

Keefektifan penambahan kalsium klorida untuk mengurangi nekrosis pada perbanyakan kakao (*Theobroma cacao* L.) secara *in vitro*

Effectiveness of calcium chloride in reduction of shoot necrosis on cocoa (Theobroma cacao L.) in vitro propagation

Sulistiyani Pantjaningtyas^{1*)}

Ringkasan

Berbagai upaya telah dikembangkan untuk optimasi berbagai tahapan mikropropagasi secara *in vitro*. Proses pendewasaan planlet dan pra-aklimatisasi merupakan tahapan penting yang harus diperhatikan untuk menghasilkan tanaman yang vigor dan siap ditanam di lapangan. Tujuan penelitian adalah untuk mengurangi terjadinya nekrosis pada tunas kakao sehingga diperoleh planlet yang vigor dalam perbanyakan *in vitro* melalui penambahan kalsium klorida (CaCl_2). Dalam penelitian ini digunakan dua tahap perkembangan embrio, yaitu tahapan pendewasaan embrio dan tahapan pertunasan kecambah. Penelitian menggunakan percobaan faktorial yang disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari dua faktor, yaitu faktor konsentrasi CaCl_2 terdiri dari 0, 50, 100, 150, dan 200 mg/l, dan faktor klon yaitu Sulawesi 1 dan Sca 6. Setiap percobaan diulang sebanyak tiga kali, sehingga didapatkan jumlah kombinasi percobaan $5 \times 2 \times 3 = 30$ satuan percobaan. Parameter yang diamati meliputi persentase kemampuan eksplan untuk membentuk tunas dan persentase planlet vigor. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa perlakuan penambahan CaCl_2 pada konsentrasi 150 mg/l selama tahapan pendewasaan dapat meningkatkan keragaan kecambah dan dapat meningkatkan persentase titik tumbuh, tetapi tidak dapat mencegah terjadinya gejala nekrosis pada titik tumbuh planlet. Sedangkan pada konsentrasi 50 mg/l selama tahap pertunasan dapat mengurangi timbulnya gejala nekrosis sehingga dapat meningkatkan kualitas planlet yang dihasilkan secara *in vitro*.

Kata kunci: kakao, nekrosis, kalsium klorida, embriogenesis somatik, embrio, planlet, *in vitro*.

Summary

Various efforts have been developed for the optimization of the various stages in vitro micropropagation. The maturation stage and pre-acclimatization plantlets is an important stages that must be considered to produce vigorous plants and ready to be planted in the field. The purpose of this study was to reduced shoot tip necrosis in cocoa plantlets to obtaine vigorous plantlets from in vitro propagation through the addition of Calcium Chloride (CaCl_2). The study used two stages of embryogenic development. The first was embryo maturation stage and the second was the shoot growth development stage. The study was

Naskah diterima (*received*) 2 Februari 2012, disetujui (*accepted*) 18 April 2012.

1) Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB. Sudirman No. 90, Jember, Indonesia.

*) Alamat penulis (*Corresponding Author*): listya.1606@gmail.com.

arranged factorially in experiment design of Completely Randomized Design consisting of two factors i.e. concentration of CaCl₂ consisted of 0, 50, 100, 150, and 200 mg/l and clones consisted of Sulawesi 1 and Sca 6. Each experiment was repeated three times, so the number of combination trials were 5x2x3= 30 experimental units. The parameters observed included shoot growth percentage and vigorous planlets percentage. The results showed that the addition of CaCl₂ at a concentration of 150 mg/l during maturation stage increased the embryos performance and percentage of shoot tip. However, it could not prevent the shoot tip necrosis. Whereas, the addition at a concentration of 50 mg/l during the shoot growth development stage could reduced necrosis, suggested to increase the quality of in vitro planlets.

Key words: *Cocoa, necrosis, calcium chloride, somatic embryogenesis, embryos, planlets, in vitro.*

PENDAHULUAN

Produksi bahan tanam dalam jumlah besar dan waktu yang singkat untuk menghasilkan tanaman yang sehat untuk bahan tanaman unggul membutuhkan teknologi perbanyakan *in vitro*. Berbagai upaya telah dikembangkan untuk optimasi berbagai tahapan mikropropagasi secara *in vitro*, tetapi proses pendewasaan planlet dan pra aklimatisasi merupakan tahapan penting yang harus diperhatikan untuk menghasilkan tanaman yang vigor siap ditanam di lapangan. Oleh karena itu, tahapan tersebut merupakan titik kritis dalam transplantasi tanaman selanjutnya. Planlet yang telah bertunas melalui metode *in vitro* secara tidak langsung telah terkondisikan pada lingkungan mikro yang terseleksi dengan stres minimum dan kondisi optimum untuk pertumbuhan (Hazarika, 2003).

