

INDUKSI KALUS *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI M. DENGAN PEMBERIAN KOMBINASI ZPT NAA (*NAPHTALENE ASETIC ACID*), 2,4-D (*2,4 DICLOROPHENOXY ASETIC ACID*) DAN BAP (*BENZIL AMINO PURIN*)

Arum Sekar Buana

Fakultas Teknik, Ilmu Komputer dan Agroteknologi Universitas Islam Raden Rahmat Malang
arum.sekarb@gmail.com

ABSTRAK

Stevia merupakan sumber pemanis alami yang mempunyai tingkat kemanisan 300 kali lebih manis dibandingkan dengan gula tebu. Bahan pemanis tanaman ini terutama terdapat pada daun yang mengandung gula steviosida dan rebaudiosida-A (glikosida diterpen). Teknik kultur *in vitro* merupakan salah satu perbanyakan yang dapat meningkatkan perbanyakan melalui kalus dengan modifikasi medium pertumbuhan kalus. Penelitian ini bertujuan memperoleh kombinasi ZPT untuk menghasilkan kalus. Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Biologi, UGM dan Laboratorium Kimia, Fakultas Mipa, Universitas Muhammadiyah Malang (UMM) sejak Juni – Oktober 2015. Pada tahap induksi kalus, eksplan daun *stevia* ditanam pada medium MS dengan kombinasi ZPT auksin/NAA (2 mg/L), 2,4-D (2 mg/L) dan sitokinin/BAP (0,5 dan 1 mg/L); Semua perlakuan dengan 3 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan 2,4-D 2 mg/L dan BAP 1 mg/L merupakan konsentrasi yang terbaik untuk menghasilkan kalus *Stevia rebaudiana*, dengan laju induksi kalus yaitu 12 hari, warna kalus putih, dan tekstur kalus remah.

Kata kunci: kalus, NAA, 2,4-D, *Stevia rebaudiana*

ABSTRACT

Stevia is a plant that produces natural sweetener with sweetness level about 300 times higher than sugar. This sweetener was obtained mainly in the leaf of *stevia*, which contains stevioside and rebaudioside-A (diterpen glycosides). Production of stevioside can be generated in callus from leaves of *Stevia* through the technique of plant tissue culture. The objectives of this research were to induce proliferation of callus and increasing the content of stevioside in callus. This research was conducted in the laboratory of Biotechnology, Faculty of Biology, UGM from June 2015. The design of the research was CRD. Callus production using combination of ZPT Auxin; NAA (2 mg/L) and 2,4-D (2 mg/L) and Cytokinin; BAP (0; 0.5; 1 mg/L). All treatment with 3 replication. Qualitative data such as colour and texture of callus was analyzed as descriptive data. The result showed that the combination of 2 mg/L 2,4-D and 1 mg/L is the best concentration to produce callus from leaves of *Stevia rebaudiana*, indicated by the highest rate of callus induction within 12 days, white color of callus, and friable texture of callus.

Keywords: callus, NAA, 2,4-D, *Stevia rebaudiana*

PENDAHULUAN

Stevia merupakan sumber pemanis alami yang mempunyai tingkat kemanisan 300 kali lebih manis dibandingkan dengan gula tebu (Darmoko dan Atmawinata, 1984). Bahan pemanis tanaman ini diperoleh dari bagian daun yang mengandung gula steviosida dan rebaudiosida-A (glikosida diterpen) (Atmawinata et al., 1984). Keunggulan steviosida dibandingkan dengan pemanis

lainnya adalah non karsinogenik dan tidak berk kalori (Fujita dan Edahiro, 1979).

Santoso dan Nursandi (2002), juga menyatakan teknologi kultur jaringan ini mempunyai beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan perbanyakan tanaman dari benih, antara lain mengatasi perbanyakan tanaman yang presentase perkecambahan bijinya rendah, memperpendek waktu perbanyakan tanaman yang masa reproduksinya

membutuhkan waktu yang panjang, tanaman yang dihasilkan tahan terhadap serangan bakteri dan virus, tanaman yang dihasilkan mempunyai keseragaman genetik yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan tanaman yang berasal benih, tidak terlalu membutuhkan tempat yang luas, dan biaya pengangkutan bibit relatif lebih murah dan mudah.

