

Pengaruh Komposisi 2,4-D dan BAP Terhadap Pembentukan Kalus Eksplan Pucuk Nilam (*Pogostemon Cablin* Benth.) secara *In Vitro* dengan Pemotongan Horizontal dan Vertikal

Khairan Khairan^{1,2*}, Betty Mauliya Bustam^{2,3}, Yunita^{2,3}, Syaifullah Muhammad^{2,4}, Riska Meilinda⁵, Raudhatul Muna⁵

¹Departement of Pharmacy, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia, 23111

²ARC-PUIPT Nilam Aceh Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia, 23111

³Departement of Biology, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia, 23111

⁴Chemical Engineering, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia, 23111

⁵Graduated Student, Departement of Biology, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia, 23111

*Email: khairankhairan@unsyiah.ac.id

ABSTRACT

*This study aims to determine the effect of 2,4-Diclorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) and Benzyl Amino Purin (BAP) on the formation of callus of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) shoot explants by horizontal and vertical cutting methods. The parameters that observed in this study were the percentage growth of callus, time appearance of callus, weight of callus and the morphology of callus. The results showed that horizontal cutting method was able to induce callus growth with the percentages growth of callus were 18,75%, with the time appearance of callus was at 16 days at P₁; P₁₀; P₁₂; P₁₃ dan P₁₄. The highest weight of callus obtained was 0.19 grams at P₈. The results also showed that the callus yielded had a yellow and cream color, with a compact and crumb textures. Meanwhile, the vertical cutting method was able to induce callus formation with the percentage growth of callus were 12,5%. The fastest time of callus appearance was obtained in P₆ and P₈, which was 12 day after planting with the highest weight of callus obtained was 0.05 grams at P₁₂. The results also showed that vertical cutting method had brown and dark-brown of callus with a compact and crumb textures.*

Keywords: *Pogostemon cablin* Benth., callus, horizontal and vertical cutting method, 2,4-D, BAP

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh komposisi *Diclorophenoxy Acetic Acid* (2,4-D) dan *BenzilAmino Purin* (BAP) terhadap pembentukan kalus eksplan pucuk nilam (*Pogostemon cablin* Benth) dengan metode pemotongan secara horizontal dan vertikal. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah persentase eksplan pembentuk kalus, waktu kemunculan kalus (HST), berat kalus dan morfologi kalus. Hasil yang didapatkan bahwa pemotongan eksplan secara horizontal mampu menginduksi pertumbuhan kalus dengan persen rata-rata sebesar 18,75% dengan waktu kemunculan kalus paling cepat adalah pada HST ke-16 pada perlakuan P₁; P₁₀; P₁₂; P₁₃ dan P₁₄. Sementara berat basah kalus tertinggi diperoleh sebesar 0,19 gram pada perlakuan P₈. Hasil juga menunjukkan bahwa kalus yang dihasilkan pada pemotongan secara horizontal memiliki warna kuning dan krem, dengan tekstur kompak dan remah. Sementara, pada pemotongan eksplan secara vertikal mampu menginduksi kalus, dengan persentase pembentukan kalus sebesar 12,5%. Waktu muncul kalus paling cepat pada pemotongan secara vertikal didapatkan pada perlakuan P₆ dan P₈ yaitu pada HST ke-12, dengan bobot kalus yang

paling berat didapatkan pada perlakuan P₁₂ yaitu 0,05 gram. Hasil juga menunjukkan bahwa kalus yang dihasilkan pada pemotongan secara vertikal memiliki warna kalus berwarna coklat, dan coklat kehitaman dengan tekstur yang kompak dan remah.

Kata kunci : *Pogostemon cablin* Benth, pemotongan secara horizontal dan vertikal, kalus, 2,4-D, BAP

PENDAHULUAN

Ada tiga jenis tanaman nilam yang sudah dikembangkan di Indonesia, yaitu Nilam Jawa (*Pogostemon hortensis* Benth.), Nilam Sabun (*Pogostemon heyneanus* Benth.), dan Nilam Aceh (*Pogostemon cablin* Benth.). Diantara ketiga jenis nilam tersebut, Nilam Aceh (*Pogostemon cablin* Benth.) adalah yang paling umum dibudidayakan dibandingkan dua jenis nilam lainnya karena memiliki kandungan minyak atsiri yang paling tinggi, yaitu 2.5-5% (Kardinan dan Mauludi 2004). Disamping itu, Nilam Aceh (*Pogostemon cablin* Benth.) termasuk salah satu varietas tanaman nilam yang unggul karena mengandung kualitas minyak yang paling bagus dengan kandungan *patchouli alcohol* yang tinggi (Nuryani 2006; Yuhono dan Suhirman 2006).

