



AGROMIX

Jurnal Ilmiah Fakultas Pertanian, Universitas Yudharta Pasuruan
pISSN (Print): 2085-241X; eISSN (Online): 2599-3003
Website: <https://jurnal.yudharta.ac.id/v2/index.php/agromix>

Pengaruh nisbah BAP dan IBA terhadap pembentukan embrio somatik pada tanaman *Hoya carnosa* (L.) R. Br.

The effect of the combination of BAP and IBA on the regeneration of somatic embryos of Hoya carnosa (L.) R. Br.

Didik Pudji Restanto^{1*}, Mohammad Candra Prayoga¹, Sigit Soeparjono¹, Riza Yuli Rusdiana¹, Fathurrahman²

¹ Universitas Jember, Jl. Kalimantan no 37, Sumbersari, Jember 68121

² Universitas 17 Agustus 1945 Banyuwangi, Jl. Adi Sucipto 26 Banyuwangi

*Email korespondensi: restanto.lemlit@unej.ac.id

ABSTRACT

Article history

Received : July 27, 2022

Accepted : November 10, 2022

Published : March 31, 2023

Keyword

Regeneration; Somatic embryo;
tendrils; Hoya

Introduction: Hoya plants are a wealth of flora in Indonesia. Hoya is used as an ornamental plant that has beautiful flowers and high economic value. Propagation through leaf cuttings has not been able to produce shoots. The tissue culture technology can play a role as Hoya propagation. Propagation of the use of tissue culture can be through indirect somatic embryogenesis or through callus. Somatic embryo regeneration by adding the right hormones can form a whole plant. The aim of the study was to determine the effect of the combination of BAP and IBA hormones on the formation of somatic embryos in hoya as a method of hoya propagation. **Methods:** This study used a single completely randomized design with a comparison of BAP and IBA hormones on MS media. Each treatment was repeated 3 replications. **Results:** Based on the results of the study, the combination treatment of 0.5 mg/L BAP and 1 mg/L IBA was the best number of tendrils in somatic embryo regeneration with an average of 40 tendrils. The single BAP treatment of 1 mg/L showed the lowest average number of tendrils of 8.7 tendrils. **Conclusion:** Regeneration of somatic embryos with the combination of BAP and IBA was able to grow tendrils, but somatic embryos were not able to induce shoot and roots.

ABSTRAK

Riwayat artikel

Dikirim : 27 Juli, 2022

Disetujui : 10 November, 2022

Diterbitkan: 31 Maret, 2023

Kata Kunci

Regenerasi; Embrio somatik;
Sulur; Hoya

Pendahuluan: Tanaman Hoya adalah kekayaan flora yang ada di Indonesia. Hoya dimanfaatkan sebagai tanaman hias yang memiliki bunga indah dan nilai ekonomi tinggi. Perbanyakan melalui stek daun belum mampu memunculkan tunas. Kultur jaringan dapat berperan sebagai metode perbanyakan Hoya. Perbanyakan menggunakan kultur jaringan dapat melalui somatik embriogenesis secara tidak langsung atau melalui kalus. Regenerasi embrio somatik dengan menambahkan zpt yang tepat dapat membentuk tanaman utuh. Tujuan penelitian yaitu mengetahui pengaruh kombinasi hormon BAP dan IBA terhadap pembentukan embrio somatik pada Hoya sebagai salah satu metode dalam perbanyakan Hoya. **Metode:** Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap tunggal dengan nisbah hormon BAP dan IBA pada media MS. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 ulangan. **Hasil:** Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan perlakuan nisbah BAP 0,5 mg/L dan IBA 1 mg/L adalah perlakuan terbaik dengan jumlah sulur terbanyak pada regenerasi embrio somatik dengan rata-rata 40 sulur. Perlakuan BAP 1 mg/L tunggal menunjukkan hasil rata-rata jumlah sulur terendah 8.7 sulur. **Kesimpulan:** Regenerasi embrio somatik dengan nisbah BAP dan IBA mampu menumbuhkan sulur sebagai sulur, namun embrio somatik belum mampu menginduksi tunas dan akar.

