

Respon Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Varietas Manding terhadap Cekaman Salinitas (NaCl) secara *In Vitro*

Nur Fadlilatus Sholihah, dan Triono Bagus Saputro

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: trionobsaputro@bio.its.ac.id

Abstrak—Kebutuhan *Zea mays* setiap tahunnya mengalami peningkatan. Peningkatan tersebut akan sulit dipenuhi mengingat semakin berkurangnya lahan pertanian akibat konversi lahan pertanian menjadi area perumahan. Saat ini, hal tersebut dapat diatasi dengan pemanfaatan lahan salin. Salah satu masalah dalam penggunaan lahan salin adalah adanya kandungan salinitas yang tinggi yang berdampak buruk bagi pertumbuhan dan produktivitas tanaman. Sehingga, perlu dilakukan uji ketahanan *Z. mays* varietas lokal Indonesia terhadap cekaman salinitas secara *in vitro*. Pada penelitian ini, menggunakan varietas Manding. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui respon dan tingkat ketahanan kalus *Z. mays* varietas Manding terhadap cekaman salinitas (NaCl). Kalus diinduksi pada medium MS0 + 2,4-D 3 ppm selama 28 hari. Setelah itu, kalus diberi perlakuan dengan menambahkan NaCl (0, 2500, 5000, 7500 ppm) pada medium MS0 + 2,4-D 3 ppm dan diinkubasi selama 28 hari. Selanjutnya, dilakukan pengamatan morfologi kalus, perhitungan persentase kalus hidup serta penambahan berat kalus yang mampu bertahan. Hasil yang diperoleh yakni terjadi perubahan morfologi terhadap warna kalus, semakin tinggi konsentrasi NaCl menunjukkan terjadinya browning. Persentase kalus hidup menunjukkan bahwa kalus varietas Manding mampu bertahan di setiap tingkat konsentrasi. Dan pada penambahan berat kalus menunjukkan bahwa terjadi penurunan berat kalus seiring dengan meningkatnya konsentrasi NaCl pada medium.

Kata Kunci— *In vitro*, Kalus, Salinitas, *Zea mays*.

I. PENDAHULUAN

PENULISAN jagung (*Zea mays*) termasuk dalam jenis tanaman semusim, tergolong dalam famili graminaceae dan berbiji tunggal (monokotil) [1]. Yang merupakan salah satu bahan pangan pokok potensial dan komoditas penting dalam agribisnis [2]. Hasil panen tanaman jagung penting dalam upaya peningkatan ekonomi agrikultur dunia [3]. Rujukan [4], menjelaskan bahwa dalam 20 tahun kedepan, penggunaan *Z. mays* diperkirakan terus meningkat dan bahkan setelah tahun 2020 lebih dari 60% dari total kebutuhan nasional. Adanya konversi lahan pertanian menjadi area perumahan menyebabkan kebutuhan tersebut akan sulit untuk dipenuhi. Hal tersebut dapat diatasi dengan memanfaatkan lahan salin.

Lahan salin di dunia meliputi “salt marshes” di zona temperate, dan daerah pasang surut (mangrove swamps) di

daerah subtropik dan tropik. Diperkirakan antara 400-900 juta ha lahan di dunia mempunyai problema salinitas. Di Indonesia sendiri mempunyai lahan salin sepanjang 99.093 km [5], sehingga memiliki potensi besar untuk menambah luasan area pertanian. Namun, keterbatasan dalam memanfaatkan lahan salin adalah kandungan salinitas yang tinggi.