Beberapa penelitian Kultur *in vitro* *Stevia* telah dilakukan antara lain oleh Uddin *et al.* (2006), disebutkan bahwa penggunaan 2,4-D dengan berbagai konsentrasi (2 – 5 mg/L) mampu menginduksi kalus daun *Stevia rebaudiana* pada medium MS dalam rentan waktu antara 10 – 12 hari. Shamshad *et al.* (2014), menyatakan bahwa penggunaan NAA 1-3 mg/L pada medium MS dapat memunculkan kalus dengan sifat kalus kompak dan berwarna hijau.

Tujuan penelitian ini mendapatkan kombinasi ZPT efektif untuk menghasilkan pertumbuhan kalus terbaik.

METODE PENELITIAN

Rancangan percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilaksanakan pada bulan Juni sampai Oktober 2015 di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Biologi, UGM

Eksplan yang diambil adalah daun dari tanaman *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) Bertoni M. berasal dari daerah Tawangmangu, Lawu. Parameter pertumbuhan kalus *Stevia* yang

diamati yaitu kecepatan waktu induksi kalus, persentase induksi kalus, dan morfologi kalus. Penggunaan ZPT pada media MS berupa auksin yaitu NAA (2 mg/l) dan 2,4 D (2 mg/l), BAP (0,5 dan 1 mg/l).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Inisiasi Kalus

Dari data inisiasi kalus yang diperoleh dari hasil uji analisis varian (ANOVA) untuk mengetahui adanya pengaruh konsentrasi 2,4-D; NAA; dan BAP terhadap pembentukan kalus *stevia*. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4 D 2 mg/l + BAP 1 mg/l dan NAA 2 mg/l + BAP 1 mg/l memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hari munculnya kalus, sebab signifikansi sebesar $0,05 \geq 0,05$. Sedangkan perlakuan konsentrasi BAP 0,5 mg/l dan BAP 1 mg/l tidak berpengaruh terhadap munculnya kalus. Antara kontrol dan perakuan BAP 0,5 mg/l dan BAP 1 mg/l tidak menunjukkan beda nyata karena tidak muncul kalus. Antara perlakuan 2,4 D 2 mg/l dengan 2,4 D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l dan 2,4 D 2 mg/l + BAP 1 mg/l tidak menunjukkan beda nyata. Untuk perlakuan NAA 2 mg/l dengan NAA 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l menunjukkan tidak beda nyata, namun jika dibandingkan dengan NAA 2 mg/l + BAP 1 mg/l menunjukkan ada beda nyata. Bisa diketahui ada dan tidaknya beda nyata dilihat dari notasi huruf pada tabel 1 di bawah.

Tabel 1. Pengaruh Perlakuan terhadap Waktu Induksi Kalus

Perlakuan	Σ eksplan yang ditanam	Waktu Induksi Kalus (hari)	Persentase pertumbuhan kalus (%)
A0B0 (kontrol)	6	0 ^a	0
A1B0 (2,4-D 2 mg/l)	6	14,33 $\pm$ 0,57 ^{bc}	100
A2B0 (NAA 2 mg/l)	6	16,33 $\pm$ 2,51 ^c	100
A0B1 (BAP 0,5 mg/l)	6	0 ^a	0
A1B1 (2,4-D 2 mg/l+BAP 0,5 mg/l)	6	14,33 $\pm$ 0,57 ^{bc}	100
A2B1 (NAA 2 mg/l+BAP 0,5 mg/l)	6	15,00 $\pm$ 1,73 ^c	100
A0B2 (BAP 1 mg/l)	6	0 ^a	0
A1B2 (2,4-D 2 mg/l+BAP 1 mg/l)	6	12,33 $\pm$ 0,57 ^b	100
A2B2 (NAA 2 mg/l+BAP 0,5 mg/l)	6	12,66 $\pm$ 0,57 ^b	100