Sitasi: Restanto, D. P., Prayoga, M. C., Soeparjono, S., Rusdiana, R. Y., & Fathurrahman. (2023). Pengaruh nisbah BAP dan IBA terhadap pembentukan embrio somatik pada tanaman *Hoya carnosa* (L.) R. Br. *Agromix*, 14(1), 83-89. <https://doi.org/10.35891/agx.v14i1.3262>

PENDAHULUAN

Tanaman *Hoya carnosa* (L.) R. Br.) adalah salah satu kekayaan flora yang ada di Indonesia. *H. carnosa* memiliki bunga yang indah serta dimanfaatkan sebagai tanaman hias yang eksotik. Di Indonesia Hoya masih belum dijadikan prioritas konservasi nasional. Hoya merupakan tanaman epifit yang hidup menempel dan bergantung terhadap pohon yang ditumpanginya. Sebagai tanaman epifit, Hoya berfungsi ekologis dalam penyerapan nutrisi langsung di udara dan mengolah serapan tersebut menjadi nutrisi tersedia untuk tumbuhan yang lainnya melalui proses pencucian di musim

hujan. Tanaman epifit memiliki peran penting sebagai tandon air bagi lingkungan di sekitar. Hal ini sesuai dengan karakter daun Hoya yang tebal dengan sel mesofil yang penuh dengan vakuola penampung air (Rahayu, 2021).

Indonesia adalah negara tropis yang memiliki tingkat keragaman tanaman Hoya terbesar di dunia, hal ini terbukti sekitar lebih dari 110 jenis Hoya ada di Indonesia dari sekitar 400-450 jenis Hoya di dunia. Rahayu (2018) menyatakan bahwa, sebanyak 60 jenis Hoya telah dikonservasi di Kebun Raya. Perbanyak Hoya perlu diperhatikan untuk melestarikan plasma nutfah dan menjaga sumber daya genetik supaya tidak punah. Bioprospek Hoya yang bagus perlu untuk diimbangi dengan budidaya dan perkembangbiakan yang optimal. Perbanyak Hoya secara vegetatif melalui stek belum efektif. Firdiana dan Renjana (2019) menyatakan bahwa, perbanyak Hoya secara vegetatif menggunakan stek daun mampu tumbuh akar pada umur dua minggu, namun setelah berumur tiga bulan tidak ada tunas yang muncul. Perbanyak dengan metode kultur jaringan sangat efektif dalam upaya untuk konservasi dan menjaga sumber daya genetik pada tanaman yang langka atau hampir punah. Perbanyak tanaman secara *in-vitro* lebih efektif untuk menghasilkan bibit secara masal, berkualitas, efisien waktu dan seragam. Kultur jaringan tanaman berlandaskan dengan teori totipotensi sel memiliki potensi untuk beregenerasi membentuk tanaman baru (Dwiyani, 2015).

Perbanyak menggunakan kultur jaringan dapat menggunakan berbagai bagian dari tanaman sebagai eksplan, salah satunya dapat menggunakan eksplan dari potongan daun yang diinduksi untuk ditumbuhkan kalus embriogenik. Dwiyani (2015) menyatakan bahwa, regenerasi tanaman dapat terjadi melalui embriogenesis somatik secara tidak langsung atau melalui pembentukan kalus. Kemudian kalus embriogenik akan membentuk struktur embrio somatik. Embrio somatik merupakan embrio yang terbentuk dari sel somatik tunggal atau sekelompok sel somatik melalui proses yang disebut embriogenesis somatik. Aguilar-Hernandez dan Loyola-Vargas (2018) menyatakan bahwa, embriogenesis somatik adalah proses diferensiasi sel dimana sel somatik mengubah program genetiknya dan berkembang menjadi sel embrionik. Regenerasi embrio somatik membentuk tanaman utuh atau planlet dipengaruhi oleh hormon yang diberikan. Dwiyani (2015) menyatakan bahwa, rasio antara hormon auksin dan sitokinin dapat mempengaruhi arah morfogenesis pada kultur jaringan. Berdasarkan penelitian sebelumnya media MS dengan konsentrasi BA 1 mg/L menghasilkan induksi tunas paling bagus dan konsentrasi IBA 0,5 mg/L menghasilkan induksi akar paling bagus pada regenerasi *H. wightii* ssp. (Lakshmi dkk., 2013).