Untuk meningkatkan ketersediaan varietas bibit unggul ada beberapa pendekatan yang dilakukan, salah satunya adalah dengan teknik kultur jaringan. Teknik kultur jaringan adalah suatu teknik menumbuhkembangkan bagian tanaman secara klonal, baik dari jaringan, sel, maupun organ dalam kondisi aseptik secara *in vitro* (Yusnita 2003; Lestari 2011; Zulkarnain 2014). Kelebihan teknik kultur jaringan dibandingkan dengan teknik lainnya adalah

tahan terhadap penyakit, seragam secara genetik, dapat dihasilkan dalam jumlah yang banyak, ketersediaan yang terus berlanjut, dapat meningkatkan produktivitas, serta mampu meningkatkan rendemen minyak yang dihasilkan (Lizawati, dkk 2009). Namun, keberhasilan teknik kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan (Gunawan 1988). Keberadaan ZPT sangat penting dalam kultur jaringan. ZPT berfungsi untuk mengontrol morfogenesis dalam pembentukan kalus (Santoso dan Fatimah 2003). ZPT yang umum digunakan dalam teknik kultur jaringan adalah golongan auksin dan sitokinin (Lestari 2011). Senyawa *2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid* (2,4-D) adalah ZPT golongan auksin yang dapat memacu pertumbuhan kalus. Sementara itu, ZPT golongan sitokinin yang umum digunakan adalah *Benzyl Amino Purin* (BAP). BAP umumnya berfungsi untuk menstimulasi pembelahan sel, organogenesis, menginduksi embriogenesis dan meningkatkan perkembangan kloroplas (Wattimena, dkk 1992 dan Kristina, dkk 2008), serta terbebas dari virus (Sitinjak, dkk 2015). Perbandingan auksin dan sitokinin yang seimbang pada

eksplan dapat menghasilkan pertumbuhan kalus (Davies 1990).

George and Sherrington (1984), menyebutkan bahwa salah satu faktor pemicu pembentukan kalus adalah pola atau teknik pemotongan eksplan. Eriansyah, dkk (2014) menyatakan bahwa pemotongan eksplan secara vertikal mampu menginduksi pembentukan kalus pada tanaman pisang ketan (*Musa paradisiaca*). Priyono dan Winarsih (2004) juga menyebutkan bahwa pola pemotongan dapat memengaruhi perubahan pada eksplan untuk menginduksi tunas maupun kalus pada tanaman lily (*Lilium longiflorum* Thumb). Hasil penelitian Silaen (2018), menyebutkan bahwa pemotongan eksplan secara vertikal efektif mempengaruhi pembentukan tunas pada manggis (*Garcinia mangostana* L.).

Saat ini, pemotongan secara horizontal dan vertikal belum pernah dilaporkan pengaruhnya terhadap pembentukan kalus, khususnya pada tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth.). Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan pemotongan secara horizontal dan vertikal terhadap eksplan pucuk nilam (*Pogostemon cablin* Benth.). Pada penelitian ini juga dilakukan optimasi pengaruh komposisi auksin (2,4-*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) dan sitokinin (*Benzyl Amino Purin*) terhadap pembentukan kalus dari eksplan pucuk nilam (*Pogostemon cablin* Benth.).

METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Jurusan Biologi FMIPA Universitas Syiah Kuala. Penelitian dilakukan pada bulan Pebruari tahun 2020 sampai dengan bulan Juni tahun 2020. Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain *laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), autoklaf, oven, timbangan analitik, pH indikator, dan *hot plate, magnetic stirrer*. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah eksplan pucuk tanaman Nilam Aceh (*Pogostemon cablin* Benth) varian Lhokseumawe, media *Murashige and Skoog* (MS), ZPT berupa 2,4-*Dichlorophenoxy Acetic Acid* (2,4-D) dan *Benzyl Amino Purin* (BAP), alkohol 70% dan alkohol 95%, air steril, bakterisida (*Planthomycin*), fungisida (*Dhithane M-45*), *iodine* 10%, vitamin C, larutan NaOCl 5%, akuade steril, gula dan agar.

Komposisi ZPT

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) berupa 2,4-D dan *Benzyl Amino Purin* (BAP) pada media *Murashige & Skoog* (MS) (Rinanto 2011; Abidin 1994). Total perlakuan adalah 16 jenis dengan pengulangan sebanyak tiga kali, sehingga diperoleh hasil sebanyak 48 unit eksplan. Komposisi ZPT dan perlakuan dapat dilihat pada (Tabel 1).

Tabel 1. Komposisi ZPT terhadap pembentukan kalus eksplan pucuk nilam (*Pogostemon cablin Benth*) secara *in vitro* dengan pemotongan horizontal dan vertikal

2,4-D (ppm)	BAP (ppm)			
	0	0,5	1	1,5
0	0:0 (P ₁)	0:0,5 (P ₂)	0:1 (P ₃)	0:1,5 (P ₄)
0,5	0.5:0 (P ₅)	0,5:0,5 (P ₆)	0,5:1 (P ₇)	0,5:1,5 (P ₈)
1	1:0 (P ₉)	1:0,5 (P ₁₀)	1:1 (P ₁₁)	1:1,5 (P ₁₂)
2	2:0 (P ₁₃)	2:0,5 (P ₁₄)	2:1 (P ₁₅)	2:1,5 (P ₁₆)

Keterangan: P₁-P₁₆ : jumlah perlakuan, setiap perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan

Pemotongan eksplan

Nilam Aceh (*Pogostemon cablin Benth*) varian Lhokseumawe yang diambil dari *Green House Nino Park*, ARC-Unsyiah selanjutnya dipotong pucuk daunnya dan disimpan dalam larutan bakterisida *plantomycin* (2 g/L) dan fungisida *Dithane M-45* (2 g/L) dan segera dibawa ke laboratorium untuk perlakuan selanjutnya.