Pembentukan kalus pada eksplan menurut Krisnamoorthy (1981), diawali dengan membesarnya sel epidermis bagian atas kemudian sel tersebut membelah. Gunawan (1987), juga mengungkapkan dalam jaringan yang membentuk kalus, pembelahan sel tidak terjadi pada semua sel (jaringan asal), tetapi hanya sel di lapisan perifer yang membelah terus-menerus, sedangkan sel yang ditengah tetap *quisent*. Hal ini yang

menyebabkan pembentukan kalus terjadi pada kedua ujung atau bagian tengah eksplan yang sebelumnya telah terjadi pembengkakan. Dari Hasil Tabel dapat dilihat bahwa kalus muncul pada perlakuan kombinasi auksin berupa 2,4-D dan NAA dengan sitokinin yaitu BAP. Perlakuan auksin mampu menginisiasi kalus yaitu pada perlakuan 2,4-D 2 mg/l dan NAA 2 mg/l. Selain itu kalus juga muncul pada kombinasi perlakuan 2,4-D 2 mg/l + BAP 0,5

mg/l; 2,4-D 2 mg/l + BAP 1 mg/l; NAA 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l; NAA 2 mg/l + BAP 1 mg/l. Pada penelitian ini, kalus tidak terbentuk pada eksplan yang tidak diberi tambahan ZPT atau kontrol. Kalus yang tidak muncul ini dimungkinkan karena auksin endogen pada eksplan stevia belum mampu menginduksi kalus, dengan kata lain eksplan mempunyai kandungan auksin yang rendah, sehingga masih membutuhkan tambahan auksin eksogen pada media kultur. Seperti yang dikatakan oleh Pierik (1987) bahwa auksin dikenal sebagai hormon yang mampu berperan menginduksi kalus. Perlakuan sitokinin berupa BAP konsentrasi 0,5 mg/l dan 1 mg/l juga tidak mampu menginduksi kalus. Hal ini juga diduga kandungan auksin endogen dalam eksplan yang rendah, sehingga kalus tidak mampu muncul pada perlakuan sitokinin.

Tahapan pembentukan kalus (Gambar 1) terjadi pada hari ke ± 6 mulai terjadi tahap pelengkungan eksplan daun (gambar a.), lalu diikuti dengan pembengkakan daun pada hari ke ± 9 (gambar b.), kemudian akan muncul kalus pada bagian permukaan eksplan daun dan bekas irisan daun pada hari ke ± 13 (gambar c.), kalus selanjutnya akan diinkubasi dan akan disubkultur ke medium selanjutnya setelah umur 6 minggu (gambar d.)

Auksin mempengaruhi proses pembesaran sel, auksin eksogen dalam hal ini 2,4-D yang terlarut dalam media, akan berdifusi masuk ke dalam sel-sel eksplan melalui luka pada ujung eksplan. Auksin akan memacu pelunakan dinding sel dengan cara mengaktifasi pompa proton (ion H^+) yang terletak pada membrane plasma, sehingga menyebabkan derajat keasaman (pH) pada dinding sel lebih rendah, yaitu mendekati pH pada membrane plasma (sekitar pH 4,5). Aktifnya pompa proton tersebut dapat memutuskan ikatan hidrogen di antara myofibril selulosa dinding sel. Putusnya ikatan hidrogen menyebabkan dinding sel mudah merenggang sehingga tekanan dinding sel akan menurun dan mengakibatkan pelenturan sel. Derajat keasaman yang rendah juga dapat mengaktifasi enzim tertentu pada dinding sel yang dapat mendegradasi bermacam-macam protein atau polisakarida yang menyebar pada dinding sel yang lunak dan lentur, sehingga pembesaran sel dapat terjadi (Catala et al., 2000 dalam Haryati, 2010)

