

Original Research Paper

Induksi Kalus dari Hipokotil Belimbing Merah (*Baccaurea angulata*) dengan Penambahan 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) dan BAP (6-Benzyl Amino Purin)

Novi Teresia¹, Zulfa Zakiah^{1*}, Masnur Turnip¹¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Indonesia;

Article History

Received : December 03th, 2023Revised : December 26th, 2023Accepted : January 18th, 2024

*Corresponding Author:

Zulfa Zakiah,Jurusan Biologi Fakultas
Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam Universitas
Tanjungpura, Pontianak,
Indonesia;Email: zulfaz@gmail.com

Abstract: Red starfruit is one of the endemic plants of Kalimantan which produces secondary metabolites which has been empirically used as antioxidant, antibacterial, and anticancer. This plant has a long reproductive period and seedless fruit is often found during the fruiting season, which is a problem for the sustainability of the red starfruit in nature. Conservation of red star fruit for propagation and production of secondary metabolites can be done in vitro through callus culture. This research aims to determine the effect of adding the growth regulators dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and 6-benzyl amino purine (BAP) on callus induction time, percentage of callus forming explants, callus color and texture, and callus growth. This research used a Completely Randomized Design (CRD) with a factorial pattern consisting of two treatment factors, namely 2,4-D (0; 0.25; 0.5; 0.75; 1 ppm) and BAP (0; 0.25; 0.5; 0.75; 1 ppm). The percentage of explants forming callus (%), the time the callus appeared (days after planting), the color and texture of the callus, the wet weight and dry weight of the callus (g) were research observation parameters. The results showed that the single factor 2,4-D, single factor BAP, and the interaction of 2,4-D and BAP had a significant effect to callus appearance time. Single administration of 2,4-D and BAP had a significant effect on callus dry weight. The color variations of the callus produced are white, green and brown with a compact texture. The fastest callus emergence time was at 11.00 days after planting (DAP), namely in the combination treatment of 1 ppm 2,4-D and 0.75 ppm BAP, single treatment 0.75 ppm and 1 ppm 2,4-D. The highest average dry weight of 0.024 g was obtained in the single treatment of 0.75 ppm BAP.

Keywords: Callus, hypocotyl, propagation, red star fruit.

Pendahuluan

Belimbing merah (*Baccaurea angulata*) adalah spesies dari genus *Baccaurea*. Masyarakat Indonesia menyebut tumbuhan ini dengan nama lain yaitu belimbing dayak, belimbing hutan atau ucung yang memiliki potensi sumber antioksidan alami (Andriyanto *et al.*, 2016). Belimbing merah yang tersebar di wilayah Kalimantan merupakan spesies endemik Kalimantan (Lim, 2012). Belimbing merah (*B.angulata*) walaupun memiliki nilai ekonomi rendah dibandingkan famili yang lain seperti rambai (*Baccaurea motleyana*), namun dapat

digunakan sebagai makanan berupa bumbu masakan, selai dan menjadi tanaman obat oleh masyarakat (Haegens, 2000). Belimbing merah memberikan efek hipokolestolemik untuk pencegahan aterosklerosis dan penyakit jantung serta mengobati kanker melanoma pada kulit manusia. Selain itu, buah belimbing merah juga dimanfaatkan masyarakat untuk mengobati radang mata dan pewarna kain alami (Adam & Rasad, 2015). Pemanfaatan terhadap belimbing merah merupakan salah satu faktor yang dapat mengancam keberlangsungan hidup dan keberadaan belimbing merah di alam jika tidak diimbangi dengan pelestariannya. (Dodo, 2015)

menjelaskan bahwa belimbing merah termasuk tumbuhan dilindungi menurut daftar 200 jenis tumbuhan Indonesia. Belimbing merah juga terdaftar sebagai tumbuhan buah Indonesia yang sudah jarang ditemukan dan menjadi salah satu tumbuhan yang dikoleksi kebun raya.