Sterilisasi eksplan

Sterilisasi eksplan di luar Laminar Air Flow Cabinet (LAFC)

Pucuk nilam yang telah diambil selanjutnya dibersihkan dan dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil secara horizontal dan vertikal pada air yang mengalir. Eksplan yang sudah bersih direndam dalam *Beaker glass* yang berisi larutan bakterisida *plantomycin* (2 g/L) dan larutan fungisida *Dithane M-45* (2 g/L) selama 30 menit (Habibah, dkk 2013), lalu dibilas menggunakan air steril hingga bersih dan ditiriskan.

Sterilisasi eksplan di dalam Laminar Air Flow Cabinet (LAFC)

Eksplan yang telah disterilkan direndam dalam NaOCl 5% selama 5 menit, dilanjutkan dengan dibilas sebanyak 2 kali air steril dan direndam dalam larutan iodin 10%, kemudian dibilas kembali dengan 1 kali air steril. Eksplan yang telah steril, selanjutnya di sterilkan sekali lagi dengan NaOCl 5% selama 5 menit, dan dibilas sebanyak 3 kali dengan menggunakan air steril dan direndam kembali dalam larutan iodin 10%. Eksplan yang telah steril selanjutnya direndam dalam alkohol 70% selama 3 menit, kemudian dilanjutkan perendaman dengan NaOCl 5% selama 30 detik (Sugiyarto dan Kuswandi 2013). Eksplan yang telah steril kemudian dibilas menggunakan air steril sebanyak 2 kalidan selanjutnya direndam ke dalam larutan vitamin C 100 mg (Admojo dan Prasetyo 2016) dan diletakkan di cawan petri steril.

Pembuatan Media

Media inisiasi

Media inisiasi dibuat dengan melarutkan 4,6 g/L media MS dan 8 g media agar ke dalam 500 mL akuadest setril, selanjutnya diatambahkan 40 g/L gula dan ditambahkan lagi akuades steril sampai

volume akhir 1000 mL. Larutan selanjutnya diukur pH nya menggunakan pH meter pada rentang pH 5,6 – 5,8 sambil diaduk dengan menggunakan *magnetik stirrer*. Larutan media selanjutnya dipanaskan hingga semua komponen larut dan dimasukkan kedalam botol kultur (*culture flask*) dan disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 Psi selama 30 menit.

Media subkultur

Media adalah media yang telah dimodifikasi kandungan zat pengatur tumbuhnya (Tabel 1). Pembuatan media subkultur sama dengan cara pembuatan media inisiasi.

Inisiasi

Proses inisiasi diawali dengan proses sterilisasi *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), peralatan dan eksplan. Eksplan yang sebelumnya sudah disterilkan terlebih dahulu di luar L AFC dimasukkan ke dalam L AFC kemudian disterilkan kembali dengan metode sterilisasi di dalam L AFC. Eksplan kemudian dipotong bagian pucuknya sepanjang kurang lebih 1 cm dan ditanam ke dalam media inisiasi.

Subkultur

Eksplan yang terbebas kontaminasi dipindahkan dalam botol kultur yang telah berisi media modifikasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP untuk menginduksi kalus. Eksplan diamati perubahannya selama 1 bulan.

Pemeliharaan

Botol kultur yang berisi eksplan dimasukkan ke dalam ruang inkubasi kultur jaringan yang dijamin kesterilannya. Kondisi ruangan kultur harus diperhatikan kondisinya agar sesuai dengan keadaan optimum eksplan.

Pengamatan Parameter

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah persentase eksplan pembentuk kalus, waktu kemuculan kalus yang dinyatakan dengan hari setelah tanam (HST), berat kalus, dan morfologi kalus berupa warna dan bentuk kalus. Persentase eksplan pembentuk kalus dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah eksplan yang terbentuk kalus}}{\text{Jumlah eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif meliputi waktu kemunculan kalus, berat kalus, morfologi kalus, dan persentase eksplan pembentuk kalus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Eksplan Pembentuk Kalus