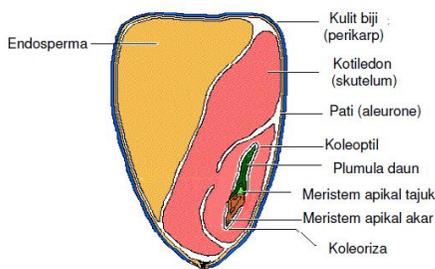
Salinitas merupakan salah satu faktor pembatas utama yang mampu menyebabkan menurunnya pertumbuhan dan produktivitas suatu jenis tanaman [6]. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pengaruh cekaman salinitas terhadap tiga varietas tanaman *Z. mays* yakni Arjuna, Bisma, dan Sukmaraga menunjukkan pengaruh terhadap menurunnya tinggi tanaman, jumlah daun, luas daun, berat kering, panjang akar, dan kandungan klorofil [7]. Hal ini terjadi karena cekaman salinitas dapat menyebabkan berbagai efek pada fisiologi tanaman seperti laju respirasi meningkat, toksisitas ion, perubahan pertumbuhan tanaman, distribusi mineral, mengganggu permeabilitas membran, dan penurunan tingkat fotosintetik [8].

Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan uji ketahanan jagung lokal Indonesia terhadap salinitas secara *in vitro*. Varietas jagung yang digunakan pada penelitian ini adalah Manding. Yang merupakan salah satu varietas unggul lokal yang menjadi tanaman favorit bagi masyarakat Sumenep [9]. Penelitian ini dilakukan melalui seleksi *in vitro*. Rujukan [10], menjelaskan bahwa Seleksi *in vitro* merupakan salah satu cara untuk melakukan seleksi varietas atau galur jagung yang tahan salinitas dengan media selektif yang sesuai. Karena melalui seleksi *in vitro* akan mampu memperoleh varietas yang mempunyai sifat unggul toleran terhadap kondisi salinitas tanpa adanya faktor lingkungan yang mempengaruhi [11]. Dan Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon dan tingkat ketahanan kalus *Z. mays* varietas Manding terhadap cekaman salinitas (NaCl).

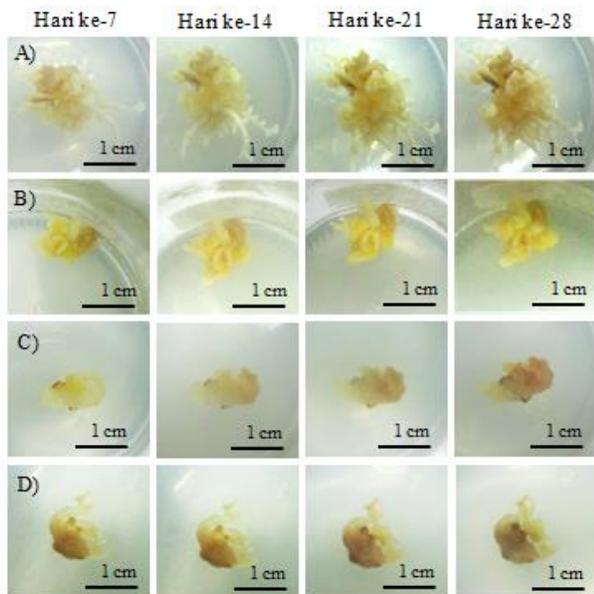
II. URAIAN PENELITIAN

A. Waktu dan Lokasi Penelitian

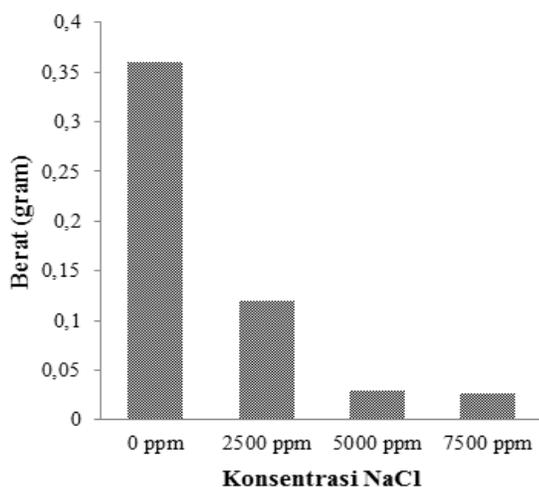
Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan



Gambar 1. Struktur benih *Z. mays* dan bagiannya [12]



Gambar 2. Morfologi kalus Manding pada konsentrasi salinitas yang berbeda A) 0 ppm, B) 2500 ppm, C) 5000 ppm, D) 7500 ppm



Gambar 3. Grafik pengaruh interaksi antara kalus *Z. mays* varietas Manding dengan variasi konsentrasi NaCl terhadap pertambahan berat kalus.

