* sp. teramati tumbuh lebih banyak pada media yang mengandung sitokinin yang lebih tinggi. Selain itu, penelitian Deswiniyanti dan Lestari (2020) juga menggunakan konsentrasi 1 mg L⁻¹ BAP dan 0,5 mg L⁻¹ NAA pada kalus *L. longiflorum* dari eksplan sisik umbi dalam membentuk tunas.

Sebagai bentuk respons organogenesis, kalus tidak membentuk akar. Menurut Roostika *et al.* (2012), organogenesis hanya menghasilkan 1 kutub pertumbuhan (unipolar), yaitu tunas atau akar saja. Oleh karena itu, perlu dilakukan tahap subkultur ke media yang mengandung auksin lebih tinggi daripada sitokinin untuk menginduksi respons organogenesis dalam membentuk akar. Hasil penelitian ini serupa dengan hasil penelitian Sari *et al.* (2014) bahwa penambahan 4 mg L⁻¹ BAP dan 0,2 mg L⁻¹ NAA hanya mampu menghasilkan tunas tanpa membentuk akar.

5. Kesimpulan

Media kultur MS + 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ BAP yang dikombinasikan dengan pencahayaan fotoperiode 16/8 jam (perlakuan 2) menginduksi pembentukan kalus dari eksplan sisik umbi *L. longiflorum* lebih baik, dengan seluruh kalus berhasil hidup dengan tingkat proliferasi yang tinggi setelah disubkultur pada media induksi maupun pada media regenerasi. Kalus bertekstur kompak dan berwarna hijau kekuningan serta memiliki kemampuan organogenesis yang tinggi dalam membentuk tunas. Penelitian ini merekomendasikan perlakuan 2 sebagai sebuah protokol efektif untuk pengembangan *L. Longiflorum*.

6. Pernyataan Konflik Kepentingan (Declaration of Conflicting Interests)

Penulis menyatakan tidak ada potensi konflik kepentingan sehubungan dengan penelitian, kepengarangan, dan/atau publikasi dari artikel ini (*The authors have declared no potential conflicts of interest concerning the study, authorship, and/or publication of this article*).

7. Daftar Pustaka

- Ahmad I, Hussain T, Ashraf I, Nafees M, Maryam, Rafay M, Iqbal M. 2013. Lethal Effects of Secondary Metabolites on Plant Tissue Culture. *American-Eurasian Journal Agriculture and Environment Science*, 13 (4): 539-547.
- Ali A, Yasmin S, Niazi RS, Majid A, Naveed NH. 2013. Role of Different Cytokinins and Auxins for Micropropagation, Callogenesis and Plant Regeneration in *Lilium* (*Lilium longiflorum*). *Asian Journal of Chemistry*, 25 (1) :427-432.
- Anggraeni, Iriawati. 2017. Respon Antera *Lilium longiflorum* Thunb. dengan Berbagai Stadium Perkembangan Mikrospora pada Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh. *Jurnal Agrosainstek*, 1 (2): 49-55.
- Anisah S, Thumilisar C, Lestari T. 2015. Pengaruh Pemberian Jenis dan Konsentrasi Auksin Terhadap Induksi Perakaran pada Tunas *Dendrobium* Sp Secara *In Vitro*. *Bioma*, 11 (1): 56-66.
- Aslam F, Shagufta N, Amina T, Saiqa I, Kiran S. 2013. Rapid Multiplication of Ornamental Bulbous Plants of *Lilium orientalis* and *Lilium longiflorum*. *Pakistan Journal Botani*, 45 (6): 2051-2055.
- Bakhshaie M, Khosravi S, Azadi P, Bagheri H, Jaap MVT. 2016. Biotechnological Advances in *Lilium*. *Plant Cell Report*, 35: 1799-1826.
- Balilashaki K, Vahedi M, Karimi R. 2015. In Vitro Direct Regeneration from Node and Leaf Explant of *Phalaenopsis* cv. Surabaya. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 25 (2): 193-205.
- Bhandari NS, Aswath C. 2018. Standardization of an Effective Protocol for In Vitro Culture of *Lilium longiflorum* Thunb cv. Pavia. *International Journal Current Microbiology Applied Science*, 7 (4): 1183-1190.
- Budiarto R, Soeparjono S, Hariyono K. 2015. Induksi Kalus dan Daya Regenerasi *In Vitro* Berbagai Umur Kalus dan Kultivar Tebu Thailand (*Saccharum officinarum* L.). *Berkala Ilmiah Pertanian*, 1 (1): 1-6.
- Chen YM, Huang JZ, Hou TW, Pan IC. 2019. Effects of Light Intensity and Plant Growth Regulators on Callus Proliferation and Shoot Regeneration in the Ornamental Succulent *Haworthia*. *Botanical Studies*, 60 (10): 1-8.
- Delidha D. 2016. Pengaruh Kekuatan Media MS dan Konsentrasi Paclobutrazol Terhadap Pertumbuhan dan Multiplikasi Tunas Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Secara *In Vitro* [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor. 51 hlm.
- Deswiniyanti NW, Astarini IA, Puspawati NM. 2012. Studi Fenologi Perbungaan *Lilium longiflorum* Thunb. *Jurnal Metamorfosa*, 1 (1): 6-10.
- Deswiniyanti NW, Lestari NKD. 2020. In Vitro Propagation of *Lilium longiflorum* Bulbs Using NAA and BAP Plant Growth Regulator Treatment. *Life Sciences*, 45: 32-45.

