

Callus Induction of *Dendrobium discolor* Through The Thin Cell Layer (TCL) Technique Added with 2,4-Dichlorophenoxyaceticacid

Iga Permata Hany¹, Zozy Aneloi Noli^{1*}, M. Idris¹

¹Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences; Universitas Andalas, Padang, Indonesia;

Article History

Received : September 22th, 2023

Revised : October 18th, 2023

Accepted : October 24th, 2023

*Corresponding Author:

Zozy Aneloi Noli, Biology Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences; Universitas Andalas, Padang, Indonesia;
Email: zozynoli@sci.unand.ac.id

Abstract: Thin Cell Layer (TCL) is a plant propagation technique using thin explants (1-2 mm) through tissue culture. Callus induction is a crucial step in establishing plant regeneration. The type and concentration of growth regulators influence callus formation. 2,4-D is a growth regulator that is commonly used for callus induction in various plants. The research aims to determine the effectiveness of thin explants and 2,4-D in inducing *Dendrobium discolor* callus. The method used a Completely Randomized Design (CRD) with four treatments (1, 2, 3, and 4 mg/L). Adding 1, 2, and 3 mg/L 2,4-D can induce 100% calluses through the TCL explant. The callus has a friable to compact texture. The result showed that 2 mg/L 2,4-D was the best concentration for callus induction of *D. discolor* through TCL technique, indicating the greenish color, friable texture, and meristematic tissue.

Keywords: 2,4-D, callus, *Dendrobium discolor*, TCL.

Pendahuluan

Dendrobium salah satu genus anggrek yang memiliki nilai estetika dan nilai komersial yang tinggi. Salah satunya adalah anggrek *Dendrobium discolor* yang memiliki bentuk bunga yang khas. Bunga anggrek ini berbentuk melintir ke arah dalam yang terdiri dari empat kelopak dalam satu tangkai bunga. Selain itu, angrek ini memiliki warna bunga kuning kecoklatan/keemasan dengan jumlah tangkai yang banyak selama satu kali periode pembungaan. Anggrek ini juga dijadikan sebagai salah satu indukan hibridisasi dan juga dijadikan sebagai bunga potong (Fandani *et al.*, 2018). Hal ini membuat kebutuhan akan jenis anggrek *D. discolor* sangat tinggi dan membutuhkan usaha perbanyakan yang efektif untuk memenuhi kebutuhan tersebut. Salah satu usaha perbanyakan anggrek yang paling sering dilakukan adalah kultur jaringan (Ma *et al.*, 2020).

Kultur jaringan adalah usaha perbanyakan tanaman dengan memanfaatkan

sifat totipotensi sel pada tanaman sehingga dapat menghasilkan individu baru yang seragam dengan induknya dan dapat menghasilkan lebih banyak individu baru dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan metoda perbanyakan lainnya (Apriliyani & Wahidah, 2021). Kultur jaringan dengan memanfaatkan eksplan berukuran tipis dari beberapa bagian tanaman sudah sering dilakukan untuk perbanyakan tanaman. Teknik ini disebut juga sebagai teknik *Thin Cell Layer* (TCL) (Teixeira Da Silva & Dobránszki, 2019).

Thin Cell Layer merupakan teknik perbanyakan tanaman yang menggunakan eksplan tipis berukuran 1-2 mm. Seluruh bagian tanaman yang bersifat meristematik dapat diperbanyak menggunakan teknik ini. Eksplan TCL lebih baik dalam menerima rangsangan dari media *in vitro* dikarenakan permukaan eksplan yang bersentuhan seluruhnya dengan media. Hal ini membuat teknik TCL lebih responsif dalam regenerasi jaringan tanaman baru. Teknik TCL telah

berhasil menginduksi kalus pada beberapa jenis tanaman (Sharma *et al.*, 2023). TCL telah berhasil pada perbanyakan anggrek *Paphiopedilum callosum* (Wattanapan *et al.*, 2018), *Dendrobium aqueum* (Parthibhan *et al.*, 2018), *Hadrolaelia grandis* (Vudala *et al.*, 2019), dan *Dendrobium* ‘Balithi CF22-58’ (Rachmawati *et al.*, 2020).