Biologi ITS pada bulan November 2014 sampai dengan Juli 2015.

B. Sterilisasi Tempat Kerja dan Peralatan

Sterilisasi tempat inokulasi berupa LAF, dilakukan dengan

menyalakan UV lamp pada LAF selama 2 jam. Kemudian dinyalakan blower LAF selama 30–60 menit dan disemprot bagian meja kerja LAF dengan alkohol 70%. Setelah itu dibersihkan menggunakan tissue steril. Sedangkan, untuk peralatan seperti glassware (botol kultur, beaker glass, erlenmeyer, gelas ukur dan cawan Petri), dissecting kit (pinset, spatula, gunting dan skapel), karet, tissue dan plastik disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 1210C tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

C. Sterilisasi Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah benih *Zea mays* varietas Manding. Untuk sterilisasi eksplan, benih dicuci pada air mengalir selama 15 menit. Drendam pada larutan sabun dan diaduk selama 30 menit. Selanjutnya, eksplan direndam dalam larutan antifungal 2gr/L selama 30 menit, larutan NaOCl 5,25% selama 5 menit, alkohol 70% selama 10 menit. Dan dibilas aquades steril sebanyak 3 kali.

D. Induksi Kalus

Proses induksi kalus menggunakan medium MS0 yang ditambahkan ZPT (zat pengatur tumbuh) yakni 2,4-D dengan konsentrasi 3 ppm. Pertama, eksplan benih yang telah disterilisasi permukaannya, dibelah menjadi dua, sehingga pada setiap bagiannya terdapat bagian embrionya. Kemudian, diambil eksplan yang sudah dibelah dan diinokulasi ke dalam botol kultur yang telah berisi medium. Setelah eksplan diinokulasi, dilakukan proses inkubasi dalam ruang kultur pada kondisi gelap selama 28 hari dengan suhu 250C ± 20C [3] dan setiap dua minggu sekali dilakukan subkultur ke medium baru.

E. Seleksi In Vitro

Kalus yang terbentuk disubkultur ke medium seleksi yakni MS0 + 2,4-D 3 ppm + NaCl (0, 2500, 5000, 7500 ppm) dan diinkubasi selama 28 hari dalam ruang kultur dengan kondisi terang.

F. Pengamatan Parameter

1) Persentase Kalus Hidup

Pengamatan presentase kalus hidup, dengan rumus [13] :

2) Morfologi Kalus

Parameter yang diamati dalam morfologi kalus terdiri dari warna dan tekstur kalus. Warna kalus pada umumnya adalah warna putih, kuning, ungu, hijau, hingga cokelat kehitaman [14]. Sedangkan, untuk tekstur kalus dapat dibedakan atas kalus yang bertekstur kompak (non friable), remah (friable), dan kalus intermediet (perpaduan kalus kompak dan kalus remah) [15].

3) Pertambahan Berat Kalus

Pertambahan berat kalus diukur dengan cara menimbang berat segar kalus sebelum seleksi (Initial growth) dan sesudah seleksi kalus (Final growth) untuk mendapatkan data

Tabel 1.
Morfologi kalus Manding sebelum dan sesudah dicekam NaCl

Konsentrasi	Ulangan	Parameter			
		Warna kalus		Tekstur kalus	
		Awal	Akhir	Awal	Akhir
0 ppm	1	Putih	Putih	Remah	Remah
	2	Putih	Putih	Remah	Remah
	3	Putih-kekuningan	Kuning muda	Remah	Kompak
2500 ppm	1	Kuning muda	Kuning	Kompak	Kompak
	2	Putih-kekuningan	Kuning-kecokelatan	Remah	remah
	3	Kuning	Kuning	Remah	Kompak
5000 ppm	1	Putih	Kuning muda	Remah	Remah
	2	Putih-kekuningan	Kuning-kecokelatan	Intermediet	Remah
	3	Putih-kekuningan	Cokelat muda	Remah	Remah
7500 ppm	1	Putih	Cokelat muda	Remah	Intermediet
	2	Kuning	Kuning-kecokelatan	Remah	Intermediet
	3	Kuning	Kuning-kecokelatan	Remah	Remah

