

**Pengaruh Pemberian Elisitor Ekstrak Khamir pada Pertumbuhan Kultur Kalus Gembili dengan Penambahan ZPT 2,4-D dan Kinetin**

**Ananda Lutfiah, Noor Aini Habibah\***

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Gedung D6 Lt. 1, Kampus Sekaran Gunungpati, Semarang, Indonesia, 50229

E-mail: nooraini@mail.unnes.ac.id

Diterima 5 Agustus 2022

Disetujui 15 Oktober 2022

Dipublikasikan 28 Oktober 2022

**Abstrak**

Senyawa bioaktif pada tanaman gembili dapat dihasilkan lebih banyak dari kalus dibandingkan tanaman utuhnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian 2,4-D dan kinetin serta elisitor ekstrak khamir terhadap pertumbuhan kultur kalus gembili. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dua faktorial, yaitu kombinasi 2,4-D (1 ppm; 0,5 ppm) dan kinetin (1 ppm; 0,5 ppm) serta elisitor ekstrak khamir (0,5%; 1%; 2,5% (b/v)). Kalus berumur tiga bulan disubkultur dan diinkubasi selama 2,5 bulan. Kemudian dielisitasi dengan ekstrak khamir dan dipelihara selama 30 hari. Indikator pertumbuhan kalus yang diamati meliputi berat basah, warna dan tekstur kalus. Data dianalisis menggunakan ANOVA dua arah dan diuji lanjut dengan DMRT 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi 2,4-D dan kinetin berpengaruh terhadap rerata berat basah kalus. Sedangkan pemberian elisitor ekstrak khamir tidak berpengaruh terhadap rerata berat basah kalus gembili. Rerata berat basah kalus tertinggi sebesar 3,35 gram dicapai pada kombinasi 2,4-D 0,5 ppm + kinetin 0,5 ppm dengan elisitor 1% (b/v). Tekstur kalus yang dihasilkan pada seluruh perlakuan adalah remah dan berwarna coklat muda hingga coklat kehitaman.

Kata kunci: Dioscorea, elisitor, kalus, khamir, kinetin, 2,4-D

**Abstract**

*More bioactive compounds in gembili plants can be produced from callus than whole plants. This study aimed to determine the effect of 2,4-D and kinetin and yeast extract elicitor added to the growth of gembili callus culture. The research design used was a completely randomized design with two factors, a combination of ZPT 2,4-D (1 ppm; 0.5 ppm) and kinetin (1 ppm; 0.5 ppm) and yeast extract elicitor (0.5 ppm). %; 1%; 2.5% (w/v)). Three month old callus were subcultured and incubated for 2.5 months. Then it was elicited with yeast extract and maintained for 30 days. The callus growth indicators observed included callus wet weight, color and texture. Data were analyzed using two-way ANOVA and further tested with 5% DMRT. The results showed that the combination of 2,4-D and kinetin had an effect on the average wet weight of callus. While the provision of yeast extract elicitor did not affect the average wet weight of gembili callus. The highest callus wet weight average of 3.35 gram was achieved at the combination of 0.5 ppm ZPT 2,4-D + 0.5 ppm kinetin with elicitor 1% (b/v). The callus texture produced in all treatments was crumb and light brown to blackish brown in color.*

*Keywords: Dioscorea, elicitor, callus, yeast, kinetin, 2,4-D*

**How to cite:**

Lutfiah, A., Habibah, N. A. (2022). Pengaruh pemberian elisitor ekstrak khamir pada pertumbuhan kultur kalus gembili dengan penambahan ZPT 2,4-D dan kinetin. *Indonesian Journal of Mathematics and Natural Science*, 45(2), 77-83.