Keberhasilan perbanyakan dengan teknik TCL dipengaruhi oleh banyak faktor salah satunya penambahan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) pada media kultur. ZPT merupakan senyawa sintetik maupun alami yang berperan dalam mempercepat pertumbuhan tanaman. Penambahan ZPT sering dilakukan pada perbanyakan *in vitro* salah satunya bertujuan untuk menginduksi pembentukan kalus pada eksplan. ZPT jenis auksin dapat digunakan untuk menginduksi kalus pada anggrek. Auksin yang sering digunakan adalah jenis auksin sintetik paling kuat yaitu 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

Penambahan 2,4-D dapat meningkatkan tingkat regenerasi pada tanaman tebu (Iqbal *et al.*, 2022). Penelitian lain juga menyatakan bahwa pemberian 2,4-D pada konsentrasi tertentu dapat meningkatkan pembentukan kalus pada beberapa jenis tanaman. Pemberian 1-2 mg/L 2,4-D dapat meningkatkan regenerasi kalus pada tanaman kopi (Ibrahim *et al.*, 2013). Penelitian ini bertujuan untuk melihat efektifitas penggunaan eksplan tipis dari teknik TCL dan penambahan 2,4-D terhadap induksi kalus anggrek *D. discolor*.

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai bulan Mei 2023 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia.

Metode penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimen yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas 4 perlakuan. Sebagai perlakuan adalah konsentrasi 2,4-D yang digunakan dalam induksi kalus

yaitu:

- A. 1 mg/L
- B. 2 mg/L
- C. 3 mg/L
- D. 4 mg/L

Prosedur penelitian

Sterilisasi peralatan kultur

Seluruh peralatan yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu dengan dicuci pada air mengalir menggunakan sabun anti bakteri. Setelah dicuci, alat-alat dikeringkan menggunakan oven dan disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dikeluarkan dari autoklaf, peralatan disimpan pada lemari alat sebelum digunakan. Peralatan tanam disterilisasi kembali di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) di bawah penyinaran lampu UV selama 2 jam sebelum digunakan.

Persiapan media tanam

Media yang digunakan pada penelitian ini adalah media *Murashige and Skoog* (MS) dengan komposisi sesuai dengan Murashige & Skoog (1962). Media ditambahkan dengan ZPT 2,4-D sesuai dengan konsentrasi perlakuan yang digunakan. Media MS disterilisasi menggunakan autoklaf dan diinkubasi pada rak media selama 3 hari sebelum digunakan.

Penanaman eksplan

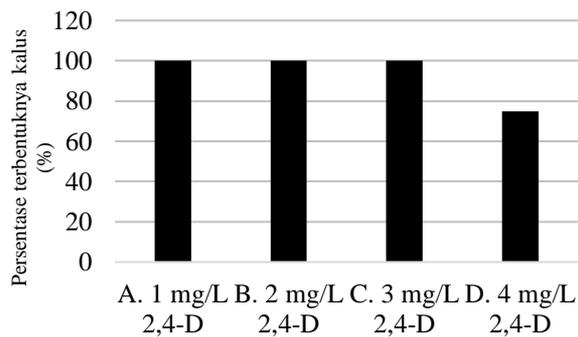
Planlet *Dendrobium discolor* diperoleh dari Laboratorium Robiquetia Garden Lab, Kota Padang. Planlet dibersihkan dari percabangan daun dan akar yang menempel pada batang utama. Batang *D. discolor* diiris tipis dengan ukuran 1 mm secara melintang dan diletakkan pada permukaan media. Setiap botol percobaan terdiri dari satu eksplan TCL. Pengamatan dilakukan terhadap parameter persentase terbentuknya kalus, warna kalus, dan tekstur kalus. Seluruh parameter diamati setiap hari hingga terbentuk kalus pada eksplan. Analisis data dilakukan secara deskriptif untuk semua parameter yang diamati.