Tabel 2.
Pengaruh variasi konsentrasi cekaman NaCl terhadap pertambahan berat kalus Manding

Source of variation	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0,221	3	0,074	3,956	0,053
Within Groups	0,149	8	0,019		
Total	0,370	11			

Tabel 3.
Pengaruh variasi konsentrasi cekaman NaCl terhadap persentase kalus hidup

Varietas	Konsentrasi NaCl (ppm)			
	0	2500	5000	7500
Manding	100%	100%	100%	100%

pertambahan berat kalus.

G. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dilakukan pengulangan 3 kali. Pengamatan dilakukan selama 28 hari untuk induksi kalus dan 28 hari untuk seleksi in vitro. Data hasil pengamatan parameter pertambahan berat kalus dianalisis dengan analisis statistik yaitu uji Anova (Analysis of Variance) satu faktor pada taraf kepercayaan 95%. Jika hasil uji Anova menunjukkan “p value” ≤ 0,05, maka akan dilanjutkan ke uji Duncan pada taraf 5%, dengan menggunakan program SPSS Statistical Software. Data hasil pengamatan morfologi kalus dan persentase kalus hidup akan dianalisis secara deskriptif.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pengaruh Beberapa Konsentrasi Cekaman NaCl terhadap Morfologi Kalus

Kalus yang diperoleh pada tahap induksi kalus, selanjutnya disubkultur pada medium seleksi yang mengandung NaCl dengan konsentrasi 0, 2500, 5000, dan 7500 ppm. Tahap ini dilakukan selama 28 hari atau 4 minggu, yang mana perubahan morfologi kalus diamati setiap 7 hari sekali. Kondisi morfologi kalus ditunjukkan pada gambar 2. Tahap induksi kalus pada penelitian ini, menggunakan ZPT 2,4-D 3 ppm. Karena penambahan 2,4-D dalam media kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus [15]. Pada penelitian [16] juga telah berhasil menginduksi kalus jagung menggunakan ZPT 2,4-D 4 ppm.

Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa adanya perubahan warna dan tekstur kalus yang telah dicekam pada medium yang ditambahkan NaCl (tabel 1), terutama pada konsentrasi NaCl 7500 ppm. Kalus pada medium tanpa NaCl memiliki warna putih hingga kuning muda, dengan tekstur remah dan kompak. Sedangkan, morfologi kalus pada medium yang ditambahkan NaCl memiliki warna kalus kuning-kecokelatan hingga coklat muda, dengan tekstur remah, intermediet dan kompak. Pada konsentrasi NaCl tertinggi, kalus mengalami perubahan warna menjadi kecokelatan.

Perbedaan morfologi tersebut, merupakan suatu bentuk respon terhadap adanya cekaman NaCl, hal yang sama terjadi pada penelitian [17], dimana kalus yang dicekam NaCl memiliki warna coklat dan tekstur kompak. Karena ketika terpapar cekaman NaCl dalam jangka waktu tertentu, fungsi fisiologis sel akan cenderung mengalami penurunan secara

berkala dan selanjutnya sel-sel tersebut akan mengalami kematian (nekrosis) jika tidak mampu beradaptasi terhadap kondisi cekaman NaCl [18].

Kalus dari hasil cekaman NaCl ini terdapat yang bertekstur remah lengket. Menurut [19], hal ini disebabkan adanya akumulasi ion Na⁺ dan Cl⁻ yang berlebihan di dalam sel dan

ketidakmampuan sel dalam mengatur konsentrasi ion di dalam sitoplasma sehingga terjadi plasmolisis sel yaitu keluarnya air dari sel menuju media tanam. Selain itu, cekaman salinitas dapat berpengaruh pada penurunan kandungan klorofil karena meningkatnya aktivitas enzim klorofilase yang disebabkan oleh berkurangnya penyerapan ion Mg dan Fe yang terlibat dalam pembentukan kloroplas [20]. Ion Mg^{2+} juga berperan sebagai enzim kofaktor dan berperan penting dalam proses ekspor hasil fotosintesis, serta dapat mencegah degradasi klorofil dengan meningkatkan aktivitas oksigenase dari enzim RuBP carboxylase [21].