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa komposisi 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) dan Benzil amino purin (BAP) pada pematangan secara horizontal mampu menginduksi kalus sebanyak 9 eksplan dari total tanam 48 eksplan (tiga kali pengulangan). Kalus yang terbentuk adalah pada kombinasi ZPT 2,4-D dan BAP pada perlakuan P₁; P₄; P₅; P₈; P₁₀; P₁₂; P₁₂; P₁₄; dan P₁₅. Sehingga persentase eksplan

pembentukan kalus yang dihasilkan pada pemotongan secara horizontal adalah sebesar 18,75%. Sementara pada pemotongan secara vertikal mampu menginduksi kalus sebanyak 6 eksplan dari total tanam 48 eksplan, yaitu pada perlakuan P₄; P₅;P₆; P₈; P₉; dan P₁₂, dengan persentase eksplan pembentukan kalus yang dihasilkan adalah sebesar 12,5%. Hasil ini menunjukkan bahwa pemotongan secara horizontal mampu menginduksi pembentukan kalus lebih baik dibandingkan pemotongan secara vertikal. Rainiyati dan Martino (2007) melaporkan bahwa pemotongan eksplan secara horizontal (atau dengan pembelahan dua) mempunyai kemampuan menyentuh eksplan ke media cenderung lebih besar dibandingkan secara vertikal, sehingga penyerapan unsur hara dari media ke eksplan juga lebih besar. Mellisa dan Febliza (2018), juga melaporkan bahwa persentase pembentukan kalus yang tinggi sangat dipengaruhi oleh jenis dan kondisi eksplan, hormon yang terkandung dalam eksplan, dan kandungan ZPT yang diberikan. Sementara itu, eksplan yang tidak menghasilkan kalus diduga karena adanya perubahan fisiologis, sehingga terhambatnya pembentukan kalus. Khanayah, dkk (2012) juga menyebutkan bahwa terhambatnya pembentukan kalus dari eksplan disebabkan oleh konsentrasi penambahan ZPT yang tidak seimbang, dimana apabila kandungan ZPT nya terlalu rendah tidak mampu menginduksi pembentukan kalus. Sementara, apabila

kandungan ZPT nya terlalu tinggi bersifat toksik pada eksplan.

Waktu Kemuculan Kalus

Waktu kemunculan kalus dari eksplan merupakan salah satu indikator awal dalam kultur jaringan tanaman secara *in vitro*, waktu kemunculan kalus secara *in vitro* dinyatakan dengan hari setelah tanam (HST) (Indah dan Ermavitalini 2013). Hasil pengamatan memperlihatkan bahwa pemotongan eksplan secara horizontal dan vertikal pada pemberian kombinasi ZPT (2,4-D dan BAP) berpengaruh terhadap kemunculan kalus. Tabel 2 memperlihatkan waktu kemunculan kalus pada pemotongan baik secara horizontal maupun secara vertikal.

Tabel 2. Waktu kemunculan kalus dan berat kalus pada pemotongan baik secara horizontal maupun secara vertikal.

ZPT ^a	HST ^b		Berat Kalus (gram)	
	PSH ^c	PSV ^d	PSH ^c	PSV ^d
P ₁	16	-	0,11	-
P ₂	-	-	-	-
P ₃	-	-	-	-
P ₄	30	15	0,03	0,04
P ₅	23	15	0,05	0,04
P ₆	-	12	-	0,03
P ₇	-	-	-	-
P ₈	23	12	0,19	0,01
P ₉	-	19	-	0,01
P ₁₀	16	-	0,01	-
P ₁₁	-	-	-	-
P ₁₂	16	15	0,12	0,05
P ₁₃	16	-	0,10	-
P ₁₄	16	-	0,08	-
P ₁₅	30	-	0,03	-
P ₁₆	-	-	-	-

Keterangan: ZPT^a: Zat Pengatur Tumbuh; HST^b: Hari Setelah Tanam; PSH^c: Pemotongan Secara Horizontal; PSV^d: Pemotongan Secara Vertikal

Tabel 2 memperlihatkan bahwa pada pemotongan eksplan secara horizontal, waktu kemunculan kalus yang paling cepat adalah pada HST yang ke-16 pada perlakuan P₁; P₁₀; P₁₂-P₁₄ dengan komposisi 2,4-D dan BAP berturut-turut (0:0); (1:0,5); (1:1,5); (2:0); dan (2:0,5). Sementara waktu kemunculan kalus yang paling lama adalah pada HST yang ke-30 pada perlakuan P₁₅ dengan komposisi 2,4-D dan BAP (2:1). Tabel 2 juga memperlihatkan bahwa pada pemotongan eksplan secara vertikal, waktu kemunculan kalus yang paling cepat adalah pada HST yang ke-12 pada perlakuan P₆ dan P₈ dengan komposisi 2,4-D dan BAP berturut-turut adalah (0,5:0,5) dan (0,5:1,5). Sementara waktu kemunculan kalus yang paling lama pada pemotongan secara vertikal adalah pada HST yang ke-19 pada perlakuan P₉ dengan kombinasi 2,4-D dan BAP adalah (1:0). Hasil ini memperlihatkan bahwa pemotongan eksplan secara vertikal mampu menghasilkan waktu kemunculan kalus yang paling cepat.