## PENDAHULUAN

Gembili (*Dioscorea esculenta*) merupakan salah satu tanaman pokok alternatif yang ada di Indonesia. Gembili banyak dimanfaatkan umbinya sebagai bahan makanan sumber karbohidrat. Belum banyak masyarakat yang mengetahui bahwa gembili memiliki potensi sebagai tanaman obat. Umbi gembili mengandung senyawa inulin sekitar 14,77% (Istianah, 2010). Metabolit sekunder lainnya yang dihasilkan dari umbi gembili adalah dioscorin dan diosgenin. Dioscorin adalah protein simpanan pada umbi gembili yang berperan sebagai antioksidan dan bermanfaat untuk kesehatan (Hou *et al.*, 2001). Terdapat penelitian tentang diosgenin yang menunjukkan beberapa aktivitas biologis seperti antibakteri, antiinflamasi, dan sebagai antioksidan yang efektif (Cong *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2015; Junchao *et al.*, 2017).

Metabolit sekunder dari tanaman dapat diproduksi secara efektif dengan teknik kultur jaringan. Penerapan teknik ini memiliki beberapa kelebihan, antara lain tidak bergantung pada iklim, tanah dan letak geografis, meningkatkan produktivitas dengan menurunkan biaya produksi, dan tidak memerlukan herbisida maupun pestisida (Ningsih, 2014). Kultur kalus sangat dipengaruhi oleh pemberian zat pengatur tumbuh, jenis eksplan dan kondisi lingkungan/media. Biasanya zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam kultur kalus adalah kombinasi auksin dan sitokinin. Penelitian Wahyuni *et al.* (2020) melaporkan bahwa kombinasi zat pengatur tumbuh NAA 3 ppm dan BAP 0,5 ppm mampu menghasilkan persentase kalus tertinggi pada eksplan *Aquilaria filaria*. Kombinasi BAP 0,5 ppm dan 2,4-D 1 ppm menghasilkan kalus terbaik pada eksplan daun vegetatif *Sonchus arvensis* L. (Rahayu & Suhayanto, 2020).

Elisitasi adalah teknik penambahan zat atau molekul dalam media pertumbuhan untuk menstimulasi respon stres sehingga meningkatkan metabolit sekunder pada tanaman (Narayani & Srivastava, 2017). Elisitor merupakan molekul atau zat yang menstimulasi respon pertahanan diri suatu tanaman. Elisitor adalah senyawa yang diberikan dalam konsentrasi yang rendah pada sel untuk menginisiasi peningkatan biosintesis senyawa-senyawa tertentu (Namdeo, 2007). Elisitor digolongkan dalam dua kelompok yaitu elisitor biotik dan abiotik. Elisitor abiotik dikelompokkan dalam faktor fisik dan senyawa kimia, sedangkan elisitor biotik bersumber dari agen hayati (Patel & Krishnamurthy, 2013). Contoh elisitor abiotik antara lain asam jasmonat, asam salisilat, cahaya, tekanan osmotik, cadmium, dan lain-lain. Beberapa contoh elisitor biotik antara lain hormon tumbuhan, derivat mikroorganisme (ekstrak khamir), dan derivat dinding sel (kitosan dan kitin) (Estrada *et al.*, 2016). Pada penelitian Yuliani *et al.* (2018), penambahan elisitor *Aspergillus sp.* sebanyak 4 mg/L pada kalus *Artemisia annua* L. memiliki kandungan senyawa artemisin yang paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Penambahan elisitor ekstrak khamir (*Saccharomyces cerevisiae*) dengan konsentrasi 0,5% pada agregat sel *Catharantus roseus* L. dapat meningkatkan kandungan ajmalisin dalam agregat sebanyak 108,440% dan dalam medium sebanyak 216,508% (Ratnasari *et al.*, 2001).

Potensi umbi gembili sebagai bahan obat dapat ditingkatkan melalui kultur kalus agar diperoleh kondisi optimal pertumbuhan kalus gembili. Pertumbuhan kalus ini sangat dipengaruhi oleh pemberian zat pengatur tumbuh, serta kandungan metabolit sekundernya dapat ditingkatkan dengan penambahan elisitor. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian elisitor ekstrak khamir pada kultur kalus gembili dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin.

## METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2021 sampai April 2022 di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Semarang. Bahan tanaman dalam penelitian ini adalah umbi gembili. Variabel bebas meliputi kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin serta elisitor ekstrak khamir. Variabel terikat berupa berat basah, tekstur dan warna kalus. Variabel kontrol diantaranya media MS padat, suhu  $18 \pm 20^\circ\text{C}$ , kelembaban 58%, dan dalam kondisi gelap. Rancangan penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan dua faktorial. Faktor pertama adalah kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D (0,5 ppm; 1 ppm) dan kinetin (0,5 ppm; 1 ppm) dengan 4 taraf perlakuan, sedangkan faktor kedua adalah elisitor ekstrak khamir dengan 3 taraf perlakuan (0,5%; 1%; 2,5 % (b/v)). Unit penelitian adalah 4 x 3 kombinasi dengan tiga kali pengulangan.

### Pembuatan Media Tanam

Media perlakuan terdiri atas media MS instan, myo-inositol, gula, zat pematat (agar), dan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin. Formulasi media perlakuan adalah (1) media A (2,4-D 1 ppm + kinetin 1 ppm), (2) media B (2,4-D 1 ppm + kinetin 0,5 ppm), (3) media C (2,4-D 0,5 ppm + kinetin

1 ppm), (4) media D (2,4-D 0,5 ppm + kinetin 0,5 ppm). Tahap selanjutnya, media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 20 menit.

#### Pembuatan Elisitor

Ekstrak khamir dibuat dari ragi komersial. Fermipan sebanyak 1 gram dilarutkan ke dalam 150 ml larutan gula steril dalam kondisi hangat. Larutan fermipan didiamkan selama 30 menit hingga terlihat berbuih, selanjutnya diautoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 20 menit. Endapan yang dihasilkan selanjutnya dikeringkan menggunakan oven, kemudian digerus sehingga terbentuk serbuk. Elisitor ekstrak khamir dibuat pada konsentrasi 0,5%; 1%; 2,5% (b/v).

#### Subkultur dan Elisitasi

Kalus umur tiga bulan dipotong  $\pm 1$  gram kemudian ditanam pada media perlakuan. Kultur kalus dipelihara selama 2,5 bulan dalam kondisi gelap. Tahapan selanjutnya, kalus dielisitasi dengan elisitor ekstrak khamir. Elisitasi dilakukan dengan menuangkan elisitor sebanyak 2 ml ke permukaan media kultur kalus. Proses inkubasi setelah elisitasi dilakukan selama satu bulan.

#### Pengambilan Data

Kalus diamati pada hari ke-30 setelah elisitasi. Data yang diambil adalah berat basah, tekstur dan warna kalus. Pengambilan data berat basah dilakukan dengan menimbang kalus menggunakan neraca analitik dengan tingkat ketelitian 0,0001 gram, kemudian data dianalisis dengan uji ANOVA dua arah menggunakan perangkat SPSS ver. 16.0, apabila terdapat perbedaan maka dilakukan uji lanjut DMRT 0,5%. Sementara pengamatan morfologi kalus dilakukan secara visual dan dianalisis secara deskriptif.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Berat basah kalus diukur dengan cara menimbang kalus menggunakan neraca analitik dengan tingkat ketelitian 0,001 gram. Berikut data berat basah kalus gambili. Data rerata berat basah kalus umbi gambili terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh pemberian ZPT dan elisitor terhadap berat basah kalus

ZPT (ppm)		Elisitor (b/v)	Rerata berat kalus (gram)
2,4-D	Kinetin		
1	1	0,5%	2,17
1	0,5	0,5%	2,18
0,5	1	0,5%	2,62
0,5	0,5	0,5%	3,32
1	1	1%	2,67
1	0,5	1%	2,27
0,5	1	1%	3,04
0,5	0,5	1%	3,35
1	1	2,5%	2,60
1	0,5	2,5%	2,78
0,5	1	2,5%	2,17
0,5	0,5	2,5%	2,39