Perubahan warna kalus menjadi cokelat juga dapat terjadi akibat adanya senyawa fenol dimana fenol bersifat racun/toksik bagi sel. pencokelatan jaringan terjadi karena aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase. Adanya cekaman salinitas akan mengganggu jalur metabolit sekunder suatu tanaman dan meningkatkan senyawa fenol yang berperan penting dalam mekanisme adaptasi terhadap cekaman salinitas [22]. Menurut [23] fenol yang teroksidasi akan membentuk quinon, yang merupakan senyawa yang menyebabkan warna cokelat pada kultur kalus. Intensitas warna cokelat berkorelasi positif dengan hiperaktivitas enzim oksidatif. Peningkatan enzim tersebut terkait dengan reaksi pertahanan jaringan dari stres oksidatif.

B. Pengaruh Konsentrasi Cekaman NaCl terhadap Persentase Kalus Hidup

Hasil persentase kalus hidup yang telah dicekam selama 28 hari pada beberapa variasi konsentrasi NaCl ditunjukkan pada tabel 3. Pada penelitian ini, seluruh eksplan kalus mampu merespon setiap perlakuan. Hal ini ditunjukkan melalui persentase kalus hidup sebesar 100% pada setiap perlakuan. Kalus mampu bertahan pada medium dengan konsentrasi 0, 2500, 5000, dan 7500 ppm hingga 28 hari perlakuan melalui mekanisme pertahanan dan toleransi dengan respon yang berbeda pada masing-masing kalus. Meskipun demikian, cekaman salinitas masih memungkinkan dapat menyebabkan penurunan laju pertumbuhan dan kematian jaringan kalus ketika dipapar lebih dari satu bulan

Respon yang berbeda tersebut, seperti pengurangan pertumbuhan kalus, pengurangan masa kalus dan perubahan terhadap morfologi kalus, sehingga kalus dapat tetap dapat bertahan pada medium yang ditambahkan NaCl. Rujukan [24], menyatakan bahwa adanya cekaman salinitas dengan konsentrasi tertentu dapat menyebabkan penyerapan hara dan pengambilan air terhambat, sehingga menyebabkan pertumbuhan lambat. Mekanisme adaptasi yang dilakukan oleh tanaman saat tercekam NaCl adalah dengan mengakumulasi ion-ion organik atau larutan dengan berat molekul yang rendah, senyawa yang mudah terlarut, umumnya tidak bersifat toksik pada konsentrasi yang tinggi. Senyawa-senyawa tersebut antara lain, betain, asam amino bebas, karbohidrat terlarut dan prolin [20]. Senyawa-senyawa tersebut, akan memberikan perlindungan pada tanaman dari dampak cekaman melalui mekanisme yang berbeda. Yakni, keseimbangan

osmotik seluler, detoksifikasi reactive oxygen species, menjaga integritas membran dan menstabilkan enzim atau protein [21].

Tanaman yang tercekam salinitas menunjukkan adanya akumulasi dari prolin. Dimana prolin merupakan molekul signaling/regulatory, yang dapat mengaktifkan respon pada proses adaptasi cekaman salinitas, juga sebagai osmoregulator [30]. Karbohidrat terlarut juga akan terakumulasi ketika adanya penurunan tingkat asimilasi CO_2 pada kondisi tercekam. Yang mana, memiliki peran untuk menyeimbangkan regulasi osmotik, juga bertindak sebagai sinyal metabolik pada kondisi tercekam NaCl [31]. Selain itu, sel akan memproduksi antioksidan dan beberapa enzim seperti, super oxide dismutase (SOD), APX (ascorbate peroxidase) dan catalase yang bertindak untuk memulihkan kondisi kalus akibat dampak cekaman osmotik [32].