Hormon sitokinin seperti BAP dapat membentuk perkembangan tunas aksilar dan tunas adventif. Sitokinin juga dapat meningkatkan pembelahan sel. Hormon auksin seperti IBA dapat berperan dalam merangsang pertumbuhan serta pemanjangan sel. Selain itu auksin berperan pada pembelahan sel seperti pembentukan kalus dan akar adventif (Taji dkk., 1997). Hormon BAP dapat mempercepat proses sitokinesis atau pembelahan sel (Asra *et al.*, 2020). Saini *et al.* (2013) menyatakan bahwa, hormon sitokinin dapat berinteraksi dengan auksin untuk memicu morfogenesis dan perkembangan akar. Yoon *et al.* (2010) menyatakan bahwa, perkembangan akar lateral pada embrio dipicu oleh fitohormon auksin. Auksin dapat merangsang pemanjangan sel (Majda dan Robert, 2018). Tujuan penelitian yaitu mengetahui pengaruh kombinasi hormon BAP dan IBA terhadap pembentukan embrio somatik pada Hoya.

METODE

Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *laminar air flow* (LAF), *microscope stereo leica*, *munsell color charts*, *autoclave*, *mikropipet*, pipet volume, timbangan analitik, *magnetik stirrer*, pH meter, pinset, scalpel, dan alat pendukung lainnya. Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian antara lain media basal *Murashige & skoog* (MS), BAP, IBA, NAA dan 2,4-D, sukrosa, gel agar-agar, alkohol, clorox 1%, dan aquades.

Tempat pelaksanaan

Penelitian dilakukan di laboratorium kultur jaringan Program Studi Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Mikroteknik Jurusan Tumbuhan Fakultas Biologi UGM.

Tahapan penelitian

Penelitian pembentukan embrio somatik menggunakan eksplan daun *H. carnosa* yang diinduksi secara tidak langsung atau melalui pembentukan kalus. Eksplan daun disterilkan menggunakan clorox 1% dengan digojog selama 5 menit, kemudian eksplan daun dibilas menggunakan aquades steril. Sterilisasi eksplan diulang dua kali. Kemudian daun ditanam pada media untuk membentuk kalus embriogenik. Setelah terbentuk kalus, kalus embriogenik disubkultur untuk membentuk embrio somatik. Selanjutnya embrio somatik diregenerasikan pada media perlakuan kombinasi hormon BAP dan IBA.

Rancangan percobaan

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) tunggal. Faktor penelitian merupakan nisbah hormon BAP dan IBA. Hormon BAP terdiri dari konsentrasi 0,5 mg/L, 1,0 mg/L dan 1,5 mg/L, sedangkan IBA terdiri dari konsentrasi 0 mg/L, 0,5 mg/L dan 1,0 mg/L. Setiap perlakuan merupakan kombinasi dari hormon BAP dan IBA sebagai berikut, perlakuan 1 (P1) BAP 0,5 mg/L + IBA 0 mg/L, perlakuan 2 (P2) BAP 1,0 mg/L + IBA 0 mg/L, perlakuan 3 (P3) BAP 1,5 mg/L + IBA 0 mg/L, perlakuan 4 (P4) BAP 0,5 mg/L + IBA 0,5 mg/L, perlakuan 5 (P5) BAP 1,0

mg/L + IBA 0,5 mg/L, perlakuan 6 (P6) BAP 1,5 mg/L + IBA 0,5 mg/L, perlakuan 7 (P7) BAP 0,5 mg/L + IBA 1,0 mg/L, perlakuan 8 (P8) BAP 1,0 mg/L + IBA 1,0 mg/L, dan perlakuan 9 (P9) BAP 1,5 mg/L + IBA 1,0 mg/L. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 ulangan sehingga terdapat 27 unit satuan percobaan.

Analisis data

Analisis data kuantitatif yang diperoleh berdasarkan hasil penelitian dilakukan dengan *Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila perlakuan berpengaruh sangat nyata, maka dilakukan dengan uji lanjut menggunakan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf kesalahan 5%. Analisis data kualitatif yang didapatkan berdasarkan hasil penelitian dilakukan dengan analisis deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi embrio somatik

Pembentukan kalus yang dihasilkan dari eksplan daun, muncul dari tepi daun bekas luka potongan. Kalus pertama muncul pada umur 4 sampai 5 minggu setelah induksi. Kalus yang muncul terdapat kalus yang bertekstur remah dan kompak. Kalus yang bertekstur remah terus mengalami perkembangan untuk membentuk kalus yang bersifat embriogenik yang memiliki warna kuning keputihan, sedangkan kalus yang bersifat kompak mempunyai perkembangan yang lebih lambat dibandingkan kalus yang remah terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Somatik embriogenesis tanaman *H. carnosae*. Bagian kalus yang remah (rm) dan kompak (cp)

Kalus embriogenik yang bertekstur remah menunjukkan pembelahan sel terus menerus dan cepat dari pada kalus yang bertekstur kompak. Mahadi dkk. (2016) menyatakan bahwa, kalus yang bertekstur kompak diakibatkan karena kalus membentuk lignifikasi, sehingga teksturnya menjadi keras akibat dari sitokinin yang berperan terhadap transport zat hara. Kalus bertekstur remah bersifat *friable* dan sel-selnya mudah untuk dipisahkan (Restanto dkk., 2021).