Munculnya kalus dari eksplan diduga adanya aktivitas sel-sel yang terdapat didalam eksplan. Penggunaan ZPT auksin (2,4-D) dan sitokinin (BAP) dengan komposisi tertentu mampu menginduksi pembentukan kalus. Menurut Gati dan Mariska (1992), auksin jenis 2,4-D efektif menginduksi kalus dengan cara menstimulasi diferensiasi sel. Rosyidah, dkk (2014) menyatakan bahwa perbedaan kecepatan kemunculan kalus dipengaruhi oleh sitokinin jenis BAP. Namun, konsentrasi BAP tinggi dapat menghambat pertumbuhan

kalus. Sudarmaji (2003), menyatakan bahwa faktor penghambat pertumbuhan kalus adalah jenis tanaman, usia tanaman, suhu ataupun intensitas cahaya. Kalus pertama sekali muncul ditandai dengan adanya pembengkakan pada eksplan, yang kemudian diikuti adanya gumpalan jaringan yang tidak beraturan (Gambar 1). Menurut Gray (2005), gumpalan ini umumnya muncul pada bagian eksplan akibat perlukaan, dan umumnya berwarna krem kekuningan pada bagian permukaan atas kalus. Gumpalan tersebut terus membesar sampai ke permukaan eksplan.



Gambar 1. Pembengkakan eksplan saat kemunculan kalus.

Berat Kalus

Hasil pengamatan terhadap berat kalus menunjukkan bahwa eksplan yang dipotong secara horizontal mampu menghasilkan kalus (Tabel 2). Tabel 2 memperlihatkan bahwa pada perlakuan P₈ dengan kombinasi ZPT 2,4-D dan BAP (0,5:1,5) mampu menghasilkan kalus yang paling berat yaitu 0,19 gram, sementara kalus yang paling ringan dihasilkan pada perlakuan P₄ dan P₁₅ dengan komposisi 2,4-D dan BAP (0:1,5) dan (2:1) dengan berat kalus sebesar 0,03 gram. Pada pemotongan kalus secara vertikal memperlihatkan bahwa berat kalus yang paling besar diperoleh pada

perlakukan P₁₂ dengan berat kalus sebesar 0,05 gram, sementara pada perlakuan P₈ dan P₉ menghasilkan berat kalus yang paling ringan yaitu sebesar 0,01 gram (Tabel 2). Kalus yang memiliki berat kalus yang lebih besar disebabkan karena terjadinya pembelahan sel pada kalus sehingga jumlah selnya bertambah (Indria, dkk 2017). Disamping itu, berat kalus juga dipengaruhi oleh kecepatan pembelahan sel kalus dan kondisi morfologi kalus itu sendiri. Ariningsih, dkk (2003) menyebutkan bahwa laju pertumbuhan kalus baik pada media inisiasi maupun perlakuan dipengaruhi oleh keadaan fisiologis tanaman. Berat basah kalus disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan pembelahan sel. Menurut Rusdianto dan Indrianto (2012), secara fisiologis kalus terdiri dari air dan karbohidrat, sehingga kombinasi kedua kandungan zat ini dapat mempengaruhi terhadap berat kalus yang dihasilkan.

Morfologi Kalus

a. Pemotongan kalus secara horizontal

Pemotongan kalus secara horizontal menghasilkan kalus yang berwarna krem dan kuning. Eksplan pada perlakuan P₁, P₅, P₈, P₁₀, P₁₂, P₁₃, P₁₄, dan P₁₅ menghasilkan kalus yang berwarna kuning, sementara eksplan pada perlakuan P₄ menghasilkan warna kalus krem pucat. Hasil pemotongan secara horizontal memperlihatkan bahwa umumnya

kalus yang dihasilkan tahan terhadap browning, hal ini terlihat dari kalus yang dihasilkan terus berkembang dengan warna yang stabil yaitu krem dan kuning. Lizawati (2009) menyebutkan bahwa kualitas kalus dapat dilihat dari warna, bentuk dan berat kalus. Kalus yang baik adalah kalus cenderung agak putih kekuningan, hal ini karena masih dalam proses pembelahan sel (Dwi 2012). Warna kalus yang semakin gelap (kecoklatan) menandakan pertumbuhan kalus semakin menurun (Widyawati 2010). Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), warna kalus dapat dijadikan sebagai indikator keberadaan klorofil, makin banyak kandungan klorofilnya, maka semakin hijau kalus yang dihasilkan. Hendaryono dan Wijayani (1994), juga menyebutkan bahwa warna kalus juga sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pigmentasi, intensitas cahaya, dan bagian tanaman yang dijadikan sumber eksplan. Hasil pengamatan pada pemotongan secara horizontal juga memperlihatkan bahwa tekstur kalus pada perlakuan P₁, P₄, P₅, P₈, P₁₀, P₁₃, P₁₄, dan P₁₅ menghasilkan tekstur kalus yang kompak, sementara eksplan pada perlakuan P₁₂ memiliki tekstur kalus yang remah. Indah dan Ermavitalini (2013) menyebutkan bahwa tekstur kalus kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder yang lebih banyak, tekstur kompak bersifat padat dan keras karena disusun oleh sel-sel yang rapat. Sementara tekstur kalus yang remah baik digunakan untuk memperbanyak

jaringan, karena teksturnya mudah terpisah dan mengandung banyak air (Sitorus, dkk 2011). Tekstur yang remah secara fisiologis tersusun oleh sel-sel dengan ruang antar sel yang banyak.