Belimbing merah dapat dikembangkan secara generatif dan vegetatif. Perkembangbiakan generatif menggunakan biji dapat menghasilkan jumlah anakan yang banyak namun memerlukan waktu yang lama dan menghasilkan anakan yang sifatnya tidak sama dengan induk. Perkembangbiakan vegetatif dapat melalui stek dan cangkok namun memberikan peluang tumbuh yang kecil (Sudarmono, 2018). Salah satu alternatif perbanyak tanaman secara vegetatif dengan teknik kultur jaringan dapat dilakukan untuk menghasilkan tanaman yang sama dengan induknya dan dapat menghasilkan jumlah bibit yang banyak dengan waktu yang lebih singkat dibanding perbanyak secara generatif. Teknik kultur jaringan juga dapat digunakan untuk memperoleh senyawa hasil metabolisme sekunder tumbuhan melalui kultur kalus.

Kalus merupakan massa hasil pembelahan sel yang belum terspesialisasi. Induksi kalus merupakan tahap awal untuk mendapatkan massa kalus dalam jumlah besar (Rasud & Bustaman, 2020). Pembentukan kalus dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh (ZPT) endogen jaringan maupun ZPT eksogen dari golongan auksin dan sitokinin. Pemberian perbandingan auksin dan sitokinin yang tepat akan mendukung pertumbuhan kalus secara *in vitro* (Indah & Ermavitalini, 2013). Salah satu golongan auksin untuk menginduksi kalus yaitu 2,4-D, hal ini dikarenakan 2,4-D mampu merangsang pembentukan dan pertumbuhan kalus dan sitokinin berperan untuk meningkatkan pembelahan kalus (Rivai & Helmanto, 2015).

Hipokotil digunakan sebagai eksplan karena hipokotil merupakan jaringan meristematik yang memiliki banyak jaringan pengangkut dan sifat totipotensi sel yang tinggi (Zulkarnain, 2011). Hendaryono & Wijayani, (1994) sumber eksplan yang baik adalah bagian tanaman yang mempunyai banyak jaringan pengangkut. Mastuti *et al.*, (2020) memperoleh bahwa pemberian 1,2 mg/L dan 4 mg/l 2,4 D

yang dikombinasikan dengan 2 mg/l BAP pada media Murashige Skoog (MS) mampu meningkatkan bobot basah kalus dari hipokotil ciplukan (*Physalis angulata L.*). Penelitian Zulkarnain, & Lizawati (2011) melaporkan bahwa pemberian 1-5 mg/L 2,4-D pada kultur hipokotil tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas L.*) dapat memicu pembentukan dan perbanyak kalus. Informasi mengenai perbanyak belimbing merah melalui kultur jaringan sampai saat ini belum ada. Berdasarkan uraian diatas telah dilakukan penelitian dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan 2,4-D dan BAP terhadap pertumbuhan kalus dari hipokotil belimbing merah dan mendapatkan konsentrasi 2,4-D dan BAP untuk pertumbuhan terbaik kalus dari hipokotil belimbing merah.

Bahan dan Metode

Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juni 2022 sampai dengan Januari 2023 di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tanjungpura, Pontianak.

Bahan penelitian

Bahan yang digunakan meliputi buah belimbing merah (*Baccaurea angulata*) yang diperoleh dari kecamatan Entikong, agar, akuades steril, alkohol 70 %, asam klorida 1 N (HCl), 6-Benzyl Amino Purin (BAP), bayclin, Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D), deterjen, gula pasir, iodine, komponen media murashige skoog (MS) yang disediakan dalam bentuk larutan stok (A-H), Natrium Hidroksida 1 N (NaOH), spiritus.

Rancangan penelitian

Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor digunakan sebagai rancangan penelitian, yaitu konsentrasi 2,4-D (D) terdiri atas lima taraf perlakuan (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 ppm) dan konsentrasi BAP (B) dengan lima taraf perlakuan (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 ppm). Kedua faktor dikombinasikan dan dilakukan tiga kali pengulangan sehingga dihasilkan 75 unit percobaan

Prosedur penelitian

Penelitian dilaksanakan dalam dua tahapan yaitu tahap persiapan mencakup

sterilisasi alat dan ruangan, pembuatan dan sterilisasi media, sterilisasi buah dan perkecambahan biji belimbing merah. Tahap selanjutnya adalah tahap induksi dan proliferasi meliputi penanaman eksplan, sub kultur dan pengamatan parameter.