Beberapa mekanisme toleransi di atas, dapat membantu tanaman untuk bertahan hidup pada kondisi tercekam NaCl. Seperti yang telah dilaporkan oleh [19], bahwa kriteria kalus yang tahan cekaman NaCl adalah kalus yang mampu hidup pada media salin, kalus berwarna putih hingga kuning kecokelatan, memiliki struktur remah, dan mampu tumbuh melakukan pembesaran dan pembelahan sel sehingga mempengaruhi volume kalus dan persentase proliferasi kalus.

C. Pengaruh Konsentrasi Cekaman NaCl terhadap Pertambahan Berat Kalus

Pertambahan berat kalus dihitung dari selisih antara berat kalus sebelum dicekam dengan berat kalus setelah dicekam selama 28 hari. Dilakukan analisis pengaruh variasi konsentrasi cekaman NaCl terhadap perubahan berta kalus masing menggunakan uji ANOVA dengan nilai perbedaan signifikannya $< 0,05$. Berdasarkan hasil uji ANOVA, variasi konsentrasi NaCl tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pertambahan berat kalus manding, yaitu ditunjukkan dengan nilai significantly different sebesar 0,053 seperti yang ditunjukkan pada tabel 2.

Hasil uji yang tidak berpengaruh secara signifikan tersebut, disebabkan karena meningkatnya konsentrasi NaCl tidak diikuti dengan penurunan pertambahan berat kalus secara signifikan, tidak berbeda nyata pada tiap variasi konsentrasi NaCl. Hal ini diduga, karena tingkat toleransi terhadap cekaman NaCl bergantung pada genotip pada masing-masing kalus. Sehingga, kalus yang berbeda pada media dengan konsentrasi yang sama, akan memiliki respon yang berbeda [24]. Meskipun demikian, tetap adanya penurunan pertambahan berat kalus yang telah dicekam NaCl dibandingkan dengan kalus tanpa NaCl, seperti pada gambar 3. Pada penelitian [16] yang telah dilakukan sebelumnya, juga menunjukkan bahwa cekaman salinitas mampu menurunkan berat kalus jagung varietas Manding hingga 83% dibanding dengan kontrol, karena adanya cekaman salinitas menyebabkan pertumbuhan kalus yang tidak optimal.

Kalus yang tidak diberikan cekaman NaCl memiliki pertambahan berat kalus yang lebih besar dibandingkan dengan kalus yang diberikan cekaman. Hal ini dapat terjadi karena

kalus mengalami cekaman salinitas seperti, terjadi ketidakseimbangan penyerapan air dan hara, penghambatan metabolisme akibat gangguan ketidakseimbangan ion dan efek osmotik, sehingga kalus membutuhkan energi lebih untuk melakukan metabolisme dan berpengaruh terhadap penurunan pertumbuhannya [25]. Penurunan pertumbuhan kalus merupakan fenomena umum terjadi ketika tanaman dicekam salinitas, akan menghabiskan lebih banyak energi metabolismenya daripada pada kondisi tanpa cekaman salinitas untuk bertahan pada kondisi cekaman [26], sehingga energi yang dihasilkan lebih banyak digunakan untuk mengatur penyesuaian osmotik dan berdampak pada penurunan massa sel [27]. Selain itu, cekaman NaCl dapat mengakibatkan hilangnya turgor sel akibat berkurangnya potensial air di dalam sel. Berlebihnya kandungan Na⁺ dan Cl⁻ dalam ekstraseluler menghambat asimilasi Nitrogen yakni penyerapan nitrat (NO₃) dimana sangat penting untuk pertumbuhan tanaman [28].

Cekaman salinitas juga dapat menurunkan tingkat K⁺ dan Ca²⁺, dimana ion Na⁺ mengalami peningkatan. Telah dilaporkan sebelumnya, bahwa ion K⁺ dan Ca²⁺ berperan penting dalam mempertahankan keseimbangan osmotik, juga dalam pembukaan dan penutupan stomata [29]. Menurut [24], tingginya kandungan ion Na⁺ dalam sel menghambat pengambilan K⁺ yang menyebabkan peningkatan rasio ion Na⁺/K⁺, sehingga keseimbangan ion pada sel akan terganggu dan selanjutnya akan berdampak pada terganggunya hingga kerusakan struktur dan fungsi integritas membran.

IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kalus *Zea mays* varietas Manding tahan pada konsentrasi NaCl yang tinggi. Hal ini ditunjukkan pada persentase kalus hidup sebesar 100% pada semua tingkat konsentrasi NaCl, dimana semua kalus mampu bertahan pada semua tingkat konsentrasi salinitas. Meskipun, pada konsentrasi NaCl tertinggi terjadi perubahan morfologi warna kalus menjadi cokelat dan penurunan berat kalus seiring dengan meningkatnya konsentrasi NaCl. Hal tersebut merupakan bentuk respon kalus terhadap adanya cekaman salinitas (NaCl).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis N.F.S. mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah memberikan dukungan finansial melalui Beasiswa Bidik Misi tahun 2012-2016. Selain itu, penulis juga mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing yang memberikan dana pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] R. Neni Iriany, M. Yasin H. G., dan Andi Takdir M. "Asal, sejarah, evolusi dan taksonomi tanaman jagung". Maros : Balai Penelitian Tanaman Serealia (2008).
- [2] M. Askari Kuruseng dan Muhammad Farid. "Analisis heritabilitas tanaman jagung tahan salinitas dan kekeringan hasil induksi mutasi dengan sinar gamma". Jurnal Agrisistem. Vol. 5 : No. 1, (2009) Halaman 30-39.
- [3] Rajurkar Ashish Balkrishna and Shende S. S. "In vitro screening and molecular genetic markers associated with salt tolerance in maize". African Journal of Biotechnology. Vol. 12(27), (2013) Pp. 4251-4255.
- [4] Departemen Pertanian. "Prospek dan arah pengembangan agribisnis jagung". Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Departemen Pertanian (2005).
- [5] Didy Sopandie. "Adaptasi tanaman terhadap cekaman hara mineral". Bogor: IPB (1998).
- [6] T. J. Flowers. "Improving crop salt tolerance". J. Exp. Bot. Vol. 396 (55) (2004) 307-319.
- [7] Rujito Agus Suwignyo, Renih Hayati dan Mardiyanto. "Pengaruh perlakuan salinitas awal rendah terhadap pertumbuhan dan toleransi salinitas tanaman jagung". Sumatera Selatan : Universitas Sriwijaya (2009).
- [8] M. Ashraf and M. R. Foolad. "Improving plant abiotic-stress resistance by exogenous application of osmoprotectants glycine betaine and proline". Environ. Exp. Bot. 59: (2007) 206-216.
- [9] Z. Arifin, Istiqomah N., dan Fatmawati. Pengembangan jagung varietas lokal Sumenep. Prosiding Pekan Serealia Nasional. Jawa Timur: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Timur (2010).
- [10] Kaswan Badami dan Achmad Amzeri. "Identifikasi varian somaklonal toleran kekeringan pada populasi jagung hasil seleksi in vitro dengan PEG". Agroviso. vol. 4 no.1 (2011).
- [11] H. G. Rosas, Garcia S. S., Reyes G. R., Ontiveros J. L. R., and Villasenor A. C. R. "Preliminary results on in vitro selection for tolerance to chloride excess in avocado. Revista Chapingo Serie Horticulture. Vol. 9(1): (2003) 39-43.
- [12] N. A. Subekti, Syafruddin., Efendi, R. dan Sunarti, S. "Morfologi tanaman dan fase pertumbuhan jagung". Teknik Produksi dan Pengembangan. Maros: Balai Penelitian Tanaman Serealia (2008).
- [13] Nwe N. Htwe, Mazlah Mahmood, Ho Chal Ling, Faridah Qamarus Z., Abdullah M. Z. "Responses of some selected Malaysian rice genotypes to callus induction under in vitro salt stress". African Journal of Biotechnology. Vol. 10 (3), (2011) pp. 350-362.
- [14] U. Santoso & F. Nursandi. "Kultur jaringan tanaman". Malang: Pusbitan UMM (2003).
- [15] Lili Sugiyarto dan Paramita C. K. "Induksi kalus daun binahong (*Anredera codifolia* L.) dalam upaya pengembangan tanaman obat tradisional". J. Sains Dasar. 3 (1) : (2014) 56 - 60.
- [16] Fathin F. dan Triono B. S. "Seleksi In Vitro Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) Varietas Talango dan Manding terhadap Cekaman Salinitas". Jurnal Sains dan Seni ITS. Vol. 4 (1) (2015).
- [17] A. El-Sayed El-Meleigy, Mahdia F. Gabr, Fouad H. Mohamed And Mona A. Ismail. "Responses to NaCl salinity of tomato cultivated and breeding lines differing in salt tolerance in callus cultures". International Journal of Agriculture & Biology. Vol. 6, No. 1 (2004) 1560-8530.
- [18] O. Turkmen, Sensoy S, Erdal I, Kabay T. "Effect of calcium on the emergence and seedling of tomatoes grown in salty growing Media conditions". J. Agric. Sci. 12: (2002) 53-57.
- [19] Khoiril Bariyyah. "Pengaruh NaCl terhadap kalus tebu varietas Bululawang". Jur. Agroekotek. volume 7 (1) : (2015) 1 - 5.
- [20] W. Al-Shorafa, A. Mahadeen and K. Al-Absi. "Evaluation for salt stress tolerance in two strawberry cultivars". American Journal of Agricultural and Biological Sciences. Volume 9 (3): (2014) 334-341.
- [21] Elham Ramezani, Mehdi Ghajar Sepanlou and Hasan Ali Naghdi Badi. "The effect of salinity on the growth, morphology and physiology of *Echium amoenum* Fisch. & Mey.". African Journal of Biotechnology. Vol. 10(44), (2011) pp. 8765-8773.
- [22] S. Hutami. "Ulasan masalah pencokelatan pada kultur jaringan". Jurnal Agrobigen. Vol 4. No.2 (2008) 83-88.
- [23] Fitriya Nur Laila dan Evika Sandi Savitri. "Produksi metabolit sekunder steviosida pada kultur kalus stevia (*Stevia rebaudiana* Bert. M.) dengan penambahan ZPT 2,4-D dan PEG (Polyethylene Glykol) 6000 pada media MS (Murashige & Skoog)". El-Hayah. Vol. 4, No.2 (2014) 57-65.
- [24] Summart J., Thanonkeo P., Panichajakul S., Prathepha P. and McManus M. T. "Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus

- culture". African Journal of Biotechnology. Vol. 9 (2) (2010) pp. 145-152.
- [25] I. W. A. Ubudiyah "Respon kalus beberapa varietas padi (*Oryza sativa* L.) pada kondisi cekaman salinitas (NaCl) secara in vitro". Tugas Akhir. Surabaya: Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (2013).
- [26] R. Yunita, N. Khumaida, D. Sopandie and I. Mariska. "Growth and regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus in salt medium". Bioscience Research. Volume 11(1): (2014) 04-09.
- [27] S. Babu. "Effect of salt stress in the selection of salt tolerant hybrids in rice under in vitro and in vivo condition". Asian Journal of Plant Sciences. 6(1): (2007) 137-142.
- [28] R. Yuniati. "Penapisan galur kedelai *Glycine max* (L.) Merrill toleran terhadap NaCl untuk penanaman di lahan marginal". Jurnal Makara Sains 8 (1): (2004) 21-24.
- [29] Hirschi D. "The calcium conundrum, both versatile nutrient and specific signal". Plant Physiol. Vol. 136: (2004) 2438-2442.
- [30] M. Ashraf and Orooj A. "Salt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum ammi* [L.] Sprague)". J. Arid Environ. Vol. 64: (2006) 209-220.
- [31] Chaves M. M., Maroco J. P., Pereira J. S. "Understanding plant response to drought: from genes to the whole plant". Funct. Plant Biol. Vol. 30: (2003) 239-264.
- [32] Quesada V., Ponce M. R., Micol J. L. "Genetic analysis of salt-tolerant mutant in *Arabidopsis thaliana*". Genetic. Vol. 154 : (2003) 421-436.