Potensi perkembangan planlet tidak akan mencapai maksimal jika menghadapi masalah dalam perbanyakannya, diantaranya variasi somaklonal (Hwang, 2002; Farid *et al.*, 2006; Yunita, 2009), *hyperhydricity* (Misra & Datta, 2001; Kadota & Niimi, 2003; Marino *et al.*, 2003), nekrosis *shoot tip* dan *dieback*. Salah satu kendala yang dihadapi pada perbanyakan secara *in vitro* antara lain

nekrosis pada *shoot tip* serta kematian pada *shoot tip* dan daun. Nekrosis pada tanaman disebabkan oleh kematian jaringan tanaman. Hal ini biasanya disertai oleh perubahan warna menjadi hitam atau coklat pada daerah yang terkena. Nekrosis pada *shoot tip* menimbulkan banyak kerugian pada spesies tanaman berkayu (Kulkarni & D'Souza, 2000). Salah satu bagian dari *vitrification (hyperhydricity)* adalah *shoot tip necrosis* yang merupakan masalah utama pada kultur tunas *Pistacia* secara *in vitro* (Abousalim, 1990). Masalah fisiologi ini terjadi pada tiga tahap pertama perkembangan kultur, dan hal ini telah diamati pada perkecambahan pada kedua *P. vera* dan *P. atlantica* yang dikecambahkan secara *in vitro* atau ketika tahapan untuk menginduksi tunas pada kecambah.

Beberapa hipotesis telah dikemukakan untuk mengetahui penyebab *shoot tip necrosis*. Namun, defisiensi Boron (Mason & Guttridge, 1974) dan khususnya defisiensi Calcium (Sha *et al.*, 1985; McCrown & Sellmer, 1987) telah dilaporkan sebagai penyebab yang paling sering ditemui pada kasus *shoot tip necrosis*. Gejala nekrosis telah menimbulkan tingginya tingkat kematian pada bibit kakao, F3 Amazon dan Amelonado di dalam rumah kaca (Chude & Obigbesan, 1983). Pada *micrografting Pistacia*

(Abousalim & Mantell, 1992), *shoot tip necrosis* menjadi lebih banyak ditemui pada tahap pertunasan seiring dengan meningkatnya jumlah sub kultur. Berbagai faktor seperti media, berbagai macam sumber karbon seperti arang aktif, dan sumber kalsium telah diketahui dapat mengurangi terjadinya nekrosis pada tunas. *Shoot tip necrosis* dapat dengan mudah diatasi dengan penambahan beberapa taraf kalsium (Arifullah, 2011). Perubahan warna dari ujung daun muda menjadi kecoklatan bahkan menghitam adalah gejala awal dari nekrosis, yang kemudian diikuti oleh bagian batang, dan pada akhirnya mengakibatkan seluruh bagian mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan, menghitam dan kemudian mati (Martin *et al.*, 2007).

Kebutuhan akan penyediaan bibit yang berkualitas mendorong untuk diperolehnya planlet yang vigor. Planlet yang dihasilkan dari perbanyakan *in vitro* cenderung rentan dengan perubahan kondisi lingkungan, dari kondisi heterotrof menjadi autotrof.