Berdasarkan uji ANOVA dua arah, nilai signifikansi pada elisitor ekstrak khamir  $0,171 > 0,05$  sehingga tidak terdapat perbedaan rerata berat basah kalus gambili berdasarkan variasi konsentrasi elisitor ekstrak khamir. Nilai signifikansi zat pengatur tumbuh  $0,037 < 0,05$  sehingga terdapat perbedaan rerata berat basah kalus gambili berdasarkan variasi kombinasi ZPT 2,4-D dan kinetin. Hasil uji DMRT 5% pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap berat basah kalus dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil uji DMRT 5%, pemberian kombinasi zat pengatur tumbuh dalam konsentrasi rendah yaitu 2,4-D 0,5 ppm dan kinetin 0,5 ppm mampu menghasilkan kalus dengan rerata berat basah tertinggi yaitu 3,02 gram. Hasil tersebut tidak berbeda jauh dengan perlakuan 2,4-D 0,5 ppm dan kinetin 1 ppm sebesar 2,61 gram. Rerata berat kalus pada konsentrasi lain juga tidak berbeda jauh, pada kombinasi 2,4-D 1 ppm + kinetin 1 ppm (2,48 gram) dan 2,4-D 1 ppm + kinetin 0,5 ppm (2,41 gram).

Tabel 2. Hasil uji DMRT 5% pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap berat basah kalus

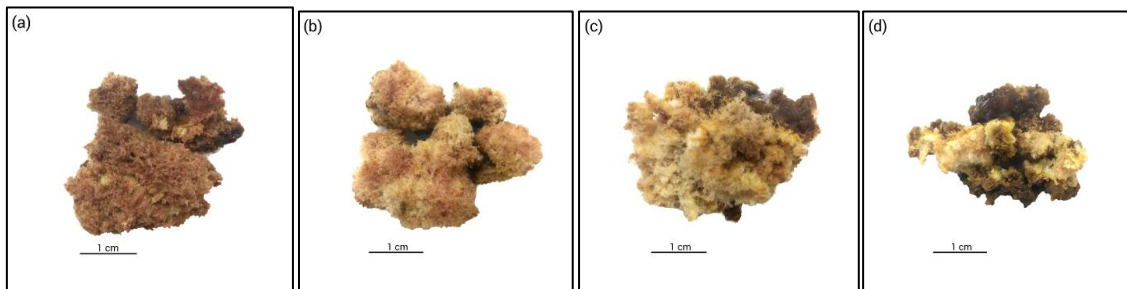
ZPT (ppm)		Rerata Berat Basah Kalus (gram)
2,4-D	Kinetin	
1	1	2,4789 <sup>b</sup>
1	0,5	2,4078 <sup>b</sup>
0,5	1	2,6089 <sup>ab</sup>
<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>3,0200<sup>a</sup></b>

Keterangan: Huruf superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan secara nyata, sedangkan huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata.

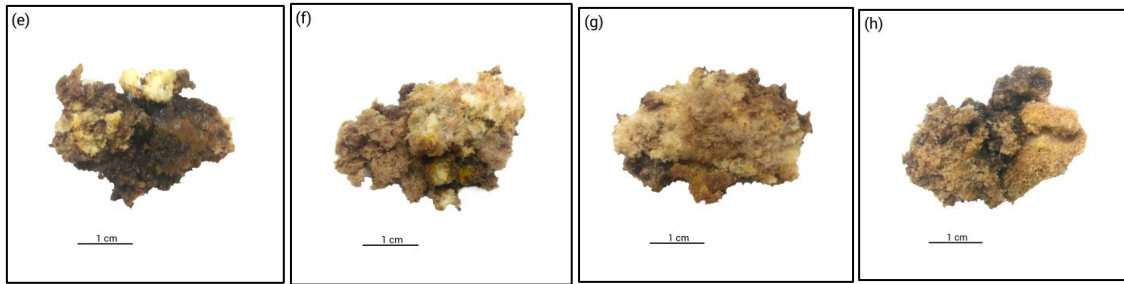
Bertambahnya berat kalus mencirikan adanya pertumbuhan sehingga dijadikan salah satu variabel dalam pengamatan pertumbuhan kalus. Berat basah kalus bergantung pada kecepatan sel-selnya dalam pembelahan. Pembelahan sel dipengaruhi oleh pemberian hormon eksogen dan hormon endogen eksplan. Pemberian ZPT yang sesuai dan interaksinya dengan hormon endogen akan menghasilkan pertumbuhan kalus yang optimal. Metabolisme fenol secara positif memengaruhi sistem kultur jaringan bersama dengan metabolisme auksin yang berperan dalam perbesaran sel dan sintesis senyawa lainnya (Hutami, 2008).