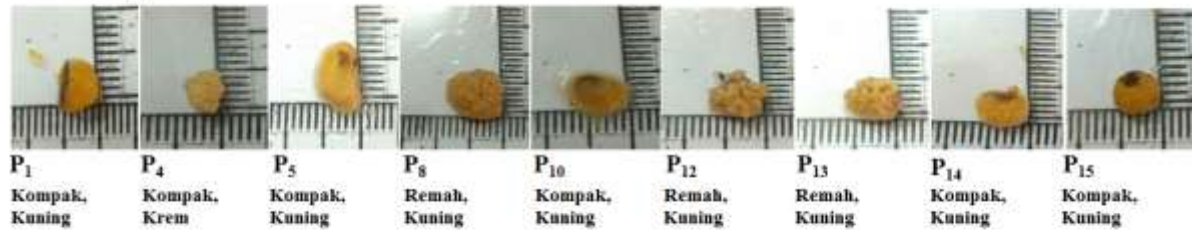
b. Pemotongan kalus secara vertikal

Pemotongan kalus secara vertikal memperlihatkan bahwa pada perlakuan P₄, P₈, dan P₁₂ menghasilkan kalus berwarna coklat kehitaman, dengan tekstur yang kompak. Sementara, perlakuan P₅, P₆, P₉ menghasilkan kalus berwarna putih kecoklatan, dengan tekstur yang remah. Hasil pengamatan juga memperlihatkan bahwa penambahan auksin 2,4-D pada konsentrasi yang tinggi menghasilkan tekstur kalus yang remah, hasil ini sejalan dengan pernyataan Maulana, dkk (2019) yang menyebutkan bahwa konsentrasi auksin yang tinggi (2-3 ppm) menghasilkan kalus dengan tekstur remah. Subarnas (2011) dan Prabakti, dkk (2017) menggolongkan tekstur kalus dalam tiga golongan yaitu kompak (*non-friable*), intermediet, dan remah (*friable*). Kalus tipe remah menghasilkan kalus tipe terbaik karena mudah berkembang menjadi sel-sel baru, yang kemudian berkembang menjadi kalus dengan bentuk yang tidak beraturan (*irregular shape*). Sitinjak, dkk (2015) menyebutkan bahwa kalus yang memberikan respon pencoklatan terjadi akibat adanya interaksi antara eksplan

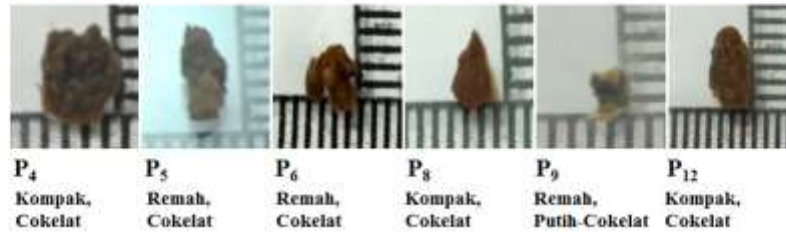
dengan media dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang diberikan.

Indikator lain yang menentukan terhadap kualitas kalus adalah warna kalus yang dihasilkan. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa warna kalus yang dihasilkan berwarna kuning, putih kecoklatan, coklat, dan coklat kehitaman (Gambar 2). Warna kalus yang terbentuk menunjukkan adanya aktivitas pembelahan dan pembentukan sel pada kalus. Pada penelitian ini, warna coklat dan coklat kehitaman yang muncul (*browning*) pada kalus yang diperlakukan dengan berbagai komposisi ZPT, hal ini diduga karena terjadinya alur metabolisme senyawa fenol yang sering terjadi akibat proses sterilisasi, atau bisa juga disebabkan oleh ketidak-akuratan pada saat pemotongan eksplan. Kualitas kalus yang baik memiliki warna hijau dan hijau kekuningan, warna hijau mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan. Semakin hijau warna kalus yang dihasilkan, maka semakin banyak kandungan klorofil yang terkandung di dalam kalus. Kalus yang berwarna terang atau putih merupakan indikasi bahwa kalus yang dihasilkan banyak mengandung air. Kalus yang berwarna coklat dan coklat kehitaman disebut sebagai kalus non-embriogenik karena tidak memiliki kemampuan untuk regenerasi sel.