Perkembangan planlet hasil perbanyakan secara *in vitro* merupakan tahapan penting sebelum dilakukan transplantasi tanaman ke lapangan untuk proses aklimatisasi. Untuk mendapatkan planlet yang vigor, maka kondisi dalam mendukung pertumbuhan planlet haruslah optimum. Kondisi lingkungan secara mikro harus diperhatikan dan disesuaikan dengan kebutuhan standar tanaman untuk tumbuh dan berkembang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengurangi terjadinya nekrosis pada *shoot tip* yang diikuti dengan kematian bagian planlet yang lain sehingga diperoleh planlet yang vigor hasil perbanyakan *in vitro* melalui penambahan kalsium klorida (CaCl_2) pada media kultur.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-Agustus 2011 di Laboratorium Bioteknologi dan Rumah Kaca Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Dalam penelitian penerapan keefektifan penambahan kalsium klorida ini digunakan dua tahap perkembangan embrio. Perlakuan pertama adalah tahapan pendewasaan embrio. Embrio yang sudah terseleksi diberi perlakuan kalsium klorida pada media cair dalam erlenmeyer (setiap erlenmeyer terdiri dari 50 embrio) selama dua minggu (tujuh hari dalam kondisi gelap dan tujuh hari dalam kondisi terang). Perlakuan kedua adalah tahapan pertunasan kecambah. Kecambah yang diperoleh dari embrio terseleksi ditumbuhkan dalam media pertunasan yang telah ditambahkan kalsium klorida dalam botol kultur (setiap botol terdiri dari lima kecambah) dengan lama periode kultur adalah enam minggu (dengan penyinaran 16 jam gelap dan 8 jam terang). Pengamatan dilakukan tiap dua minggu sekali selama enam minggu. Ruang kultur dikondisikan pada suhu 25°C dan kelembaban 60% dengan intensitas cahaya lampu $\pm 1.000-6.000$ lux.

Penelitian ini menggunakan percobaan faktorial yang disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari dua faktor, yaitu faktor konsentrasi CaCl_2 terdiri dari 0, 50, 100, 150, dan 200 mg/l, dan faktor klon yaitu Sulawesi 1 dan Sca 6. Setiap percobaan diulang sebanyak tiga kali, sehingga didapatkan jumlah kombinasi percobaan $5 \times 2 \times 3 = 30$ satuan percobaan. Parameter yang diamati meliputi persentase kemampuan eksplan untuk membentuk tunas, persentase nekrosis dan persentase kematian planlet. Pengamatan dilakukan pada bulan ketiga dan ketujuh setelah aplikasi perlakuan.

Pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diamati diuji dengan analisis sidik ragam dan bila analisis sidik ragam nyata maka dilakukan uji lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.

Gejala nekrosis pada tunas dinyatakan timbul apabila sekumpulan sel secara terbatas pada jaringan tertentu mati, sehingga terlihat adanya bercak-bercak atau noda yang berwarna coklat atau hitam. Bentuk bercak dapat berbentuk bulat, memanjang, bersudut maupun tidak beraturan. Kematian pada tunas, akan menyebar ke seluruh bagian tanaman sehingga tanaman bisa mati.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penambahan Kalsium klorida Pada Tahapan Pendewasaan

Tahapan pendewasaan pada perkembangan perbanyakkan secara *in vitro* adalah suatu tahapan perkembangan embrio menjadi kecambah untuk siap menjadi planlet. Pada tahapan pendewasaan terjadi perkembangan dari struktur globular membentuk kotiledon dan premordia akar. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tahap pendewasaan adalah tahap yang paling sulit, hal ini dikarenakan pada tahapan ini terjadi pembelahan sel secara longitudinal dari satu sel menjadi enam sel hingga akhirnya terbentuk meristem tunas dan meristem akar (Purnamaningsih, 2002). Pada tahapan ini embrio yang terseleksi dipersiapkan untuk tumbuh normal menjadi kecambah yang siap ditunaskan, sehingga perlakuan penambahan kalsium klorida pada media pendewasaan kecambah diharapkan dapat meningkatkan performa kecambah dan meningkatkan persentase munculnya titik

tumbuh pada kecambah. Kalsium merupakan salah satu unsur yang dapat menjaga permeabilitas *differensial* dan membran sel. Selain itu, kalsium juga memiliki peranan penting dalam menjaga turgor dinding sel dan pembukaan stomata. Beberapa fungsi tersebut, telah terbukti dapat menghambat proses *senescence* pada beberapa jenis buah dan sayuran seperti pada tomat, lettuce, dan kembang kol (Kader, 1992). Ion kalsium berperan penting bagi pertumbuhan tanaman kearah atas dan pembentukan kuncup, sedangkan ion klorida berfungsi sebagai aktivator enzim-enzim yang menguraikan air pada proses fotosintesis (Fageria, 1984). Defisiensi unsur Ca dicirikan oleh berkurangnya pertumbuhan jaringan meristematik. Gejala-gejalanya yang timbul tampak pada daun, dimana daun-daun muda selain berkeriput mengalami perubahan warna, pada ujung dan tepi-tepinya klorosis (berubah menjadi kuning) dan pada tingkat lanjut menjadi nekrosis (Marschner, 1990).