Berdasarkan analisis statistik, pemberian elisitor ekstrak khamir tidak berpengaruh terhadap berat basah kalus. Hal ini mungkin dikarenakan elisitor khamir bersifat biotik yang berperan dalam peningkatan kandungan metabolit sekunder dibandingkan untuk memicu pertumbuhan kalus. Merujuk pada penelitian Kasmiyati *et al.* (2008), bahwa pemberian ekstrak khamir pada planlet *Artemisia vulgaris* tidak berpengaruh nyata terhadap berat segar planlet. Penambahan elisitor yeast sebanyak 2 ml pada kultur kalus *Oxystelma esculentum* (L.F) menghasilkan senyawa kaempferol tertinggi sebesar 0,958 mg/g berat kering (Maliga & Yogananth, 2018). Pemberian elisitor ekstrak khamir 10 mg/L pada kultur kalus *Artemisia monosperma* mampu menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi (Al-Gendy *et al.*, 2016).

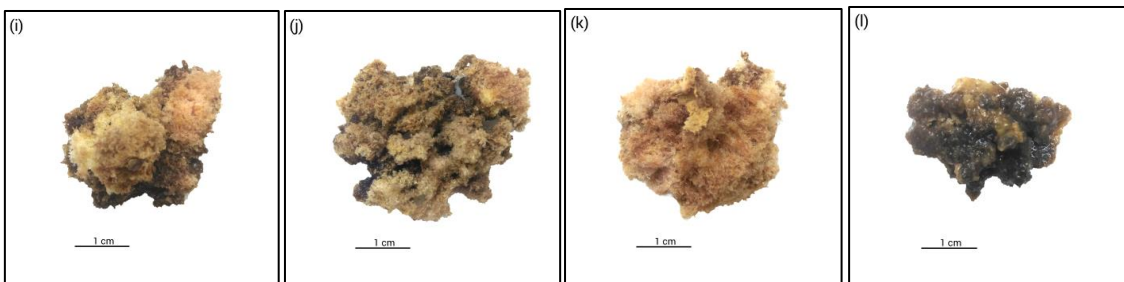
Morfologi kalus diamati pada hari ke-30 setelah elisitasi. Morfologi kalus diamati secara visual berupa tekstur dan warna kalus. Gambar 1-3 menunjukkan morfologi kalus gembili setelah elisitasi dan diinkubasi selama 30 hari.



Gambar 1. Morfologi kalus gembili (*Dioscorea esculenta* L.) setelah elisitasi dengan ekstrak khamir selama 30 hari, (a) 2,4-D 1 ppm + kinetin 1 ppm + ekstrak khamir 0,5% (b/v); (b) 2,4-D 1 ppm + kinetin 0,5 ppm + ekstrak khamir 0,5% (b/v); (c) 2,4-D 0,5 ppm + kinetin 1 ppm + ekstrak khamir 0,5% (b/v); (d) 2,4-D 0,5 ppm + kinetin 0,5 ppm + ekstrak khamir 0,5% (b/v)