- Fauziah RH, Kusmiyati F, Anwar S. 2019. *Lilium longiflorum* Plant Growth with a combination of Naphtylacetic Acid (NAA) and 6-Benzylaminopurine (BAP) In Vitro. *Journal Tropical Crop Science and Technology*, 1 (2): 78-92.
- Fauzy E, Mansyur, Husni A. 2016. Pengaruh Penggunaan Media Murashige dan Skoog (MS) dan Vitamin Terhadap Tekstur, Warna, dan Berat Kalus Rumpuk Gajah (*Pennisetum purpureum*) CV. Hawah Pasca Radiasi Sinar Gamma pada Dosis LD50. *Student E-Journal*, 5 (4): 1-22.
- Fiah RL, Taryono, Toekidjo. 2014. Kemampuan Regenerasi Kalus Empat Klon Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Vegetalika*, 3 (1): 91-102.
- Hapsoro D, Yusnita. 2016. *Kultur Jaringan untuk Perbanyak Klonal Kelapa Sawit (Elaeis guineensis* Jaeq.). Aura Publishing: Lampung.
- Harahap F, Diningrat DS, Poerwanto R, Nasution NEA, Hasibuan RFM. 2019. In Vitro Callus Induction of Sipahutar Pineapple (*Ananas comosus* L.) from North Sumatra Indonesia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 22 (11): 518-526.
- Haryati BZ. 2015. Pengaruh Pemberian Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Pembentukan Tunas Bunga Lili (*Lilium longiflorum* Thunb.) secara *In Vitro*. *Jurnal KIP*, 3 (3): 667-673.
- Herlina D, Samijan, Winarto B. 2020. Responses of Lily Types in Different Vernalization Periods on Vegetative and Generative Growth Performances of Lily. *South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment*, 11 (1): 1-14.
- Ibrahim MSD, Rostiana O, Khumaida N. 2010. Pengaruh Umur Eksplan Terhadap Keberhasilan Pembentukan Kalus Embriogenik pada Kultur Meristem Jahe (*Zingiber officinale* Rose). *Jurnal Littri*, 16 (1): 37-42.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. 2013. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *Plant Cell*, 25: 3159-3173.
- Indah PN dan Ermavitalini D. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2 (1): 2337-3520.
- Jin L, Zhang Y, Yan L, Guo Y, Niu L. 2012. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Bulb Extracts of Six *Lilium* Species Native to China. *Molecules*, 17: 9361-9378.
- Kanchanapoom K, Ponpiboona T, Wirakiatb W. 2011. Regeneration of Lily (*Lilium longiflorum* 'Easter lily') by Callus Derived from Leaf Explants Cultured In Vitro. *Science Asia*, 37: 373-376.
- Kim K, Hwang YJ, Lee SC, Yang TJ, Lim KB. 2015. The Complete Chloroplast Genome Sequence of *Lilium hansonii* Leichtlin ex D.D.T. Moore. *Mitochondrial DNA. MappSeq Anal*, 27 (5): 3678-3690.
- Kurniati R, Purwito A, Wattimena GA, Marwoto B, Supenti. 2012. Induksi Kalus dan Bulblet Serta Regenerasi Tanaman Lili Varietas Sorbon dari Tangkai Sari Bunga. *Journal Horticulture*, 22 (4): 303-308.
- Lestari DM, Mahmudati N, Sukarsono, Nurwidodo, Husamah. 2018. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fenol Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb). *Biosfera*, 35 (1): 37-43.
- Lestari EG. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyak Tanaman Melalui Kultur Jaringan. *Agrobiogen*, 7 (1): 63-68.
- Lestari NKD, Deswiniyanti NW. 2020. In Vitro Propagation of *Lilium longiflorum* Bulbs Using NAA and BAP Plant Growth Regulator Treatment. *Life Sciences*, 45: 32-45.
- Lestari NKD, Deswiniyanti NW, Astarini IA, Arpiwi LM. 2020. Morphogenesis *in vitro* Flower Pedicel of *Lilium longiflorum* with NAA and BAP. IC-BIOLIS The 2019 International Conference on Biotechnology and Life Sciences, 18-31.
- Mahadi I, Syafi'i W, Sari Y. 2016. Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) Menggunakan Hormon 2,4-D dan BAP dengan Metode *In Vitro*. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 21 (2): 84-89.
- Marthani QKA, Anggraito YU, Rahayu ES. 2016. Kalogenesis Eksplan Setengah Biji Koro Benguk (*Mucuna pruriens* L.) Secara *In Vitro* Menggunakan BAP dan NAA. *Life Science*, 5 (1): 72-78.
- Minarsih H, Suharyo, Riyadi I, Ratnadewi D. 2016. Pengaruh Jumlah Subkultur dan Media Sub-optimal Terhadap Pertumbuhan dan Kemampuan Regenerasi Kalus Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Menara Perkebunan*, 84 (1): 28-40.
- Muliati, Nurhidayah T, Nurbaiti. 2017. Pengaruh NAA, BAP, dan Kombinasinya pada Media MS Terhadap Perkembangan Eksplan *Sansevieria macrophylla* Secara *In Vitro*. *Jomfaperta*, 4 (1): 1-13.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiology Plantarum*, 15: 473-479.