Persentase munculnya titik tumbuh meningkat sesuai dengan penambahan konsentrasi CaCl_2 . Pada konsentrasi CaCl_2 150 mg/l terjadi peningkatan persentase munculnya titik tumbuh secara signifikan yaitu sebesar 35,47% untuk Sulawesi 1 dan 45,60% pada Sca 6, tetapi mengalami penurunan pada konsentrasi CaCl_2 200 mg/l yaitu sebesar 17,43% pada Sulawesi 1 dan 17,50% pada Sca 6. Media pada tahapan pendewasaan adalah media cair sehingga penyerapan CaCl_2 pada embrio dapat lebih maksimal, dimana seluruh bagian dari embrio dapat langsung menyerap unsur hara. Gejala nekrosis yang ditunjukkan pada klon Sulawesi 1 dan Sca 6 serupa yaitu timbul bercak kecoklatan pada titik tumbuh planlet, yang kemudian diikuti dengan seluruh bagian planlet mengalami *browning* yang pada

akhirnya mengalami *blackening* dan *dying*.

Penambahan CaCl_2 pada tahap pendewasaan diharapkan selain untuk meningkatkan performa kecambah dan meningkatkan persentase tunas, juga untuk mencegah terjadinya nekrosis. Hal ini, dapat dilihat dari keragaan kecambah hasil pendewasaan terlihat lebih vigor dan warna embrio putih pekat tidak transparan dibandingkan dengan kecambah tanpa perlakuan penambahan CaCl_2 . Namun, peningkatan performa kecambah dengan

ini menjadi materi pra-aklimatisasi di lapangan. Namun, nekrosis pada titik tumbuh merupakan kendala dalam menghasilkan planlet yang vigor. Sehingga, penambahan kalsium klorida pada tahapan ini diharapkan dapat mengatasi kendala tersebut.

Planlet yang vigor merupakan kunci penting tumbuhnya planlet normal pada tahapan pra-aklimatisasi. Materi awal yang digunakan dalam percobaan ini adalah kecambah yang siap ditunaskan dengan ukuran $\pm 1-1,5$ cm. Penambahan berbagai

Tabel 1. Pengaruh penambahan konsentrasi CaCl_2 pada tahap pendewasaan

Table 1. Effect of CaCl_2 concentration on maturation stage

Klon Clones	Konsentrasi CaCl_2 CaCl_2 concentration (mg/l)	Persentase titik tumbuh, % Shoot tip percentage, %	Persentase nekrosis, % Necrosis percentage, %	Persentase kematian planlet, % Planlets mortality percentage, %
Sulawesi 1	0	4.6 c	20.33 a	87.10 c
	50	16.27 b	17.82 a	78.67 b
	100	20.27 b	16.70 a	75.10 b
	150	35.47 a	8.30 b	70.47 a
	200	17.43 b	19.46 a	76.20 b
Sca 6	0	8.37 d	21.87 c	83.00 c
	50	11.33 cd	19.30 bc	76.33 b
	100	16.20 bc	17.10 b	75.40 b
	150	45.60 a	7.40 a	68.20 a
	200	17.50 b	15.67 b	72.67 ab

Catatan (Notes) : Angka-angka dalam kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf uji Duncan pada taraf 5% (Figures in the same column followed by the same letter are not significantly different to Duncan at 5% level).

adanya penambahan CaCl_2 tidak diikuti oleh penurunan gejala nekrosis pada titik tumbuh planlet, sehingga tingkat kematian planlet masih tinggi. Hal ini searah dengan pernyataan Abousalim & Mantell (1994), bahwa penambahan CaCl_2 pada media dasar MS (bahkan hingga sepuluh kali lipat) secara signifikan dapat mengurangi nekrosis, meskipun hal tersebut tidak dapat mencegah terjadinya nekrosis.

Penambahan Kalsium Klorida Pada Tahapan Pertunasan

Tahapan pertunasan merupakan tahapan penting dalam menghasilkan planlet vigor yang tumbuh normal. Pada tahapan ini terjadi pembentukan tunas dan akar. Pada media pertunasan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan sangat rendah atau bahkan tidak diberikan sama sekali. Planlet yang dihasilkan dari tahapan

taraf konsentrasi kalsium klorida (50-200 mg/l) pada media pertunasan dapat mengatasi masalah nekrosis dan kematian dari tunas kakao. Pada taraf penggunaan CaCl_2 dengan konsentrasi 50 mg/l pada perlakuan klon Sulawesi 1 dan Sca 6 secara signifikan dapat menurunkan persentase nekrosis pada tunas. Menurut Martin *et al.* (2007), penambahan beberapa taraf kalsium klorida (25-150 mg/l) pada media pertunasan dapat mencegah terjadinya nekrosis dan *dieback* pada tunas pisang dan *plantain*. Konsentrasi kalsium klorida 50-100 mg/l dianggap lebih efisien dalam mengatasi masalah tersebut.