Gambar 2. Morfologi kalus gembili (*Dioscorea esculenta* L.) setelah elisitasi dengan ekstrak khamir selama 30 hari, (e) 2,4-D 1 ppm + kinetin 1 ppm + ekstrak khamir 1% (b/v); (f) 2,4-D 1 ppm + kinetin 0,5 ppm + ekstrak khamir 1% (b/v); (g) 2,4-D 0,5 ppm + kinetin 1 ppm + ekstrak khamir 1% (b/v); (h) 2,4-D 0,5 ppm + kinetin 0,5 ppm + ekstrak khamir 1% (b/v)



Gambar 3. Morfologi kalus gembili (*Dioscorea esculenta* L.) setelah elisitasi dengan ekstrak khamir selama 30 hari, (i) 2,4-D 1 ppm + kinetin 1 ppm + ekstrak khamir 2,5% (b/v); (j) 2,4-D 1 ppm + kinetin 0,5 ppm + ekstrak khamir 2,5% (b/v); (k) 2,4-D 0,5 ppm + kinetin 1 ppm + ekstrak khamir 2,5% (b/v); (l) 2,4-D 0,5 ppm + kinetin 0,5 ppm + ekstrak khamir 2,5% (b/v)

Seluruh kalus yang diamati menunjukkan kalus bertekstur remah. Kalus remah memiliki ciri-ciri ruang antarselnya terlihat renggang dan mudah dipisahkan. Tekstur kalus dipengaruhi oleh pemberian zat pengatur tumbuh, jenis eksplan, dan kondisi lingkungan kultur (Hariyati *et al.*, 2016; Sugiyarto & Kuswandi, 2014). Pemberian kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin pada kalus memicu aktifnya pembelahan dan pembesaran sel sehingga terbentuk kalus bertekstur remah. Hal ini sejalan dengan penelitian Setiawati *et al.* (2019), pemberian kombinasi 2,4-D 1 ppm dan kinetin 0,5 ppm pada eksplan *Chrysanthemum morifolium* menghasilkan kalus remah. Permukaan kalus yang memiliki kontak secara langsung dengan media terlihat berair. Hal ini dikarenakan area tersebut berfungsi sebagai penyerapan nutrisi untuk diteruskan ke jaringan di atasnya.

Warna kalus merupakan salah satu indikator pertumbuhan kalus. Berdasarkan hasil pengamatan hampir seluruh eksplan hasil elisitasi mengalami pencoklatan (*browning*). Pencoklatan kalus disebabkan oleh eksplan yang dilukai. Luka tersebut memicu stres dan meningkatkan aktivitas Fenilalanin amonia liase (PAL) yang diikuti produksi fenilpropanoid sehingga menyebabkan pencoklatan. Merujuk pada Hutami, (2008) bahwa fenol yang mengalami oksidasi menjadi quinon dan senyawa lain yang beracun bagi sel mengakibatkan terjadinya pencoklatan. Senyawa PAL diaktivasi oleh enzim *Polyphenol oxidase* (PPO). Pada kondisi normal, enzim dan substrat berada di ruang yang berbeda dalam sel dan akan keluar bersama ketika sel rusak. Perubahan permeabilitas membran menyebabkan pelepasan enzim dan substrat pada sitosol dan dapat memicu pencoklatan (Li *et al.*, 2016).

Pada pengamatan warna kalus, hampir seluruhnya berwarna coklat. Pencoklatan (*browning*) pada kalus merupakan hal yang bersifat alamiah yang menandakan kemunduran fisiologis kalus (Rismayanti & Nafi'ah, 2021). Hal ini diduga karena waktu inkubasi setelah subkultur yang relatif lama yakni 2,5 bulan setelah kalus diinduksi selama tiga bulan. Setelah inkubasi subkultur selama 2,5 bulan, kalus dielisitasi dengan ekstrak khamir dan dipelihara selama 30 hari. Perubahan warna kalus dari putih kekuningan menjadi coklat diduga disebabkan oleh umur kalus yang semakin tua dan kandungan nutrisi yang terkandung dalam media mulai menurun. Hal ini sejalan dengan penelitian Zulfitra *et al.* (2018), bahwa kalus dari eksplan *Coffea arabica* L. yang muncul pertama kali berwarna

putih dan berangsur berubah menjadi putih kekuningan hingga coklat setelah diinkubasi selama 60 hari.