A. Pemotongan secara horizontal



B. Pemotongan secara vertikal



Gambar 2. Morfologi kalus pada pemotongan eksplan secara horizontal dan vertikal

KESIMPULAN

Pemotongan eksplan secara horizontal dengan komposisi ZPT 2,4-D dan BAP mampu menginduksi pertumbuhan kalus sebesar 18,75%, waktu kemunculan kalus paling cepat adalah pada HST ke-16, dengan bobot kalus sebesar 0,19 gram, dan menghasilkan kalus berwarna krem-kuning dengan tekstur kompak dan remah. Sementara pemotongan eksplan secara vertikal mampu menginduksi pertumbuhan kalus sebesar 12,5% dengan waktu kemunculan kalus paling cepat adalah pada HST ke-12 dan berat kalus paling besar diperoleh sebesar 0,05 gram, berwarna coklat, dengan tekstur kompak dan remah.

DAFTAR PUSTAKA

Abidin, Z. 1994. *Dasar-Dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Angkasa, Bandung.

Admojo, L., dan NE. Prasetyo. 2016. Pengaruh Sterilan Terhadap Tingkat Kontaminasi

Pada Kultur Petiol dan Midrib Daun Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis*) Klon PB 330. *Jurnal Penelitian Karet*. 32, 151-164.

Ariningsih, I., Solichatun, dan A. Endang. 2003. Pertumbuhan Kalus dan Produksi Antrakuinon Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) pada Media *Murashige-Skoog* (MS) dengan Penambahan Ion Ca^{2+} dan Cu^{2+} . *Biofarmasi*, 1(2), 39-43.

Davies, PJ. 1990. *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Kluwer Academic Publisher, USA.

Dwi, NM. 2012. Pengaruh Pemberian Air Kelapa dan Berbagai Konsentrasi Hormon 2,4-D Pada medium MS Dalam Menginduksi Kalus Tanaman Anggur (*Vitis vinera* L.). *Jurnal Natural Science*, 1(1), 53-62.

Eriansyah, M., Susiyanti, dan Y. Putra. 2014. Pengaruh Pemotongan Eksplan dan Pemberian Beberapa Konsentrasi Air Kelapa Terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan Pisang Ketan (*Musa paradisiaca*) Secara *In Vitro*. *Jurnal Agrologia*, 3(1), 54-61.

- George, EF., and DP. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited, England.
- Gray, DJ. 2005. *Propagation from Nonmeristematik Tissue Culture: Non Zygotic Embryogenesis*. RCR Press LCC, New York.
- Gunawan, LW. 1988. *Teknik Kultur Jaringan*. IPB, Bogor.
- Habibah, NA., Sumadi, dan S. Ambar. 2013. Optimalisasi Sterilisasi Permukaan Daun dan Eliminasi Endofit pada Burahol. *Jurnal Biosaintifika*. 5, 94-98.
- Hendaryono, DPS., and A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Kanisius. Yogyakarta.
- Indah, N., dan D. Ermavitalini. 2013. Induksi kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) Pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzilaminopurin (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D). *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(1), 2337-3520.
- Indah, PN., dan D. Ermavitalini. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi BAP dan 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2, 2337-3520.
- Indah, PN., dan D. Ermavitalini. 2013. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyak Tanaman Melalui Kultur Jaringan. *Jurnal Biogen*. 7, 63-68.
- Indria, W., Mansyur., dan A. Husni. 2017. Pengaruh Pemberian Zat Pengatur Tumbuh 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) Terhadap Induksi Kalus dan Penambahan Zat Pengatur Tumbuh Benzyl Adenin (BA) Terhadap Induksi Kalus Embriogenik Rumput Gajah Varietas Hawaii (*Pennisetum purpureum* cv. Hawaii)(*In Vitro*). *Jurnal Fakultas Peternakan UNPAD*. 1, 1-12.
- Kardinan, A., and L. Mauludi. 2004. *Nilam : Tanaman Beraroma Wangi untuk Industri Parfum dan Kosmetik*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Khaniyah, S., Habibah, NA., dan Sumadi. 2012. Pertumbuhan Kalus Daun Dewa (*Gynura procumbens* Merr.) dengan Kombinasi 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid dan Kinetin Secara *In vitro*. *Biosaintifika*. 4(2).
- Kristina, NN., Noveriza, R., Syahid, S., dan M. Rizal., 2008. Peluang Peningkatan Kadar Kurkumin pada Tanaman Kunyit Dan Temulawak. Badan Litbang Pertanian. *Jurnal Balitro*, 9(2), 12-17.
- Lestari, EG. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyak Tanaman Melalui Kultur Jaringan. *Jurnal Agrobiogen*. 7, 63-68.
- Lizawati. 2012. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Tunas Apikal Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan Penggunaan 2,4-D dan TDZ. ISSN:2302-6472. 1, 75-87.
- Lizawati., Novita, T., dan R. Purnamaningsih. 2009. Induksi dan Multiplikasi Tunas Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) Secara *In vitro*. *Jurnal Agron*, 37(1), 78-85.
- Maulana, MR., Restanto, DP., dan Slameto. 2019. Pengaruh Konsentrasi 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid Terhadap Induksi Kalus Tanaman Sorgum (*Sorghum bicolor* L.). *Jurnal Bioindustri*. 1, 138-148.
- Mellisa, dan A. Febliza. 2018. Pengaruh Hormon NAA dan IBA pada Eksplan Nibung (*O. Tiggilarium*) Terhadap Umur Muncul Kalus (Hari). *Jurnal Bioterdidik*. 6, 1-6.
- Nuryani, Y. 2006. *Budidaya Tanaman Nilam (Pogostemon cablin Benth.)*. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aromatik, Bogor.