Regenerasi kalus embriogenik

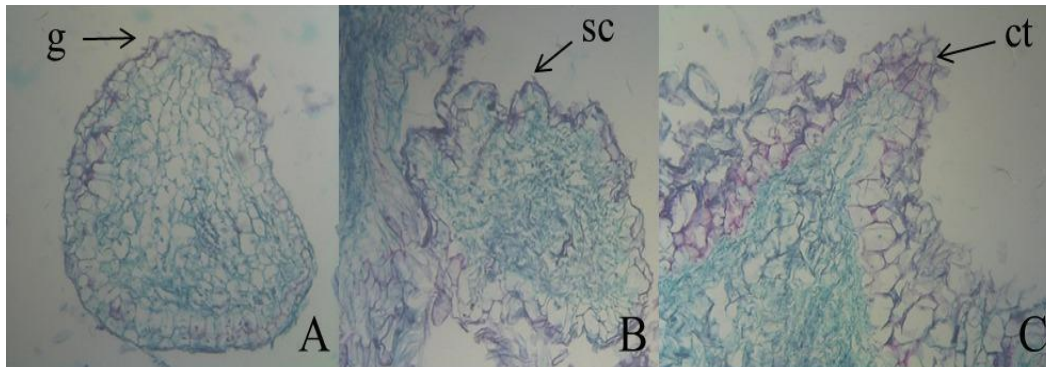
Kalus bersifat friabel atau embriogenik yang dihasilkan kemudian disubkultur pada media yang sama dengan media induksi kalus embriogenik yaitu media MS dengan nisbah hormon 2,4-D 2 mg/L dan NAA 1 mg/L untuk membentuk struktur embrio somatik. Zulfitri dkk. (2018) menyatakan bahwa, kalus yang bersifat embriogenik merupakan kalus yang mampu berkembang membentuk struktur embrio somatik. Tahapan somatic embryogenesis pada tanaman *H. carnosae* terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Tahapan Somatik embriogenesis tanaman *H. carnosae* pada pembesaran 10x. (A) ec= embryonic callus, g= embryo globular (B) pem= pre-embryo mass, sc= scutellum (C) ct= kolioptilar (D) s=sulur

Tahapan embriogenesis somatik tanaman ini dimulai dari kalus embriogenik yang membentuk embrio globular berbentuk tonjolan bulat (Gambar 2A). Kemudian embrio globular mengalami pemanjangan di ujung apikal membentuk fase skutelar (Gambar 2B). Pada fase skutelar terlihat kuncup yang terus memanjang membentuk fase

koleoptil yang terlihat primordia tonjolan sulur (Gambar 2C). Kemudian koleoptil akan membentuk tonjolan sulur (Gambar 2D). Kalus embriogenik membentuk embrio somatik terjadi karena kalus embriogenik mengandung embrio globular yang secara bertahap akan berkembang membentuk embrio somatik (Ke dkk., 2021). Histologi embryogenesis somatic tanaman *H. carnosus* terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Histologi embriogenesis somatik tanaman *H. carnosus* pada perbesaran 40x. (A) g=fase globular (B) sc=fase skutelar (C) ct=fase koleoptil

Pada Gambar 3 histologi somatik embriogenesis tanaman *H. carnosus* menunjukkan tahapan pembentukan embrio somatik mulai dari fase embrio globular, fase skutelar, dan fase koleoptil. Pada fase globular, susunan sel berukuran seragam dan padat (Gambar 3A). Pada fase skutelar terdapat arah pertumbuhan berupa pemanjangan di sisi ujung dengan susunan sel di ujung yang lebih padat dan berukuran kecil (Gambar 3B). Fase koleoptil terdapat primordia tonjolan sulur yang akan memanjang membentuk sulur. Susunan sel pada fase koleoptil terlihat perbedaan nyata ukuran antara ukuran sel di ujung dengan susunan sel di bagian tengah. Ukuran sel di ujung memiliki susunan yang lebih kecil dibandingkan sel yang ada di bagian tengah (Gambar 3C). Asadi Aghbolaghi dkk. (2021) menyatakan bahwa, kalus embriogenik yang dipindahkan ke media induksi tunas akan membentuk zona meristematik.