Umur kalus yang semakin tua memengaruhi kemampuan tumbuh kalus yang semakin menurun diikuti dengan perubahan fisik kalus. Ketika kandungan nutrisi dalam media kultur rendah, maka proses regenerasi selnya akan melambat dan berpengaruh pada warna dan tekstur kalus yang dihasilkan. Hal ini ditandai dengan sel-sel kalus yang semakin renggang serta perubahan warna kalus dari putih kekuningan, kuning kecoklatan hingga coklat. Hal ini sejalan dengan penelitian Rahayu *et al.*, (2020) bahwa kalus *Acalypha indica* mengalami pencoklatan karena berada dalam media kultur terlalu lama, sedangkan nutrisi dalam media sudah mulai habis. Selain itu pada penelitian Mahadi *et al.* (2016), pertumbuhan kalus *Citrus macrocarpa* semakin menurun pada pekan ke-7 yang ditandai dengan munculnya pencoklatan kalus disebabkan semakin berkurangnya unsur hara dan zat pengatur tumbuh dalam media kultur.

Pada penelitian Habibah *et al.* (2021), kalus dari jenis eksplan yang sama yaitu umbi gembili pada umur tiga bulan masih berwarna hijau dikarenakan kalus tersebut dipelihara dalam kondisi terang. Pada kondisi terang, etioplas mampu berdiferensiasi menjadi proplastida dan menghasilkan kloroplas yang mengandung klorofil sehingga menghasilkan kalus berwarna hijau. Sedangkan pada kultur umbi gembili ini, kalus tidak berwarna hijau karena dipelihara dalam kondisi gelap. Pada kondisi ini, etioplas tidak mengalami diferensiasi menjadi proplastida sehingga warna kalus tetap kekuningan bahkan coklat. Pencoklatan diduga juga dapat terjadi akibat terlalu lama terkena udara luar saat proses subkultur.

## SIMPULAN

Konsentrasi optimal kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin adalah 0,5 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin dengan rerata berat basah kalus 3,02 gram. Pemberian elisitor ekstrak khamir tidak berpengaruh terhadap rerata berat basah kalus. Kombinasi 2,4-D 0,5 ppm dan kinetin 0,5 ppm dengan elisitor ekstrak khamir 1% adalah kondisi optimal untuk pertumbuhan kalus pada parameter rerata berat basah kalus yaitu sebesar 3,35 gram. Warna dan tekstur yang ditunjukkan pada seluruh perlakuan adalah coklat kekuningan hingga coklat tua dengan tesktur remah.

## DAFTAR PUSTAKA

- Al-Gendy, A. A., Ali, R. M., Hamdan, D. A., & Abdel-Ghani, A. E. (2016). Elicitation induced flavonoids, phenolic constituents, antioxidant and cytotoxic activities of *Artemisia monosperma* callus cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 10(40), 717-731. <https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6248>
- Chen, Y., Tang, Y. M., Yu, S. L., Han, Y. W., Kou, J. P., Liu, B. L., Yu, B. Y. (2015). Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chinese Journal of Natural Medicines* 13(8), 578-587. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30053-4](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30053-4)
- Cleland, R. E. (1987). Auxin and cell elongation. In R. E. Cleland, Plant hormones and their role in plant growth and development (pp. 205-220). Washington: Department of Biology, University of Washington.
- Cong, S., Tong, Q., Peng, Q., Shen, T., Zhu, X., Xu, Y., Qi, S. (2020). In vitro anti-bacterial activity of diosgenin on *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Molecular Medicine Reports* 22(6), 5392-5398. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11620>
- Habibah, N. A., Safitri, S., Pratiwi, Y. R., Wijawati, N., Musafa, F., Puspitasari, A. S. (2021). Callus induction from tuber of lesser yam (*Dioscorea esculenta*) on MS media supplemented by 2,4-D and kinetin. *Journal of Physics: Coference Series* 1918 052029. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1918/5/052029>
- Hariyati, M., Bachtiar, I., & Sedijani, P. (2016). Induksi kalus tanaman krisan (*Chrysanthemum morifolium*) dengan pemberian benzil amino purin (BAP) dan diklorofenoksi acetyl acid (2,4-D). *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA* 2(1), 89-96. <https://doi.org/10.29303/jppipa.v2i1.37>
- Hutami, S. (2008). Ulasan: masalah pencoklatan pada kultur jaringan. *Jurnal Agro Biogen* 4(2), 83-88. <http://dx.doi.org/10.21082/jbio.v4n2.2008.p83-88>
- Indah, P. N., & 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), 1-6. <https://doi.org/10.12962/j23373520.v2i1.2571>