Sterilisasi alat dan media

Alat-alat gelas, alat tanam, akuades dan media dibebaskan dari mikroorganisme dengan autoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) disterilisasi dengan menyemprotkan etanol 70% dan lampu ultra violet (30 menit).

Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian terdiri atas media kapas steril dan media agar. Media kapas steril digunakan sebagai media perkecambahan biji belimbing merah sedangkan media agar merupakan media untuk induksi kalus.

Media perkecambahan dibuat dengan cara mencelupkan kapas ke dalam akuades steril dan meletakkannya di dalam botol kultur dan selanjutnya disterilisasi. Media agar dibuat di dalam gelas piala 1000 ml dengan melarutkan sebanyak 30 g gula pasir dengan akuades menggunakan *magnetic stirrer*. Masing-masing larutan stok hara A,B,C,D,E,G,H dipipet sesuai volume untuk pembuatan 1 L media. Agar (7 g) dilarutkan dengan akuades di dalam gelas piala dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih, kedua larutan dicampur dan ditepatkan volumenya sesuai jumlah kombinasi perlakuan akan dibuat. Selanjutnya dilakukan penambahan BAP dan 2,4-D sesuai kombinasi perlakuan. Pengukuran pH larutan media menggunakan kertas pH untuk mendapatkan pH media menjadi pH 5-6. Jika pH kurang dari 5-6 dilakukan penambahan NaOH dan jika pH diatas 5-6 ditambahkan HCl. Untuk mengeliminasi mikroorganisme pada media dilakukan menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm.

Perkecambahan biji

Bahan tanaman yang digunakan adalah buah belimbing merah. Sterilisasi buah dilakukan dengan cara mencuci buah dengan deterjen, dibilas dan dilanjutkan dengan seterilisasi di bawah air mengalir selama 15-30

menit. Tahap selanjutnya dilakukan di dalam laminar. Buah disterilisasi menggunakan bayclin dengan konsentrasi bertingkat yaitu 15%, 10 %, 5% masing-masing perendaman selama 1 menit lalu dibilas dengan akuades steril. Selanjutnya buah dicelupkan ke dalam alkohol 70% (1 menit), larutan iodine (1 menit) lalu dibilas kembali dengan akuades steril (3 kali). Buah yang sudah steril dipotong dengan pisau skalpel untuk mendapatkan biji. Kulit biji dibuang, lalu biji ditanam ke dalam media kapas steril dan diinkubasi pada rak kultur. Perkecambahan dilakukan selama 1 bulan (Gultom *et al.*, 2012).

Penanaman eksplan dan sub kultur

Eksplan yang digunakan adalah hipokotil kecambah belimbing merah umur 1 bulan. Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAFC. Proses penanaman diawali dengan mengeluarkan kecambah dari media kapas. Kecambah diletakkan di cawan petri dan dilakukan pemotongan untuk mendapatkan eksplan hipokotil. Ukuran hipokotil yang digunakan ± 1 cm. Hipokotil ditanam pada media sesuai kombinasi perlakuan. Satu botol ditanam 2-3 eksplan hipokotil. Eksplan yang sudah ditanam pada media diberi label tanggal penanaman. Kultur dipelihara di ruang inkubasi dengan kondisi suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

Subkultur dilakukan sebanyak 3 kali dengan interval waktu antar sub kultur adalah 28 hari. Subkultur pertama dilakukan setelah inkubasi 28 hari setelah tanam (hst). Eksplan yang membentuk kalus atau eksplan yang masih segar dan tidak mati namun belum membentuk kalus disubkultur ke media baru dengan komposisi media yang sama. Sub kultur kedua dilakukan dengan cara menimbang kalus seberat $\pm 0,2$ gam dan dipindah ke media baru dimana komposisi media sama dengan sebelumnya dan diinkubasi selama 28 hari. Subkultur ketiga dilakukan pada kultur yang berumur 56 hst, selanjutnya diinkubasi sampai umur kultur 84 hst.