Regenerasi embrio somatik

Embrio somatik yang terbentuk diregenerasikan pada media regenerasi selama 3 minggu tidak mampu membentuk tunas dan hanya mampu membentuk sulur seperti yang terlihat tanda panah pada Gambar 4. Pengamatan dilakukan hingga minggu ke-12 dan membentuk sulur semakin panjang dengan perakaran lembut di pangkal sulur sehingga embrio somatik belum mampu membentuk tunas, daun dan akar (Gambar 4).

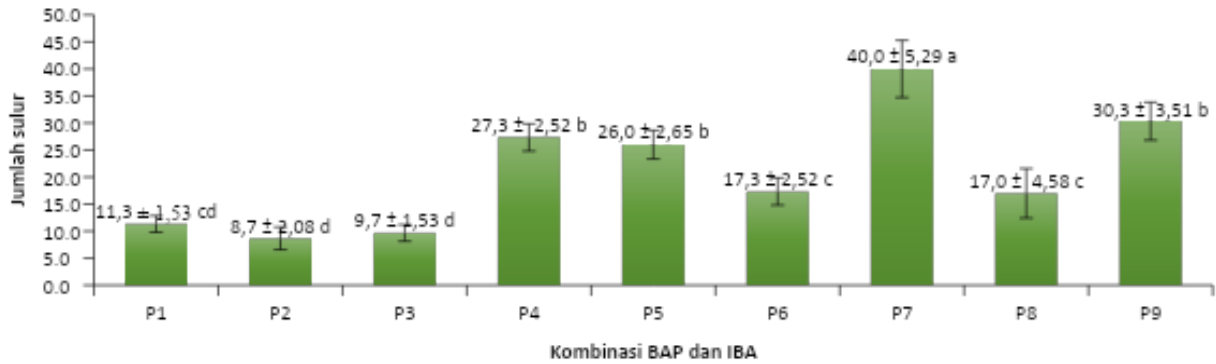


Gambar 4. Pembentukan sulur pada embrio somatik tanaman *H. carnosus* perlakuan P7 umur 12 minggu

Sari dkk. (2014) menyatakan bahwa, regenerasi kalus embriogenik pada media MS yang ditambahkan hormon BAP tunggal tidak mampu membentuk tunas, namun regenerasi kalus embriogenik mampu membentuk tunas dan akar dengan penambahan nisbah antara BAP 4 mg/L dan NAA 0,2 mg/L. Lakshmi dkk. (2013) menyatakan bahwa, tunas yang telah terbentuk dapat di induksi akar pada media MS dengan IBA 0,2 ppm pada regenerasi *H. wightii* ssp. Keberhasilan induksi akar dapat dicapai pula dengan pemberian dua jenis hormon auksin sekaligus yaitu nisbah IBA 2 ppm dan NAA 0,01 ppm (Akbar dkk., 2017).

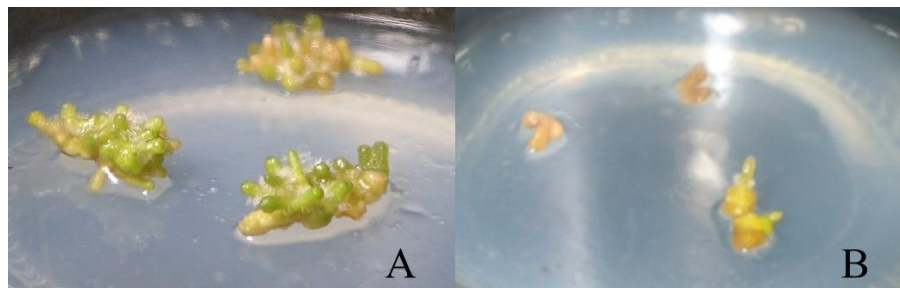
Jumlah sulur

Nisbah BAP dan IBA menunjukkan pengaruh yang sangat nyata terhadap regenerasi embrio somatik tanaman *H. carnosus*. Rata-rata jumlah sulur pada semua nisbah perlakuan terlihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Grafik rata-rata jumlah sulur *H. carnososa*