Laju Induksi Kalus dan Persentase Pertumbuhan Kalus

Respon pemberian kombinasi perlakuan ditunjukkan pada waktu induksi berkalus dan persentase pertumbuhan kalus (%) yang

ditunjukkan pada Tabel 2 di bawah ini. Kalus mampu terinduksi pada eksplan daun stevia yang ditanam pada medium dengan pemberian auksin 2,4-D 2 mg/l dan NAA 2 mg/l. Selain itu, kalus mampu terinduksi pada kombinasi perlakuan 2,4-D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l; 2,4-D 2 mg/l + BAP 1 mg/l; NAA 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l; NAA 2 mg/l + BAP 1 mg/l. Laju induksi kalus dari masing-masing perlakuan menunjukkan hasil yang tidak sama. Induksi kalus stevia pada medium MS ini rata-rata membutuhkan waktu antara 12-16 hari setelah penanaman eksplan. Berikut merupakan tabel rata-rata waktu induksi kalus dan persentase pertumbuhan kalus pada tanaman stevia. Berdasarkan tabel dapat diketahui bahwa perlakuan A1B2 merupakan kombinasi 2,4-D 2 mg/l + BAP 1 mg/l yang menunjukkan waktu paling cepat dalam menginduksi kalus, yaitu 12 hari, selanjutnya adalah medium A2B2 yang merupakan kombinasi dari NAA 2 mg/l + BAP 1 mg/l, medium A2B2 membutuhkan waktu induksi selama 13 hari. Rata-rata waktu induksi kalus dengan penambahan 2,4 D 2 mg/l (A1B0) dan 2,4 D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l (A1B1) adalah 14 hari, induksi paling lambat adalah NAA 2 mg/l tanpa sitokinin (A2B0) membutuhkan waktu 16 hari dan NAA 2 mg/l dengan BAP 1 mg/l membutuhkan waktu induksi kalus 15. Hasil penelitian ini serupa dengan penelitian Uddin *et al.*, (2006) yang mengungkapkan bahwa waktu induksi kalus daun dan batang stevia yang diinduksi dengan 2,4-D dengan berbagai konsentrasi (2 – 5 mg/l) pada medium MS berkisar antara 12 hari.

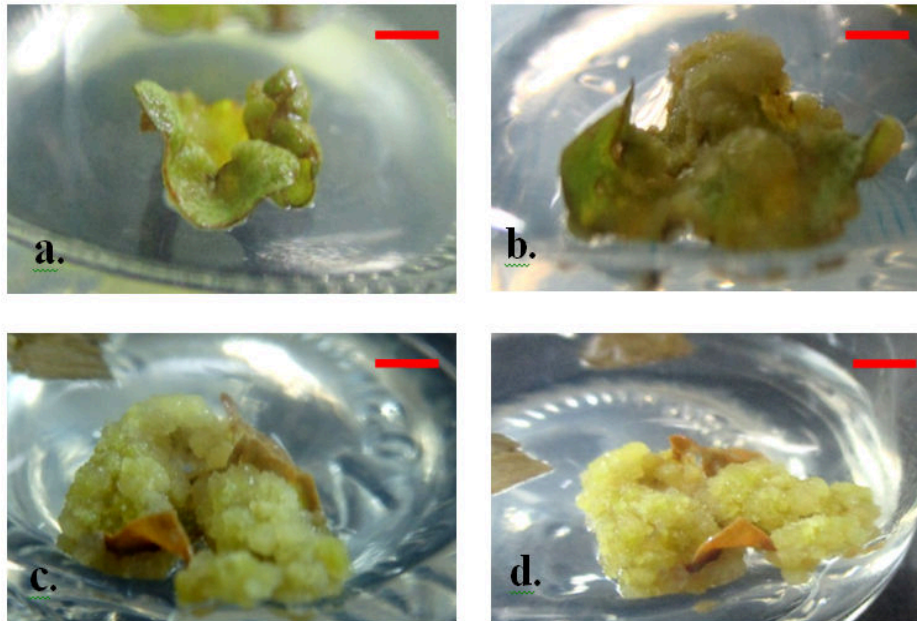
Morfologi Kalus

Objek yang diamati untuk morfologi kalus adalah massa kalus, yaitu warna kalus dan tekstur kalus yang dihasilkan. Massa kalus dapat menunjukkan perbedaan tekstur dan sifat fisik (Narayanaswamy, 1994). Sifat fisik kalus dapat ditunjukkan salah satunya dengan warna kalus. Warna dan tekstur menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui apakah suatu kalus masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati.