Parameter pengamatan

Pengamatan dilakukan sehari setelah penanaman sampai umur kultur 84 hst. Pengamatan dilakukan terhadap parameter persentase eksplan membentuk kalus (%), rerata waktu muncul kalus (hst), warna dan tekstur kalus, bobot basah dan bobot kering kalus (g).

Analisis data

Data kualitatif seperti warna dan tekstur kalus dianalisis secara deskriptif. Sedangkan data kuantitatif dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) dua jalur dengan program SPSS 16. Parameter yang menunjukkan pengaruh nyata, di uji lanjut dengan DNMRT pada taraf 5% .

Hasil dan Pembahasan

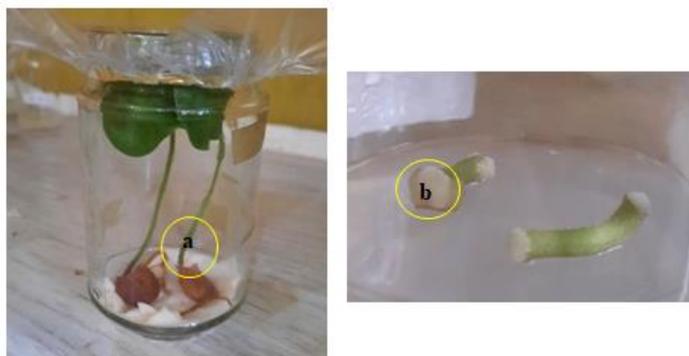
Waktu muncul kalus

Hasil analisis pada Tabe 1 terlihat bahwa perlakuan faktor tunggal 2,4-D ($F_{24,50}=76,686$, $p=0$; ANOVA), faktor tunggal BAP ($F_{24,50}=3,712$, $p=0,010$; ANOVA) dan faktor interaksi 2,4-D dan BAP ($F_{24,50}=1,928$, $p=0,040$; ANOVA) berpengaruh nyata terhadap rerata waktu muncul kalus. Pada tabel terlihat bahwa pembentukan kalus terjadi pada 11,00-19,00 hst.

Tabel 1. Waktu muncul kalus (hst) kultur hipokotil belimbing merah dengan penambahan 2,4-D dan BAP berumur 28 hst

2,4-D (ppm)	Rerata waktu muncul kalus (hst)					Rerata
	BAP (ppm)					
	0	0,25	0,5	0,75	1	
0	19,00 ^e	18,67 ^e	19,00 ^e	19,00 ^e	19,00 ^e	18,93 ^C
0,25	12,00 ^{abcd}	17,33 ^e	13,33 ^{bcd}	14,00 ^d	11,33 ^{abc}	13,60 ^B
0,5	12,33 ^{abcd}	13,00 ^{abcd}	13,33 ^{bcd}	13,33 ^{bcd}	13,00 ^{abcd}	13,00 ^B
0,75	11,00 ^a	11,33 ^{abc}	11,33 ^{abc}	11,67 ^{abcd}	11,33 ^{abc}	11,33 ^A
1	11,00 ^a	13,67 ^{cd}	11,33 ^{abc}	11,00 ^a	11,67 ^{abcd}	11,73 ^A
Rerata	13,07 ^A	14,80 ^B	13,67 ^A	13,80 ^A	13,27 ^A	

Keterangan: 1. Hasil yang tidak berbeda nyata terhadap faktor interaksi ditunjukkan oleh angka-angka yang diikuti oleh huruf besar yang sama pada setiap baris dan kolom berdasarkan uji lanjut Duncan taraf 5%
 2. Hasil yang tidak berbeda nyata terhadap masing-masing faktor tunggal ditunjukkan oleh angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada setiap baris dan kolom berdasarkan uji lanjut Duncan taraf 5%



Gambar 1. Eksplan belimbing merah, a. bagian hipokotil belimbing merah, b. kalus yang muncul dari hipokotil