- Nabila TN, Rugayah, Karyanto A, Widagdo S. 2020. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Alami pada Pertumbuhan *Seedling* Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal Agrotek Tropika*, 8 (3): 493-500.
- Nurchayati Y, Santosa, Laurentius H, Nugroho, Indrianto A. 2018. Penggunaan Kinetin, Asam Naftalen Asetat, dan Benzil Adenin dalam Induksi Kalus Kecubung (*Datura metel* L.) Secara *In Vitro*. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 3 (1): 105-109.
- Panwar GS, Srivastava SK, Uniyal PL. 2017. Callus Mediated Organogenesis in *Lilium polyphyllum* D. Don ex Royle: a Critically Endangered *Astavarga* Plant. *Current Science*, 113 (5): 946-950.
- Pramanik D, Rachmawati F. 2010. Pengaruh Jenis Media Kultur *In Vitro* dan Jenis Eksplan terhadap Morfogenesis Lili Oriental. *Jurnal Hortikultura*, 20 (2): 111-119.
- Prayoga L. 2009. Pengaruh Media dan Konsentrasi BAP Terhadap Pertumbuhan Tunas Mikro Pisang Raja Secara *In Vitro*. *Agritech*, 11 (2): 96-106.
- Purnamaningsih R, Ashrina M. 2011. Pengaruh BAP dan NAA Terhadap Induksi Kalus dan Kandungan Artemisin dari *Artemisia annua* L. *Berita Biologi*, 10 (4): 481-489.
- Rachmawati F, Purwito A, Wiendi NMA, Mattjik NA, Winarto B. 2014. Perbanyakkan Massa Anggrek *Dendrobium Gradita* 10 Secara *In Vitro* Melalui Embriogenesis Somatik. *Jurnal Hortikultura*, 24 (3): 196-209.
- Rasud Y, Bustaman. 2020. Induksi Kalus secara *In Vitro* dari Daun Cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.) dalam Media dengan Berbagai Konsentrasi Auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25 (1): 67-72.
- Roostika I, Mariska I, Khumaida N, Wattimena GA. 2012. Indirect Organogenesis and Somatic Embryogenesis of Pineapple Induced by Dichlorophenoxy Acetic Acid. *AgroBiogen*, 8 (1): 8-18.
- Sari N, Suwarsi E, Sumadi. 2014. Optimasi Jenis dan Konsentrasi ZPT dalam Induksi Kalus Embriogenik dan Regenerasi menjadi Planlet pada *Carica pubescens* (Lenne & K.Koch) *Biosaintifika*, 6 (1): 52-59.
- Sitinjak MA, Isda MN, Fatonah S. 2015. Induksi Kalus dari Eksplan Daun *In Vitro* Keladi Tikus (*Typhonium* sp.) dengan Perlakuan 2,4-D dan Kinetin. *Al-Kaunyah Jurnal Biologi*, 8 (1): 32-39.
- Tang YP, Liu XQ, Gituru RW, Chen LQ. 2010. Callus Induction and Plant Regeneration from *In Vitro* Cultured Leaves, Petioles and Scales of *Lilium leucanthum* (Baker) Baker. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24 (4): 2071-2076.
- Widyawati G. 2010. Pengaruh Variasi Konsentrasi NAA dan BAP Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar [thesis]. Surakarta: Universitas Sebelas Maret. 55 hlm.
- Wijawati N, Habibah NA, Musafa F, Mukhtar K, Anggraito YU, Widiatningrum T. 2019. Pertumbuhan Kalus Rejasa (*Elaeocarpus grandiflorus*) dari Eksplan Tangkai Daun pada Kondisi Gelap. *Life Science*, 8 (1): 17-24.
- Wijayanto D. 2016. Induksi Kalus Embriogenik Jenis Eksplan Bulbil Bawang Putih CV. Tawangmangu Baru pada Beberapa Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh [skripsi]. Bogor: Departemen Agronomi dan Hortikultura, Institut Pertanian Bogor. 49 hlm.
- Wulansari A, Purwito A, Husni A, Sudarmonowati E. 2015. Kemampuan Regenerasi Kalus Embriogenik Asal Nuselus Jeruk Siam serta Variasi Fenotipe Tunas Regeneran. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 1 (1): 97-104.
- Zuyasna, Nurahmi E, Fajri R. 2014. Pengaruh Jenis Kakao dan Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Induksi Embrio Somatik Secara *In Vitro*. *Jurnal Floratek*, 9: 102-110.