Hasil dan Pembahasan

Persentase terbentuknya kalus

Persentase terbentuknya kalus *D. discolor* pada penambahan beberapa konsentrasi 2,4-D

melalui teknik TCL disajikan pada Gambar 1. Kalus adalah kumpulan massa sel yang belum terorganisir dan terbentuk di sekitar jaringan luka. Kalus dapat terbentuk dari jaringan meristem maupun jaringan lain yang telah mengalami diferensiasi. Kalus berhasil terbentuk pada eksplan *D. discolor* pada seluruh konsentrasi 2,4-D yang diberikan. Namun konsentrasi yang lebih tinggi menyebabkan terjadinya penurunan persentase pembentukan kalus.



Gambar 1. Persentase terbentuknya kalus *D. discolor* dengan penambahan beberapa konsentrasi 2,4-D melalui teknik TCL setelah 2 minggu kultur.

Penambahan 1, 2, dan 3 mg/L 2,4-D memberikan pengaruh yang baik terhadap persentase pembentukan kalus dibandingkan pemberian 4 mg/L 2,4-D. Respon setiap tanaman berbeda-beda terhadap konsentrasi 2,4-D yang diberikan. Hal ini sesuai dengan penelitian Dalila *et al.*, (2013) pemberian 1 mg/L 2,4-D dapat menyebabkan pertumbuhan kalus yang lebih intensif pada eksplan *Barringtonia racemosa*. Pemberian 2,4-D juga memberikan persentase pembentukan kalus terbaik hingga 100% pada *Syzigium aromaticum* L. (Rasud & Bustaman, 2020). Penambahan 2,4-D ke dalam media akan mempengaruhi pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan, kemudian akan memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus. 2,4-D dapat memacu pembelahan dan perbanyakan sel akibat penyerapan air, nutrisi, dan ZPT dari media (Fitroh *et al.*, 2018).

Induksi kalus diawali dengan penebalan eksplan pada bagian pelukaan. Interaksi antara ZPT eksogen dan kemampuan regenerasi eksplan yang mengalami pelukaan. Hal ini sesuai dengan Purba *et al.* (2017) yang

menyatakan pelukaan dan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke media menginisiasi terbentuknya kalus. Efektifitas ZPT eksogen yang ditambahkan pada media bergantung pada kondisi fisiologis dan keseimbangan endogen dari eksplan (Rasud & Bustaman, 2020). Pelukaan pada eksplan menyebabkan aktifnya pensinyalan ZPT endogen maupun respon perlindungan dalam bentuk regenerasi jaringan baru. Pelukaan pada eksplan dapat menginduksi adanya penebalan hingga membentuk kalus (Ikeuchi *et al.*, 2017). Selain pemberian 2,4-D, pelukaan pada eksplan TCL yang menjadi salah satu faktor penting dalam meningkatkan pembentukan kalus pada eksplan *D. discolor*.

Hampir seluruh bagian dari eksplan TCL mengalami pelukaan dan langsung bersentuhan dengan media *in vitro*. Hal ini membuat eksplan TCL memiliki respon regenerasi lebih kompleks untuk pembentukan kalusnya sehingga persentase pembentukan kalus yang tinggi pada hampir seluruh perlakuan yang diberikan. Penambahan 2,4-D yang lebih tinggi (4 mg/L 2,4-D) memberikan persentase terendah dibanding perlakuan lainnya. Konsentrasi ini diduga terlalu tinggi bagi eksplan TCL yang memiliki ukuran sangat tipis. Eksplan TCL rentan terhadap rangsangan dari luar sehingga 2,4-D dalam konsentrasi terlalu tinggi dapat menurunkan persentase terbentuknya kalus. Hal ini sesuai dengan Iqbal *et al.*, (2022) setiap tanaman memiliki komabilitas tertentu terhadap jenis dan konsentrasi suatu jenis ZPT eksogen yang diberikan.

Warna dan struktur kalus

Kalus mengalami perubahan warna pada beberapa fase diferensiasinya (Tabel 1). Kalus akan berwarna putih atau krem dengan tekstur remah saat menuju fase akhir diferensiasi kalus. Perlakuan 1 mg/L dapat menginduksi kalus yang cenderung berwarna putih kekuningan dan bertekstur remah. Hal ini menunjukkan kalus yang terbentuk bersifat meristematik dan siap berdiferensiasi menjadi jaringan baru. Kalus berwarna putih menunjukkan massa sel yang sedang aktif membelah. Kalus berwarna putih kekuningan menunjukkan massa sel yang menuju fase akhir dari pembelahan. Sedangkan kalus berwarna kecokelatan menunjukkan massa sel yang menuju fase penuaan (senescence) dan kematian sel (Rasud & Bustaman, 2020).