Uji lanjut Duncan memperlihatkan bahwa perlakuan tunggal 0,75 ppm dan 1 ppm 2,4-D, serta perlakuan kombinasi 1 ppm 2,4-D dan 0,75 ppm BAP berbeda nyata waktu muncul kalusnya dengan semua perlakuan tunggal BAP. Waktu muncul kalus tercepat adalah 11,00 hst. Terbentuknya kalus diawali dengan pemanjangan dan pembesaran hipokotil yang diikuti dengan pembelahan sel pada bagian hipokotil yang terluka sehingga mengalami

pembengkakan. Awal munculnya kalus terlihat pada bagian tepi eksplan dan kalus yang terbentuk berwarna putih (Gambar 1 b). Kalus yang muncul terus bertambah dan membesar bahkan menutupi permukaan eksplan (Gambar 2). Pertumbuhan kalus terjadi karena zpt di dalam media yang masuk ke dalam jaringan dan zpt endogen jaringan mampu merangsang sel untuk membelah dan berdediferensiasi sehingga kalus terbentuk lebih cepat. Mardini (2015)

menyatakan bahwa proses dediferensiasi sel maupun pertumbuhan sel untuk membentuk kalus sangat ditentukan oleh perimbangan zpt di dalam jaringan.

Tabel 1 memperlihatkan bahwa waktu pembentukan kalus tercepat adalah 11 hst pada kombinasi konsentrasi 1 ppm 2,4-D dan 0,75 ppm BAP; 0,75 2,4-D tanpa BAP; 1 ppm 2,4-D₁ tanpa BAP. Kondisi ini menunjukkan terjadinya perimbangan auksin dan sitokinin endogen jaringan setelah pemberian 2,4-D ke dalam media sehingga terbentuk kalus. Yelnititis (2012) menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan ke media maka waktu terbentuknya kalus akan semakin cepat. Hal ini terjadi karena proses difusi 2,4-D ke dalam jaringan akan dipermudah jika adanya perlakuan. 2,4-D berinteraksi dengan auksin endogen untuk memulai pembelahan sel. Penelitian Mahadi *et al.* (2016) menunjukkan bahwa eksplan jeruk kasturi yang ditanam pada media dengan perlakuan kombinasi 4 mg/l 2,4-D dan 0,5 mg/l BAP menunjukkan waktu muncul kalus terbaik yaitu 3,33 hst.

Hasil pada Tabel 1 terlihat bahwa perlakuan kontrol, perlakuan kombinasi dan perlakuan tunggal BAP adalah perlakuan dengan waktu pembentukan kalus terlama yaitu 19 hari. Kondisi ini terjadi karena adanya pengaruh zat pengatur tumbuh pada eksplan, dimana zpt eksogen yang masuk ke dalam jaringan diduga menyebabkan zpt endogen eksplan berada dalam konsentrasi yang tinggi

sehingga akan menghambat pembentukan kalus. Kamillia *et al.*, (2019) menyatakan bahwa pertumbuhan sel dan jaringan akan mengalami hambatan saat kondisi zpt endogen melebihi kebutuhan sel. Zpt yang ditambahkan ke dalam media konsentrasinya harus tepat, karena konsentrasi zpt yang terlalu rendah akan menyebabkan pengaruh zpt menjadi tidak optimal. Selain itu respon yang muncul juga dipengaruhi oleh jenis eksplan yang digunakan. Pada setiap eksplan zpt endogen yang terkandung tidak sama sehingga dapat memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan yang berbeda yakni mempercepat atau memperlambat munculnya kalus.

Persentase pembentukan kalus

Setelah penanaman eksplan hipokotil memperlihatkan kemampuan membentuk kalus yang tinggi sebesar 100% pada semua perlakuan (Tabel 2). Hal ini menggambarkan bahwa semua eksplan memberikan respon dan kemampuan yang sama untuk membentuk kalus. Persentase eksplan membentuk kalus yang tinggi disebabkan oleh faktor bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan dan zpt eksogen yang ditambahkan ke dalam media. Persentase eksplan membentuk kalus pada penelitian ini lebih tinggi dari penelitian Soheili. Hasil penelitian Soheili *et al.* (2021) memperoleh persentase terbentuknya kalus dari eksplan hipokotil (30,8%) lebih tinggi dari eksplan akar (27,2%) dan daun (23,1%).