Terlihat pada Gambar 5 bahwa perlakuan P7 nisbah BAP 0,5 mg/L dan IBA 1 mg/L menunjukkan hasil yang terbaik dengan jumlah rata-rata sulur yang terbentuk sebesar 40 sulur, sedangkan perlakuan P2 BAP 0,5 mg/L menghasilkan rata-rata jumlah sulur paling sedikit yaitu 8,7 sulur. Pemberian BAP tunggal yaitu 0,5 mg/L, 1 mg/L dan 1,5 mg/L tanpa IBA mempunyai kecenderungan jumlah sulur rendah yaitu 11,3, 8,7 dan 9,7. Pembentukan sulur dari embrio somatik setelah diregenerasikan terlihat pada Gambar 6.



Gambar 6. (A) Pembentukan sulur terbaik pada perlakuan terbaik P7 dan (B) perlakuan terendah pada P2

Gambar 6A merupakan perlakuan P7 nisbah BAP 0,5 mg/L dan IBA 1 mg/L dengan hasil sulur yang terbentuk terbanyak sedangkan Gambar 6B perlakuan P2 dengan hormon BAP 1 mg/L secara tunggal (P2) yang menunjukkan sulur yang terbentuk sangat sedikit dan tidak berkembang dengan baik. Penambahan hormon sitokinin (KN, BA, TDZ) secara tunggal pada induksi tunas, tidak mampu membentuk tunas dan eksplan mati dalam waktu periode yang singkat (Lakshmi dkk., 2013).

Warna sulur

Perubahan warna yang terjadi pada sulur menunjukkan bahwa embrio somatik beregenerasi dan terus berkembang. Perubahan warna sulur berdasarkan *munsell color charts* dari perlakuan P1 sampai P9 terlihat pada Gambar 7. Warna terbaik diperoleh dari perlakuan P7 nisbah BAP 0,5 mg/L dan IBA 1 mg/L yang menghasilkan warna hijau yang pekat, sedangkan pada perlakuan P3 dengan konsentrasi BAP 1,5 mg/L secara tunggal menghasilkan warna yang paling dominan kekuningan. Warna sulur yang terbentuk dapat digunakan sebagai indikator sulur mengalami pertumbuhan dan perkembangan yang baik. Sulur yang terbentuk berwarna hijau menunjukkan bahwa sulur mengandung klorofil. Klorofil merupakan pigmen pada tumbuhan yang mampu menyerap cahaya merah, biru, dan ungu serta mampu merefleksikan cahaya hijau (Maulid & Laily, 2015).

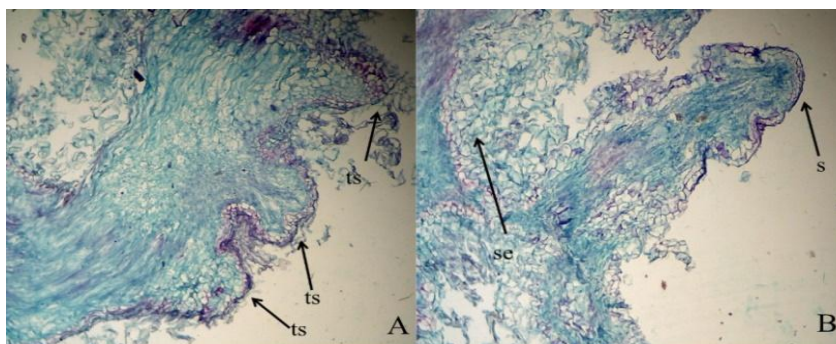
Perlakuan	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Warna kalus									
Visual warna									
Munshell colour	2.5 GY 7/10	2.5 GY 8/10	5 Y 8/8	5 GY 5/10	5 GY 6/10	5 GY 7/8	7.5 GY 5/8	5 GY 7/10	2.5 GY 8/12