Tabel 1. Warna kalus anggrek *D. discolor* pada beberapa konsentrasi 2,4-D melalui teknik TCL setelah 2 minggu kultur

Perlakuan	Visual warna	Munsell Color Chart	Gambar kalus	Struktur kalus
A. 1 mg/L 2,4-D		10 YR 7/2		Remah
B. 2 mg/L 2,4-D		2,5 GY 7/6		Remah
C. 3 mg/L 2,4-D		2,5 GY 6/4		Remah
D. 4 mg/L 2,4-D		7,5 YR 6/4		Kompak

Pemberian 2,4-D 2 mg/L menunjukkan warna kalus yang berwarna hijau kekuningan. Kalus yang berwarna hijau menunjukkan jaringan yang mengandung kloroplas dan masih bersifat meristematik. Sedangkan 3 mg/L 2,4-D menunjukkan warna hijau yang lebih cerah dibandingkan yang lainnya. Pemberian 2,4-D 1-3 mg/L mampu membentuk kalus yang bertekstur remah. Hal ini sesuai dengan penelitian Dalila *et al.*, (2013) bahwa pemberian 2 mg/L 2,4-D dapat membentuk kalus yang bertekstur remah dan berwarna krem.

Pemberian 2,4-D 4 mg/L menyebabkan terdapatnya kalus yang mengalami pencoklatan dan pengerasan pada kalus bertekstur kompak dan tidak bersifat meristematik. Kalus menuju kematian pada eksplan. Konsentrasi 2,4-D tertentu dapat memberikan dampak kematian pada eksplan. Peningkatan konsentrasi 2,4-D dapat menyebabkan kalus berubah warna menjadi coklat dan tekstur kompak (Dalila *et al.*, 2013). Mahadi *et al.*, (2016) menyatakan bahwa tekstur kalus kompak disebabkan oleh terjadinya proses pengerasan pada sel yang dipengaruhi oleh keberadaan zat pengatur tumbuh yang berperan dalam transport zat hara.

Kesimpulan

Konsentrasi 1, 2, dan 3 mg/L 2,4-D dapat menginduksi kalus hingga 100%. Konsentrasi 2

mg/L merupakan konsentrasi terbaik dalam induksi kalus dengan warna hijau kekuningan dengan tekstur remah dan bersifat meristematik.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis sampaikan kepada Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas yang sudah memberikan dukungan selama pelaksanaan kegiatan penelitian ini, sehingga penelitian ini berjalan dengan baik.

Referensi

- Apriliyani, R., & Wahidah, B. F. (2021). Perbanyak anggrek *Dendrobium* sp. secara *in vitro*: Faktor-faktor keberhasilannya. *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, 1(2). DOI: <https://doi.org/10.24252/filogeni.v1i2.21992>
- Dalila, Z. D., Jaafar, H., & Manaf, A. A. (2013). Effects of 2,4-D and kinetin on callus induction of *Barringtonia racemosa* leaf and endosperm explants in different types of basal media. *Asian Journal of Plant Sciences*, 12(1). DOI: <https://doi.org/10.3923/ajps.2013.21.27>
- Fandani, H. S., Mallomasang, S. N., & Korja, I. N. (2018). Keanekaragaman Jenis