- Kasmiyati, S., Herawati, M. M., & Kristianti, E. B. (2008). Pertumbuhan *Artemisia vulgaris* secara kultur pucuk pada medium dengan kandungan mioinositol dan ekstrak khamir. *Biota* 13(2), 62-67. <https://doi.org/10.24002/biota.v13i2.2672>
- Li, Y., Meng, T., Wang, Y., & Zhang, X. (2016). Study on enzymatic browning in suspension cultures of licorice cells. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 30(2), 277-283. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1114906>
- Mahadi, I., Syaff'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. <https://doi.org/10.18343/jipi.21.2.84>
- Maliga, K. D., & Yogananth, N. (2018). The Enhancement of kaempferol by yeast elicitor in callus cultures of *Oxystelma esculentum* (L.F). *Journal of Chemical Pharmaceutical Research* 9(2), 56-59. <https://doi.org/10.22376/ijpbs.2018.9.2.p135-139>
- Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews* 1(1), 69-78.
- Narayani, M., & Srivastava, S. (2017). Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry Reviews* 16, 1227-1252. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0>.
- Ningsih, I. Y. (2014). Pengaruh elisitor biotik dan abiotik pada produksi flavonoid melalui kultur jaringan tanaman. *Pharmacy* 11(2), <https://doi.org/117-132>. 10.30595/pji.v11i2.829
- Patel, H., & Krishnamurthy, R. (2013). Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 134, 60-65. [https://doi.org/10.1007/10\\_2013\\_183](https://doi.org/10.1007/10_2013_183)
- Rahayu, S., & Suharyanto. (2020). Induksi kalus dengan 2,4D dan BAP pada eksplan daun vegetatif dan generatif tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). *BioEksakta* 2(3), 479-486.
- Rismayanti, A. Y., & Nafi'ah, H. H. (2021). Modifikasi media pada induksi kalus kopi arabika (*Coffea arabica* L.) berbuah kuning. *Jurnal Agro Wiralodra* 4(2), 42-49. <https://doi.org/10.31943/agrowiralodra.v4i2.60>
- Setiawati, T., Ayalla, A., & Witri, A. (2019). Induksi kalus krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) dengan penambahan berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT). *Jurnal Pendidikan, Matematika Dan Sains* 3(2), 119-132. <https://doi.org/10.33541/edumatsains.v3i2.884>.
- Yuliani, F., Dewi, W. S., Yunus, A., & Siswanto, U. (2018). The study of artemisin content in callus *Artemisia annua* L. cultures elicited with endophytic fungi *Aspergillus* sp. *Molekul* 13(2), 155-161. <http://doi.org/10.20884/1.jm.2018.13.2.459>.
- Zulfitra, R., Gustian, & Satria, B. (2018). Induksi kalus embriogenik kopi arabika (*Coffea arabica* L.) secara in vitro. *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ilmu Pemuliaan Indonesia*, (hal. 404-412). Padang.