Gambar 7. Perubahan warna sulur berdasarkan *munsell color charts* dari P1-P9

Peningkatan kandungan klorofil menunjukkan bahwa tumbuhan melakukan proses biosintesis klorofil (Aisoi, 2019). Maulana dkk. (2021) menyatakan bahwa, reaksi fotosintesis dipengaruhi oleh kandungan klorofil pada daun. Sulur berwarna hijau kekuningan mengandung klorofil yang rendah. Kandungan klorofil berpengaruh terhadap reaksi fotosintesis yang mempengaruhi pertumbuhan. Terlihat pada perlakuan P7 yang menunjukkan warna hijau yang lebih pekat menghasilkan jumlah sulur terbanyak. Perubahan warna pada sulur dipengaruhi oleh hormon yang diberikan. Aslam dkk. (2011) menyatakan bahwa, warna yang terbentuk dapat dipengaruhi oleh hormon sitokinin BAP dan Kinetin yang mampu membentuk warna hijau pekat pada embrio somatik. Sulastridkk. (2019) menyatakan bahwa, penambahan hormon BAP dan NAA pada media MS berpengaruh terhadap regenerasi kalus embriogenik mampu membentuk warna hijau dan membesar menunjukkan bahwa terjadi proses diferensiasi sel.

Histologi sulur

Histologi terbentuknya sulur *H. carnosus* mengamati struktur sel pada sulur menggunakan *microscope stereo leica* dengan perbesaran 40x (Gambar 8). Setiap sel memiliki ukuran yang berbeda-beda pada setiap jaringan. Warna pada histologi menunjukkan bahwa warna lebih pekat merupakan sel yang lebih padat dibandingkan warna yang lebih cerah. Bagian histologi yang diwarnai menunjukkan pembentukan embrio somatik yang lebih maju atau perkembangan tunas meristematik (Asadi-Aghbolaghi dkk., 2021).



Gambar 8. Histologi sulur tanaman *H. carnosus* pada perbesaran 40x

Terlihat pada Gambar 8A panah ts yang menunjukkan tonjolan sulur atau awal munculnya sulur. Tonjolan sulur muncul pada permukaan embrio somatik. Tonjolan sulur akan terus mengalami pertumbuhan dan memanjang membentuk sulur (Gambar 8B panah s). Sulur yang terbentuk memanjang dengan susunan sel yang berukuran kecil pada jaringan meristem atau pucuk, sedangkan embrio somatik memiliki ukuran sel yang lebih besar (Gambar 8B panah se). Sukamto (2017) menyatakan bahwa, analisis histologi yang terlihat struktur seperti kuncup menunjukkan bahwa terdapat lapisan meristematik dengan lapisan dermal. Histologi sulur terdapat struktur jaringan kambium di bagian tengah dengan ukuran yang sel lebih besar dibandingkan dengan sel pada jaringan meristematik. Struktur sel pada lapisan tengah membentuk prokambium yang berasal dari lapisan basal embrio (Sousa dkk., 2022).

KESIMPULAN

Nisbah BAP dan IBA berpengaruh nyata terhadap pembentukan embrio somatik tanaman *H. carnosus*. Regenerasi embrio somatik mampu membentuk sulur, namun regenerasi embrio somatik belum mampu menginduksi organ tunas, daun dan akar. Perlakuan nisbah BAP 0,5 mg/L dengan IBA 1 mg/L menunjukkan hasil yang terbaik dengan jumlah rata-rata sulur yang terbentuk sebesar 40 sulur dan warna terbaik menunjukkan warna hijau yang lebih pekat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Laboratorium Kultur Jaringan Program studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember yang mendukung penuh pelaksanaan penelitian ini dan Laboratorium Mikroteknik Jurusan Tumbuhan, Fakultas Biologi, UGM untuk pengujian histologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Asadi-Aghbolaghi, M., Dedicova, B., Ranade, S. S., Le, K., Sharifzadeh, F., Omid, M., & Egertsdotter, U. (2021). Protocol development for somatic embryogenesis SSR markers and genetic modification of *Stipagrostis pennata* (Trin.) De Winter. *Plant Methods*, 17(1), 1-14.
- Aisoi, L. E. (2019). Analisis kandungan klorofil daun jilat (*Villebrunea rubescens* bl.) pada tingkat perkembangan berbeda. *Simbiosis*, 8(1), 50-58.