- Anggrek pada beberapa Penangkaran di Desa Ampora dan Desa Karunia Kecamatan Palolo Kabupaten Sigi. *Jurnal Warta Rimba*, 6(9). URL: <http://jurnal.untad.ac.id/jurnal/index.php/WartaRimba/article/view/11297>
- Fitroh, A. I., Dwiyani, R., Wijaya, I. K. A., & Yuswanti, H. (2018). Pengaruh 2,4-D terhadap Induksi Kalus Daun Stroberi (*Fragaria sp.*) dengan Media Alternatif Nutrisi Hidroponik AB Mix. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*, 7(3). URL: <https://ojs.unud.ac.id/index.php/JAT/article/view/42172>
- Ibrahim *et al.* (2013). Induksi Kalus Embriogenik dan Daya Regenerasi Kopi Arabika Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid dan 6-Benzyladenine. *Jurnal Tanaman Industri Dan Penyegar*, 4(2).
- A., Rymen, B., Lambalez, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., Heyman, J., Watanabe, S., Seo, M., De Veylder, L., Sakakibara, H., & Sugimoto, K. (2017). Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiology*, 175(3). DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01035>
- Iqbal, A., Khan, R. S., Khan, M. A., Gul, K., Aizaz, M., Usman, M., & Arif, M. (2022). Efficient Regeneration in Sugarcane Using Thin Cell Layer (TCL) Culture System. *Sugar Tech*, May. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01162-y>
- Ma, N. L., Khoo, S. C., Lee, J. X., Soon, C. F., & AB Shukor, N. A. (2020). Efficient micropropagation of *Dendrobium aurantiacum* from shoot explant. *Plant Science Today*, 7(3), 476–482. DOI: <https://doi.org/10.14719/PST.2020.7.3.724>
- Mahadi, I., Syafi'i, W., & Sari, Y. (2016). Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) Menggunakan Hormon 2,4-D dan BAP dengan Metode in vitro. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 21(2). DOI: <https://doi.org/10.18343/jipi.21.2.84>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Parthibhan, S., Rao, M. V., Teixeira da Silva, J. A., & Senthil Kumar, T. (2018). Somatic embryogenesis from stem thin cell layers of *Dendrobium aequum*. *Biologia Plantarum*, 62(3). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0769-4>
- Purba, R. V., Yuswanti, H., & Astawa, I. N. G. (2017). E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika Induksi Kalus Eksplan daun Tanaman Anggur (*Vitis vinifera L.*) dengan Aplikasi 2,4-D Secara in Vitro. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*, 6(2). URL: <https://ojs.unud.ac.id/index.php/JAT/article/view/30895>
- Rachmawati, F., Permanik, D., Mayang, R. B., & Winarto, B. (2020). Protokol Perbanyakkan Masal *Dendrobium 'Balithi CF22-58'* secara In Vitro Melalui Embriogenesis Somatik Tidak Langsung (In Vitro Propagation Protocol of *Dendrobium 'Balithi CF22-58'* via Indirect Somatic Embryogenesis). *Jurnal Hortikultura*, 29(2), 137. DOI: <https://doi.org/10.21082/jhort.v29n2.2019.p137-146>
- Rasud, Y., & Bustaman. (2020). Induksi Kalus secara In Vitro dari Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum L.*) dalam Media dengan Berbagai Konsentrasi Auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25(1). DOI: <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>
- Sharma, V., Magotra, T., Chourasia, A., Mittal, D., Singh, U. P., Sharma, S., Sharma, S., Ramírez, Y. G., Dobránszki, J., & Martínez-montero, M. E. (2023). *Thin Cell Layer Tissue Culture Technology with Emphasis on Tree Species*. June. DOI: <https://doi.org/10.3390/f14061212>
- Teixeira Da Silva, J. A., & Dobránszki, J. (2019). Recent advances and novelties in the thin cell layer-based plant biotechnology - a mini-review. *Biotechnologia*, 100(1). DOI: <https://doi.org/10.5114/bta.2019.83215>
- Vudala, S. M., Padial, A. A., & Ribas, L. L. F. (2019). Micropropagation of *Hadrolaelia grandis* through transverse and longitudinal thin cell layer culture. *South*

African Journal of Botany, 121, 76–82.
DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.017>
Wattanapan, N., Nualsri, C., & Meesawat, U.
(2018). In vitro propagation through
transverse thin cell layer (Ttcl) culture

system of lady's slipper orchid:
Paphiopedilum callosum var. *sublaeve*.
*Songklanakarin Journal of Science and
Technology*, 40(2). DOI:
<https://doi.org/10.14456/sjst-psu.2018.48>