Tabel 2. Rerata persentase pembentukan kalus (%) kultur hipokotil belimbing merah (*Baccaurea angulata*) pada media Murashige Skoog dengan kombinasi 2,4-D dan BAP

2,4-D (ppm)	Rerata persentase eksplan membentuk kalus (%)				
	BAP (ppm)				
	0	0,25	0,5	0,75	1
0	100	100	100	100	100
0,25	100	100	100	100	100
0,5	100	100	100	100	100
0,75	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100

Tekstur dan warna kalus

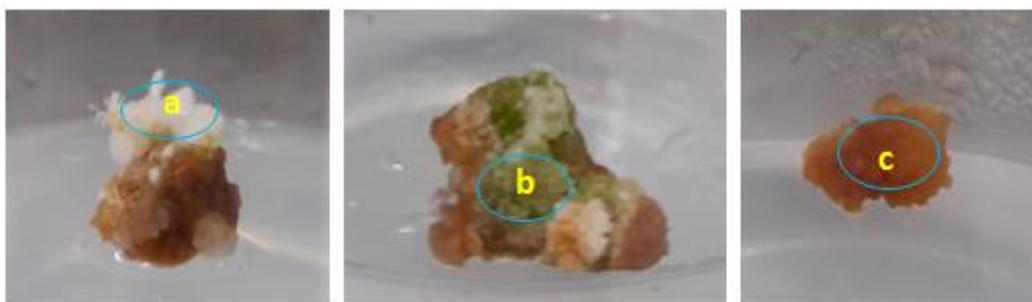
Tekstur kalus yang dihasilkan pada setiap perlakuan yang diamati adalah kalus bertekstur kompak (*compact*). Warna kalus bervariasi yaitu putih, kehijauan, dan coklat (Tabel 3, Gambar 2). Kalus bertekstur kompak dicirikan dengan kalus yang padat dan keras karena tersusun atas sel-sel yang rapat dan antar sel penyusunnya sulit untuk dipisahkan. Tekstur kalus yang kompak terbentuk karena terjadinya transpor hara dan proses lignifikasi sebagai akibat peran zat pengatur tumbuh. Evans *et al.* (2003) menjelaskan bahwa potensial air di dalam sel dan jaringan dipengaruhi zpt sitokinin dan auksin yang masuk ke dalam jaringan. Auksin menyebabkan sel menjadi lebih elastis karena longgarnya serat-serat dinding sel, sehingga memudahkan nutrisi pada media masuk secara difusi. Proses difusi berlangsung sampai sel menjadi turgid. Penambahan sitokinin akan

memacu pembelahan dan pembentukan dinding sel semakin cepat dan kalus menjadi kompak.

Hasil penelitian Intias (2012) menjelaskan bahwa kalus bertekstur kompak dihasilkan pada kultur tangkai daun purwoceng dengan penambahan kombinasi 2,4-D (0,25-0,75 ppm) + BAP (1,0-1,5 ppm). Kalus yang dihasilkan pada penelitian ini memperlihatkan warna yang bervariasi yaitu kehijauan, putih, dan coklat (Tabel 3). Awalnya semua perlakuan kalus yang tumbuh berwarna putih dan sampai minggu terakhir pengamatan (minggu ke 4 setelah dikulturkan) sebagian besar berwarna kecokelatan (Gambar 2). Hasil pada Gambar 2a didapatkan kalus berwarna putih, terbentuknya kalus berwarna putih diduga karena adanya sel-sel embrionik. Hal ini sesuai Ariati *et al.* (2012) yang menjelaskan bahwa kalus yang tersusun atas sel-sel embrionik umumnya berwarna putih. Umumnya kandungan butir pati pada sel embrionik relatif tinggi.