Kecambah yang ditanam pada media tanpa penambahan CaCl_2 , pada pengamatan minggu kedua, gejala nekrosis yang timbul pada tunas sudah dapat dideteksi, meskipun hanya berupa bercak kecoklatan pada tunas, dan pada pengamatan berikutnya bercak tersebut mulai menghitam pada bagian titik tumbuh dan mengakibatkan kematian pada planlet bahkan ketika kecambah sudah menjadi planlet sempurna dan siap diaklimatisasi. Potensi terjadinya nekrosis dapat dikurangi dengan penam-

bahan CaCl_2 pada media pertunasan. Rahman (1999) mengemukakan bahwa pemberian 100 ppm pada tanaman *poissentia* dapat mengurangi terjadinya *bract necrosis* pada 'Poissentia V-14 Glory'. Halevy *et al.* (2006) mengemukakan bahwa perlakuan CaCl_2 pada bunga potong mawar dapat mendorong pemebaran kuntum bunga mawar dan menghambat terjadinya *senescence*.

Tunas yang tumbuh pada planlet kakao dengan penambahan CaCl_2 tidak menunjukkan gejala nekrosis lebih lanjut ataupun kematian setelah lebih dari 6 minggu. Menurut Sukma & Gigin (2007), peningkatan konsentrasi kalsium yang diberikan tidak selalu meningkatkan jumlah kalsium yang terserap. Konsentrasi yang terlalu tinggi justru dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan tanaman akibat keracunan. Hal ini dapat dilihat dari hasil percobaan pada Tabel 2, bahwa peningkatan konsentrasi CaCl_2 menunjukkan terjadinya penurunan jumlah tunas yang terbentuk pada planlet.

Nekrosis pada tunas kakao (Gambar 2A dan 2B) muncul pada periode kultur

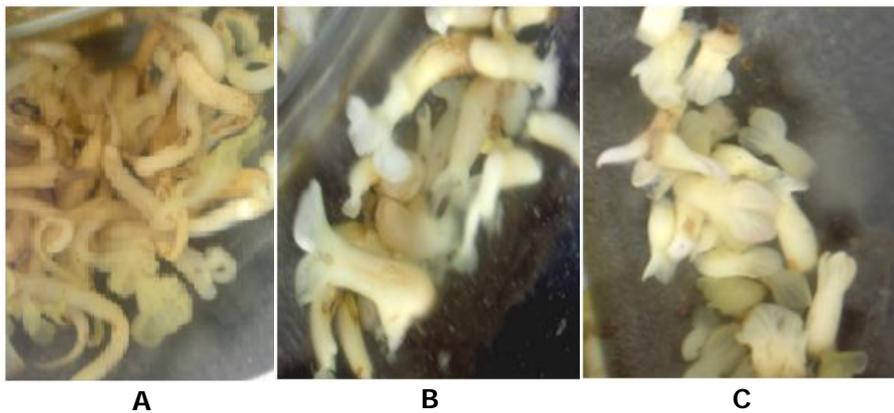
Tabel 2. Pengaruh penambahan konsentrasi CaCl_2 pada tahap pertunasan

Table 2. Effect of CaCl_2 concentration on shoot growth development stage

Klon Clones	Konsentrasi CaCl_2 CaCl_2 concentration (mg/l)	Persentase nekrosis, % Necrosis percentage, %			Persentase kematian planlet Planlets mortality percentage
		Minggu-2	Minggu-4	Minggu-6	
		Week-2	Week-4	Week-6	
Sulawesi 1	0	51.20 a	56.67 a	61.37 a	73.20 a
	50	0.00 d	13.24 d	17.37 d	21.83 c
	100	34.18 b	36.27 b	37.17 bc	42.43 b
	150	33.73 b	37.57 b	41.77 bc	44.67 b
	200	27.80 c	29.87 c	32.73 c	43.17 b
Sca 6	0	40.80 a	53.77 a	56.97 a	63.40 a
	50	0.00 d	10.17 d	15.83 d	18.67 e
	100	19.87 b	21.43 c	27.80 c	30.43 d
	150	22.83 c	26.33 bc	30.57 bc	36.17 c
	200	30.37 d	31.67 b	37.80 bc	40.93 b