- Aguilar-Hernández, V., & Loyola-Vargas, V. M. (2018) Advanced proteomic approaches to elucidate somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1-24.
- Aslam, J., Khan, S. A., Cheruth, A. J., Mujib, A., Sharma, M. P., & Srivastava, P. S. (2011). Somatic embryogenesis scanning electron microscopy histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(4), 369-380.
- Asra, R., Samarlina, R. A., & Silalahi, M. (2020). *Hormon tumbuhan* (Cetakan I). Jakarta: UKI Press.
- Dwiyani, R. (2015). *Kultur jaringan tanaman* (Cetakan 1). Denpasar Barat: Pelawa Sari.
- Firdiana, E. R., & Renjana, E. (2019, September). Pertumbuhan vegetatif stek daun hoya pada tiga media tanam yang berbeda. In *Prosiding Seminar Nasional Hayati* (Vol. 7, pp. 46-52).
- Ke, L. Jiang, Q., Wang, R., Yu, D., & Sun, Y. (2021). Plant regeneration via somatic embryogenesis in diploid cultivated cotton (*Gossypium arboreum* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1-23.
- Klimek-Chodacka, M., Kadluczka, D., Lukasiewicz, A., Malec-pala, A., Baranski, R., & Grzebelus, E. (2020). Effective callus induction and plant regeneration in callus and protoplast cultures of *Nigella damascena* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 143(3), 693-707.
- Lakshmi, S. R., Benjamin, J. H. F., Kumar, T. S., Murthy, G. V. S., & Rao, M. V. (2013). Organogenesis from in vitro-derived leaf and internode explants of *Hoya wightii* ssp. *palniensis* - A vulnerable species of Western Ghats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 421-430.
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2016). *Somatic embryogenesis fundamental aspects and applications, Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer International Publishing.
- Mahadi, I., Syafi'i, W., & Sari, Y. (2016). Callus induction of calamansi (*Citrus microcarpa*) using 2,4-D and BAP hormones by in vitro methods. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 21(2), 84-89.
- Majda, M. & Robert, S. (2018). The role of auxin in cell wall expansion'. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1-21.
- Maulana, E., Efendi, D., & Sari, L. (2021). Evaluasi pertumbuhan kandungan klorofil dan karotenoid torbangun (*coleus amboinicus* Lour.) poliploid melalui kultur in vitro. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 8(2), 230-243.
- Maulid, R. R., & Laily, A. N. (2015). Kadar total pigmen klorofil dan senyawa antosianin ekstrak kastuba (*euphorbia pulcherrima*) berdasarkan umur daun. In *Seminar Nasional Konservasi dan Pemanfaatan Sumber Daya Alam*, 225-230.
- Rahayu, S. (2018). Diversity and conservation of Indonesian *Hoya* (*Apocynaceae*) In the Bogor Botanic Gardens. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 4(2), 291-295.
- Rahayu, S. (2021). *Konservasi biodiversitas dan pemanfaatan berkelanjutan Hoya Indonesia*. Jakarta: LIPI Press.
- Restanto, D. P., Wiranegara, A., Dewanti, P., Kristanto, B., & Avivi, S. (2021). Pengaruh hormon 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid terhadap induksi kalus tanaman sorgum (*Sorghum bicolor* (L.). *Agritrop*, 19(1), 12-18.
- Saini, S., Sharma, I., & Kaur, N. (2013). Auxin: A master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports*, 32(6), 741-757.
- 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), 51-59.
- Sousa, P. C. A., Souza, S. S. S., Nogueira, G. F., Silva-Cardoso, I. M. A., & Scherwinski-pereira, J. E. (2022). Indirect somatic embryogenesis of *Piper hispidinervum* L. and evaluation of the regenerated plants by flow cytometry. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 1-14.
- Sukanto, L. A. (2017) Histological analysis of in vitro cultured coconut endosperm. *Biotropia*, 24(1), 1-8.
- Sulastri., Nawfetriyas, W., Pinardi, D., & Rosdayanti. H. (2019). Embriogenesis somatik in vitro dan regenerasi planlet dari tiga varietas alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Ejurnal Bppt*, 6(1), 83-92.
- Taji, A. M., Dodd, W. A., & Williams, R. R. (1997). *Plant tissue culture practice*. University of New England. Diterjemahkan oleh Zulkarnain. (2006). *Teknik kultur jaringan tanaman*. Edisi Ketiga. Universitas Jambi.
- Yoon, E. K., Yang, J. H. & Lee, W. S. (2010). Auxin and abscisic acid responses of auxin response factor 3 in arabidopsis lateral root development. *Journal of Plant Biology*, 53(2), 150-154.
- Zulfitri, R., Gustian., & Satria, B. (2018). Induksi kalus embriogenik kopi arabika (*Coffea arabica* L.). In *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ilmu Pemuliaan Tanaman*. 404-412.