Tabel 3. Warna dan tekstur kalus pada kultur hipokotil belimbing merah pada Media MS dengan penambahan 2,4-D dan BAP pada usia kultur 84 hst

Konsentrasi ZPT (ppm)		Warna kalus	Tekstur kalus
2,4-D	BAP		
0	0	Kehijauan, putih, coklat	Kompak
	0,25	Coklat	Kompak
	0,50	Putih, coklat	Kompak
	0,75	Putih, coklat	Kompak
	1	Kehijauan, putih, coklat	Kompak
0,25	0	Putih, coklat	Kompak
	0,25	Kehijauan, putih, coklat	Kompak
	0,50	Putih, coklat	Kompak
	0,75	Kehijauan, putih, coklat	Kompak
	1	Kehijauan, putih, coklat,	Kompak
0,5	0	Kehijauan, putih, coklat	Kompak
	0,25	Putih, coklat	Kompak
	0,50	Putih, coklat	Kompak
	0,75	Kehijauan, putih	Kompak
	1	Putih, coklat	Kompak
0,75	0	Kehijauan, putih, coklat	Kompak
	0,25	Kehijauan, putih, coklat	Kompak
	0,50	Putih, coklat	Kompak
	0,75	Kehijauan, putih, coklat	Kompak
	1	Putih, coklat	Kompak
1	0	Coklat	Kompak
	0,25	Kehijauan, putih, coklat	Kompak
	0,50	Putih, coklat	Kompak
	0,75	Kehijauan, putih, coklat	Kompak
	1	Kehijauan, putih, coklat	Kompak



Gambar 2. Warna dan tekstur kalus pada kultur hipokotil belimbing merah, a.putih, b.hijau, c. Coklat

Warna kalus lainnya yang didapatkan yaitu warna hijau (Gambar 2b). Kalus berwarna hijau menunjukkan sel-sel kalus mengandung klorofil. Hasil penelitian Wardani *et al.*, (2004) memperoleh bahwa kalus yang berwarna hijau disebabkan penambahan sitokinin dengan konsentrasi yang meningkat. Sitokinin yang ditambahkan ke dalam media akan mengaktifkan proses metabolisme dan sintesis protein serta memengaruhi perkembangan plastida menjadi kloroplas. Selain itu hasil warna kalus yang didapatkan yaitu warna coklat (Gambar 2c). Hal ini diduga karena adanya aktivitas biosintesis metabolit sekunder pada eksplan. Vickery & Vickery (1981) menyatakan bahwa kalus berwarna coklat menunjukkan terbentuknya senyawa fenolik pada jaringan eksplan. Zulkarnain & Lizawati (2011) menjelaskan bahwa proses browning pada kalus menunjukkan dihasilkannya senyawa fenol di dalam sel kalus. Fenol dalam jumlah besar bersifat racun bagi sehingga dapat menghambat pertumbuhan dan kematian pada jaringan.

Bobot segar kalus

Analisis statistik memperlihatkan bahwa faktor tunggal 2,4-D ($F_{24,50}=0,458$, $p=0,766$;

ANOVA), faktor tunggal BAP ($F_{24,50}=1,042$, $p=0,395$; ANOVA) dan faktor interaksi 2,4-D dan BAP ($F_{24,50}=0,875$, $p=0,599$; ANOVA) tidak berpengaruh signifikan terhadap rerata terhadap bobot segar kalus (Tabel 4). Berdasarkan Tabel 4 bobot segar kalus pada setiap perlakuan yang diberi perlakuan tunggal 2,4-D maupun tunggal BAP dan perlakuan kombinasi tidak memperlihatkan pengaruh nyata terhadap bobot segar kalus. Penambahan 2,4-D dan BAP akan menyebabkan sel-sel melakukan pembelahan dan perkembangan serta menyerap nutrisi dan air dari media dengan kemampuan yang sama. Hal ini selaras dengan Yelnitis, (2012) penambahan auksin dan sitokinin maka membuat sel-sel mengalami pembelahan dan pembesaran terus menerus. Penelitian Mastuti *et al.*, (2020) memperoleh hasil bahwa interaksi antara zat pengatur tumbuh sitokinin dan auksin sangat memengaruhi bobot segar kalus, terlihat pada kalus dari eksplan kotiledon dengan penambahan kombinasi 0,5 atau 1 mg/l BAP dengan 2 mg/l 2,4-D yang tidak berpengaruh nyata. Rahayu *et al.*, (2003) menjelaskan bahwa air yang terkandung di dalam sel akan menentukan besarnya bobot segar kalus.