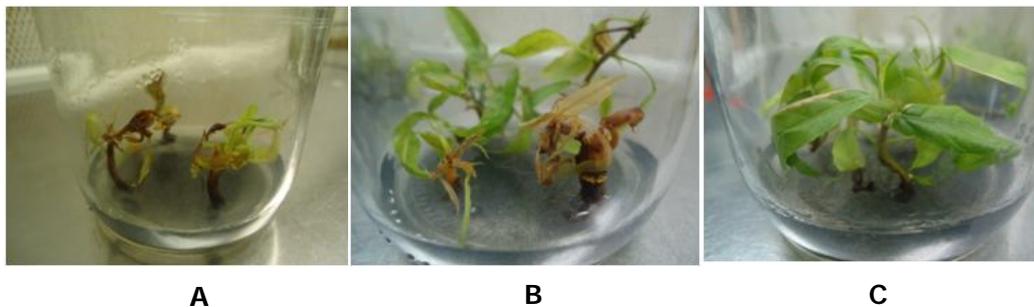
Catatan (Notes) : Angka-angka dalam kolom yang sama yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf uji Duncan pada taraf 5% (Figures in the same column followed by the same letter are not significantly different to Duncan at 5% level)

Keefektifan penambahan calcium chloride untuk mengurangi nekrosis pada perbanyakan kakao secara in vitro



Gambar 1. Keragaan embrio pada tahapan pendewasaan (A=tanpa penambahan CaCl_2 , B= klon Sca 6 setelah penambahan CaCl_2 , C= klon Sulawesi 1 setelah penambahan CaCl_2).

Figure 1. Embryo performance on maturation stage (A=without addition of CaCl_2 , B= Sca 6 after addition of CaCl_2 , C=Sulawesi 1 after addition of CaCl_2).



Gambar 2. Planlet kakao hasil perbanyakan *in vitro* (A=planlet kakao yang mengalami nekrosis pada tunas tanpa penambahan CaCl_2 dan B=planlet kakao yang mengalami nekrosis pada tunas setelah penambahan CaCl_2 pada konsentrasi 200 mg/l. C =Planlet kakao normal setelah perlakuan CaCl_2 pada konsentrasi 50 mg/l).

Figure 2. Cocoa plantlet from *in vitro* propagation (A= shoot tip necrosis on cocoa plantlets without addition of CaCl_2 and B=shoot tip necrosis on cocoa plantlets after addition of CaCl_2 at a concentration 200 mg/l. C. Normally cocoa plantlets after addition of CaCl_2 at a concentration 50 mg/l).

kurang dari empat minggu, gejalanya dimulai dari berubahnya warna titik tumbuh tunas menjadi berwarna kecoklatan. Daun yang terbentuk akan rontok, kemudian gejala tersebut menyebar ke seluruh bagian tanaman sehingga planlet akan mengalami kematian. Penambahan CaCl_2 pada media pertunasan dapat mengurangi gejala nekrosis, dimana tunas yang terbentuk akan tetap tumbuh normal dan vigor sampai planlet siap untuk diaklimatisasi (Gambar 2C).

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Perlakuan penambahan CaCl_2 pada tahapan pendewasaan dapat meningkatkan keragaan kecambah dan dapat meningkatkan persentase titik tumbuh pada konsentrasi 150 mg/l. Namun, tidak dapat mencegah terjadinya gejala nekrosis pada titik tumbuh planlet.