- Nuryani, Y. 2006. Karakteristik Empat Aksesori Nilam. *Buletin Plasma Nutfah*. 12,45-49.
- Prabakti, HD., Restanto, DP., dan S. Avivi. 2017. Pengaruh Macam Eksplan dan Konsentrasi 2,4-D Terhadap Induksi Kalus Kluwek (*Pangium edule* Reinw.) *In vitro*. *AGROTECH Science Journal*. 3, 39-58.
- Priyono, D., Suhandi, dan Matsaleh. 2000. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh IAA dan 2-IP pada Kultur Jaringan Bakal Buah Pisang. *Jurnal Hortikultura*. 10, 183-190.
- Priyono., dan S. Winarsih, S2000). Pengaruh Arah dan Ukuran Potongan Sisik Umbi Kerk Lily (*Lilium longiflorum* Thumb.) Terhadap Pembentukan Tunas Mikro dan *Bulblet* Secara *In vitro*. *Jurnal Bertha Biologi*. 5, 85-92.
- Rainiyati dan Martino. 2007. Perkembangan Pisang Raja Nangka (*Musa* sp.) Secara Kultur Jaringan dari Eksplan Anakan dan Meristem Bunga. *Jurnal Agronomi*. 1, 35-40.
- Rinanto, Y. 2011. Induksi Kalus dan Deteksi Kandungan Alkaloid daun Jarak (*Jatropha curcas* L.) Menggunakan Hormon 2,4-D dalam Media MS (*Murashige & Skoog*). *Jurnal Agrovigor*. 4(1).
- Rosyidah., Muchuriyah., Ratnasari, E., dan YS Rahayu. 2014. Induksi Kalus Daun Melati (*Jaminum sambac*) dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) dan Benzil amino purin (BAP) pada Media MS Secara *In vitro*. *LenteraBio*. 3, 1-4.
- Rusdianto, dan A. Indrianto. 2012. Induksi Kalus Embriogenik pada Wortel (*Daucus carota*) Menggunakan 2,4-D. *Bionature*. 13, 136-145.
- Santoso, and N. Fatimah. 2003. *Kultur Jaringan Tanaman*. UMM Press, Malang.
- Santoso, and Nursandi. 2001. *Kultur Jaringan Tanaman*. UMM press, Malang.
- Silaen, RA. 2018. Pengaruh Pemberian Benzil Amino Purin (BAP) dan Pola Pemotongan Eksplan Terhadap Pembentukan Tunas Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Secara *In Vitro*. *Prosiding Seminar Nasional Biologi dan Pembelajaran* (ISSN. 2656-1670). Universitas Negeri Medan, Medan.
- Sitinjak, MA., Isda, MN., dan S. Fatonah. 2015. Induksi Kalus dari Eksplan Daun *In Vitro* Keladi Tikus (*Typhonium* sp.) dengan Perlakuan 2,4-D dan Kinetin. *Al-Karuniyah Jurnal Biologi*. 8, 32-38.
- Sitorus, EN., Hastuti, ED., dan N. Setiari, N. (2011). Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) Secara *In vitro* Pada Media *Murashige & Skoog* Dengan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda. *Jurnal BIOMA*. 3(1).
- Subarnas, A. 2011. *Produksi Karantina Melalui Kultur Jaringan*. Penerbit Lubuk Agung, Bandung.
- Sudarmadji. 2003. Pengaruh *Benzyl Amino Purin* pada Pertumbuhan Kalus Kapas Secara *In Vitro*. *Jurnal Teknik Pertanian*, 8(1), 8-10.
- Sugiyarto, L., dan PC. Kuswandi, 2013. Eksplorasi Metode Sterilisasi dan Macam Media Untuk Perbanyak Durian (*Durio zibethinus* L.) Secara *In Vitro*. *Jurnal Sains Dasar*. 2, 20-24.
- Wattimena, GA., Gunawan, LW., and Harjadi, SS. 1986. *Penelitian Kultur Jaringan Beberapa Tanaman Hortikultur Penting*. IPB Press, Bogor.
- Wetter, LR., and F. Constabel. 1991. *Metode Kultur Jaringan Tanaman*. ITB Press, Bandung.
- Widyawati, G. 2010. Pengaruh Variasi Konsentrasi NAA dan BAP Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar *Jatropha*.

- Yuhono, JT. 2014. Strategi Peningkatan Rendemen dan Mutu Minyak dalam Agribisnis Nilam. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan BALLITRO, Bogor.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan*. PT Agro Media Pustaka, Tangerang.
- Zulkarnain, H. 2014. *Kultur Jaringan Tanaman Solusi Perbanyak Tanaman Budi Daya*. Bumi Aksara, Jakarta.