Berdasarkan Tabel 2 didapatkan data yaitu pada perlakuan yang diberikan zpt 2,4-D 2 mg/l menunjukkan warna kalus didominasi warna kalus putih (gambar 2a) dengan tekstur kalus remah. Sedangkan pada pemberian NAA 2 mg/l menunjukkan dominasi warna kalus hijau (gambar 2d) dengan tekstur kalus kompak. Perbedaan secara kimia antara tekstur kompak dan remah terletak pada kandungan polisakarida untuk dinding sel, di

mana lebih banyak terdapat pada kalus yang kompak. Sifat kalus seperti tekstur, kekompakan, kerapuhan dan pewarnaan juga

bergantung pada genotipe eksplan dan zpt endogen dari jaringan ketika dikulturkan (Narayanaswamy, 1994).



Gambar 1. Pembentukan kalus dan perkembangan kalus. Keterangan gambar: a. pelengkungan daun pada eksplan, b. pembengkakan daun pada eksplan, c. inisiasi kalus 13hst, d. pembentukan kalus dan inkubasi kalus pada medium 2,4 D 2 mg/l dan BAP 1 mg/l skala 0,5 cm

Pemberian jenis ZPT mempengaruhi warna dan tekstur kalus. Pemberian 2,4-D memunculkan sifat kalus yang terus melakukan pembelahan sehingga warna kalus yang dihasilkan adalah putih dan tekstur kalus yang dihasilkan remah. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hendaryono dan Wijayani (1994), yang menyatakan bahwa 2,4-D bersifat stabil karena 2,4-D ini tidak mudah mengalami kerusakan jika terkena cahaya maupun pemanasan pada saat sterilisasi, sehingga 2,4-D mampu menyebabkan perluasan dan pemanjangan sel tidak terjadi tetapi memicu pembelahan sel. Pembelahan sel yang berlebihan dan tidak diikuti dengan perluasan

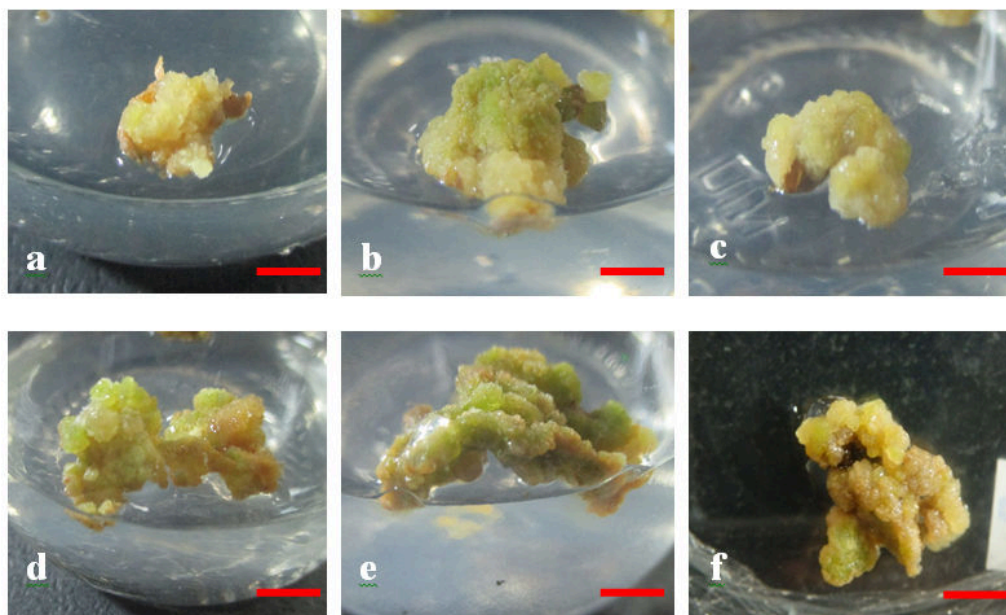
dan pemanjangan mengakibatkan terjadinya kalus.

Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik. Warna dalam satu kalus tidak sama ada yang putih, putih kehijauan dan coklat. Hal ini diduga kalus yang berwarna putih menunjukkan sel-sel muda yang masih aktif membelah. Kalus yang berwarna coklat merupakan sel-sel yang tidak aktif membelah dan kemungkinan banyak mengandung senyawa fenol. Sel-sel pada satu kelompok kalus tidak seragam karena sebagian sel masih aktif membelah dan sebagian sel sudah berhenti membelah yang dapat mempengaruhi warna kalus (Darwati 2007).

Tabel 2. Warna dan Tekstur Kalus *Stevia rebaudiana* dengan berbagai perlakuan

Kombinasi Perlakuan	Warna Kalus									Tekstur Kalus								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A0B0 (kontrol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1B0 (2,4-D 2 mg/L)	P	H	P	H	H	P	P	P	K	R	R	I	I	I	R	R	K	I
A2B0 (NAA 2 mg/L)	P	H	H	P	H	H	P	H	H	I	I	K	I	K	K	K	I	K
A0B1 (BAP 0,5 mg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1B1 (2,4-D 2 mg/L+BAP 0,5 mg/L)	P	P	P	P	H	P	P	P	HK	R	I	R	I	I	R	R	I	R
A2B1 (NAA 2 mg/L+BAP 0,5 mg/L)	H	H	H	H	P	HK	H	P	P	I	K	K	I	I	K	K	K	K
IA0B2 (BAP 1 mg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1B2 (2,4-D 2 mg/L+BAP 1 mg/L)	P	P	P	P	H	P	P	H	P	I	R	R	R	R	I	I	R	K
A2B2 (NAA 2 mg/L+BAP 1 mg/L)	H	H	P	H	PK	H	H	H	H	R	K	K	I	R	K	K	I	K

Keterangan Warna kalus P = putih, H= hijau, K= kuning, HK= Hijau kekuningan
 Tekstur kalus R= remah, K= kompak, I= Intemediet (semi remah)



Gambar 2. Morfologi kalus pada berbagai perlakuan. Keterangan gambar: a. 2,4-D 2 mg/l, b. 2,4-D 2mg/l dan BAP 0,5 mg/l, c. 2,4-D 2 mg/l dan BAP 1 mg/l, d. NAA 2 mb/l, e. NAA 2 mg/l dan BAP 0,5 mg/l, f. NAA 2 mg/l dan BAP 1 mg/l. Skala 0,5 cm

KESIMPULAN

Dari penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa perlakuan 2,4-D 2 mg/l dan BAP 1 mg/l merupakan konsentrasi yang efektif untuk menghasilkan pertumbuhan kalus *Stevia rebaudiana* yang paling baik. Hal ini ditunjukkan dengan laju induksi kalus paling cepat yaitu 12 hari, warna kalus putih, dan tekstur kalus remah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Laboratorium Bioteknologi UGM, LPPM UNIRA Malang, dan Fakultas Sain dan Teknologi UNIRA Malang yang telah memberikan izin untuk penelitian.