2. Perlakuan penambahan CaCl_2 pada tahap pertunasan dengan konsentrasi 50 mg/l dapat mengurangi timbulnya gejala nekrosis sehingga dapat meningkatkan kualitas planlet yang dihasilkan secara *in vitro* dan planlet menjadi lebih vigor.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdri. Rina Arimarsetiowati, SP., Sdri. Hudzaifah UI Mufida, A. Md. atas bantuan teknis yang baik dalam penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada staf Laboratorium Bioteknologi Pusat Penelitian Kopi Dan Kakao Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Abousalim, A. (1990). *Micropropagation and micrografting of Pistachio (Pistacia vera L. and Pistacia atlantica Desf.)* Thesis, University of London, Wye College, UK.
- Abousalim, A. & S.H. Mantell (1992). Micrografting of Pistachio (*Pistacia vera L. cv. Mateur*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29, 231-234.
- Abousalim, A. & S.H. Mantell (1994). A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in *in vitro* shoot cultures of *Pistacia vera cv. Mateur*. *Journal of Horticultural Science*, 69, 357-365.
- Arifullah, M. (2011). In vitro shoot regeneration and control of shoot tip necrosis in tissue cultures of *Soymida februga* (Roxb.) A. Juss. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 21, 11-25.
- Chude, V. & G.O. Obigbesan (1983). Safe and toxic application rates of boron for cocoa (*Theobroma cacao*) seedlings. *Plant and Soil*, 74, 145-147.
- Fageria, N.K. (1984). *Fertilization and mineral nutrition of rice*. Embrapa Cnpaf/Editoria Campus, Rio de Janeiro.
- Farid, M.; Y. Musa; Nasaruddin & Darmawan (2006). Variasi soma-klonal tebu tahan salinitas melalui mutagenesis *In vitro*. *Agrivigor*, 5, 247-258.
- Halevy, A.H.; S. Torre; A. Borochoy; R. Porat; S.H. Philosoph; S. Meir & H. Friedman (2006). *Calcium in Regulation of Postharvest Live of Flowers*.
- Hazarika, B.N. (2003). Acclimatitition of tissue cultured plants. *Current Science*, 85, 1702-1712.
- Hwang, S. (2002). Somaclonal variational approach to breeding Cavendish banana for resistance to *Fusarium wilt* race 4. *Global conference on banana and plantain*, Bangalore, India, 28-31.
- Kader, A.A. (1992). Postharvest biology and technology: an overview. p. 15-20. In: A.A. Kader (Ed.). *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Pub. 3311. University of California. California.
- Kadota, M. & Y. Niimi (2003). Effect of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 261-265.
- Kulkarni K. & L. D'Souza (2000). Control of in vitro shoot tip necrosis in *Butea monosperma*. *Current Science*, 78, 125-126.
- Marschner, H. (1990). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press Inc., London.
- Marino, C.; M.T. Poncel; M.E. Videla; S. Fioretti & S. Cirrincione (2003). Micropropagation of *Grandularia perakii* Cov. Et Schn. (Verbernacea), a native species with ornamental potential. *Biocell*, 27, 56-60.

- Martin, K.P.; C. Lai Zhang; A. Slater; J. Madasseray (2007). Control of shoot necrosis and plant death during micropropagation of banana and plantains (*Musa spp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88, 51–59.
- Mason, G.F. & C.G. Gutteridge (1974). The role of calcium, boron and some divalent ions in leaf tipburn of strawberry. *Scientia Horticulturae*, 2, 299–308.
- McCown, B.H. & J.C. Sellmer (1987). General media and Vessels Suitable for Woody Plant Culture. p. 4–16. In: J.M. Bonga & D.J. Durzan (Eds). *Cell and tissue culture in forestry*, Vol. 1. *General Principles and Biotechnology*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, Netherlands,
- Misra, P. & S.K. Datta (2001). Direct differentiation of shoot buds in leaf segments of white marigold (*Tagetes erecta* L.). *In vitro Cellelular & Developmental Biology-Plant*, 37, 466–470.
- Purnamaningsih, R. (2002). Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatic dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Buletin AgroBio*, 5, 51–58.
- Rahman, F. (1999). *Pemberian Kalsium Nitrat ($Ca(NO_3)_2$) untuk Mencegah Bract Necrosis pada Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd)*. Skripsi. Departemen Budidaya Pertanian. Fakultas Pertanian. IPB. Bogor. 28 hal.
- Sha, L.; B.H. McCown & A.P. Lloyd (1985). Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110, 631–635.
- Sukma, D. & G. Mardiansyah (2007). *Pengaruh kalsium ($CaCl_2$) terhadap kualitas bunga potong anggrek *Dendrobium "Burana Strip"**. Prosiding Simposium, Seminar dan Kongres IX PERAGI 2007. Bogor. p. 328–323.
- Yunita, R. (2009). *Pemanfaatan Variasi Somaklonal dan Seleksi In vitro dalam Perakitan Tanaman Toleran Cekaman Abiotik*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.