REFERENSI

- Andaryani. 2010. *Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (Jatropha curcas L.) secara In Vitro*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Atmawinata, O., Darmoko, T. M., dan Soekarto. 1984. Tingkat Manisnya Gula Stevia Terhadap Sukrosa. *Menara Perkebunan* 14 (2): 52-56.
- Atmoko, M. A. B. 2001. Pemberian Gambut Rawa Pening pada Tanah Latosol untuk Meningkatkan Pertumbuhan dan Kandungan Gula pada Tanaman Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni M). *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Brahmachari, G., Mandal, L. C., Roy, R., Mondal, S. dan Brahmachari, A. K. 2011. Stevioside and Related Compounds – Molecules of Pharmaceutical Promise: A Critical Review. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 1 : 5 – 19.
- Darmoko dan Atmawinata, O. 1984. Ekstraksi Gula Stevia. *Menara Perkebunan* 52 (6a): 234-236.
- Fujita, H., dan Edahira. 1979. Safety utilization of Stevia sweetener. *The Food Industry*,; 82: 65-72.
- Geuns, J. M. C. 2003. Molecules of Interest Stevioside. *Phytochemistry*, 64 : 913 – 921.
- Geuns, J. M. C. 2008. Stevioside : A Safe Sweetener and Possible New Drug for The Treatment of The Metabolic Syndrome. In : Weerasinghe, D. K. and Dubois, G. *American Chemical Society Symposium Series* 979. p. 597
- George, E.F dan Sherrington, P. D. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*, Exegetics Ltd, England. Pp. 3, 17,228,119.
- Greulach, V.A. 1973. *Plant Function And Structure*. Macmillan publishing Co., Inc. New York
- Haryati, S. K., Yulita N, & Nintya S. 2010. Induksi Kalus dari Hipokotil Alfalfal (*Medicago sativa* L.) Secara *In Vitro*

- dengan Penambahan *Benzyl Amyno Purine* (BAP) dan *a-Naphtalene Acetic Acid*. *BIOMA* 12(1): 6-12.
- Herbert, R. B. 1995. *Biosintesis Metabolisme Sekunder*. Edisi Kedua. School of Chemistry, New York.
- J. van Overbeek. 1966. Plant Hormones and Regulators. *Science* (6): 721-731
- Narayanaswamy, S. 1994. *Plant Cell and Tissue Culture*. Tata McGraw-Hill publishing Company, New Delhi
- Naeem N, Ishtiaq M, Khan P, Mohammad N (2001). *Effect Of Gibberellic Acid On Growth And Yield Of Tomato*. Journal Biology Science vol (1): 448-450
- Modi, A. R., Shukla, Y. M., Litoriya, N. S., Patel, N. J. dan Narayan, S. 2011. Effect of Gibberellic Acid Foliar Spray on Growth Parameters and Stevioside Content of Ex Vitro Grown Plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Medicinal Plants*, 3(2) : 157 – 160.
- Osborn, A. E. and Lanzotti, V. 2009. *Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application*. Springer, New York.
- Pandiangan, W. Tilaar, N. Nainggolan, L. Wahyudi (2011) *Relations between Catharanthine Content Enhancement with the Other Associated Secondary Metabolites in Catharanthus Roseus Cell Culture that Treated Tryptophan*. International Journal of Science and Research (IJSR)
- Pierik, R. L. M., 1987. In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht, Boston, Lancaters
- Rohmah. (2007). *Penggunaan BAP dan 2,4-D dalam Kultur in vitro llesiles (Amorphophallus muelleri* Blume.) Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Shirwaikar, A., Vinit Parmar, Jay Bhagat and Saleemulla Khan. 2011. Identification and estimation of stevioside in the commercial samples of stevia leaf and powder by HPTLC and HPLC. *International Journal Of Pharmacy & Life Sciences*
- Swanson, S. M., Mahady, G. B. and Beecher, C. W. W. 1992. Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot and rooted-shoot culture in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28 : 151 – 157.
- Uddin, M. S., Chowdhury, M. S. H., Khan, M. M. H., Uddin, M. B., Ahmed, R. and Baten, M. A. 2006. In vitro Propagation of *Stevia rebaudiana* Bert in Bangladesh. *African Journal Biotechnology*, 5(13) : 1238 – 1240.
- Wardani, Solichatun dan A.D. Setyawan. 2004. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. Pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin. *Biofarmasi*. Vol. 2, No. 1: 35-43.