Tabel 4. Rerata bobot segar kalus (g) pada kultur hipokotil belimbing merah pada media Murashige Skoog dengan kombinasi 2,4- D dan BAP (84 hst)

2,4-D (ppm)	Rerata bobot basah kalus (g)				
	BAP (ppm)				
	0	0,25	0,5	0,75	1
0	0,333	0,300	0,333	0,400	0,267
0,25	0,300	0,367	0,267	0,300	0,233
0,5	0,433	0,300	0,300	0,300	0,333
0,75	0,400	0,300	0,300	0,300	0,333
1	0,300	0,300	0,267	0,367	0,367

Data Tabel 4 pada setiap perlakuan yang diberikan baik perlakuan tunggal 2,4-D maupun BAP dan perlakuan kombinasi tidak memperlihatkan pengaruh signifikan terhadap bobot segar kalus. Konsentrasi 2,4-D dan BAP

yang diberikan mampu menginduksi sel untuk memulai pembelahan dan perkembangan serta menyerap nutrisi dan air dari media dengan kemampuan yang sama. Yelnitis (2012) menyatakan bahwa penambahan auksin dan

sitokinin ke dalam media akan membuat sel-sel mengalami pembelahan dan pembesaran terus menerus.

Bobot kering kalus

Hasil analisis statistik menunjukkan faktor tunggal 2,4-D ($F_{24,50}=6,927$, $p=0,00$; ANOVA), faktor tunggal BAP ($F_{24,50}=5,420$, $p=0,001$; ANOVA) berpengaruh signifikan terhadap rerata bobot kering kalus sedangkan rerata bobot kering kalus tidak dipengaruhi secara signifikan faktor interaksi 2,4-D dan BAP ($F_{24,50}=1,489$, $p=0,124$; ANOVA) (Tabel 5). Hasil uji lanjut

diperoleh rerata bobot kering kalus perlakuan tunggal 0,75 ppm BAP (0,024 g) tidak berbeda nyata dengan perlakuan tunggal 1 ppm BAP (0,023 g), namun berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Rerata bobot kering perlakuan tunggal 0,75 ppm 2,4-D yaitu 0,022 gram tidak berbeda secara signifikan dengan perlakuan tunggal 1 ppm dan 0,5 ppm 2,4-D dan tanpa 2,4-D namun menunjukkan signifikansi dengan perlakuan tunggal 0,25 ppm 2,4-D yaitu 0,015 gram. Perlakuan tunggal 0,75 ppm BAP menghasilkan bobot kering kalus tertinggi yaitu 0,024 g.

Tabel 5. Rerata bobot kering kalus (g) pada kultur hipokotil kecambah belimbing merah pada media Murashige Skoog dengan kombinasi 2,4-D dan BAP (84 hst)

2,4-D (ppm)	Rerata bobot kering kalus (g)					Rerata
	BAP (ppm)					
	0	0,25	0,5	0,75	1	
0	0,021	0,022	0,023	0,027	0,024	0,023 ^C
0,25	0,016	0,019	0,006	0,016	0,020	0,015 ^A
0,5	0,019	0,017	0,015	0,026	0,019	0,019 ^B
0,75	0,017	0,017	0,026	0,023	0,026	0,022 ^{BC}
1	0,015	0,021	0,020	0,027	0,026	0,022 ^{BC}
Rerata	0,017 ^A	0,019 ^A	0,018 ^A	0,024 ^B	0,023 ^B	

Keterangan : Nilai pada setiap baris dan kolom yang diikuti oleh huruf besar yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan terhadap masing-masing faktor tunggal berdasarkan uji lanjut Duncan pada taraf 5%.

Data Tabel 5 perlakuan tunggal BAP dan tunggal 2,4-D memperlihatkan pengaruh nyata terhadap bobot kering kalus. Hal ini menunjukkan adanya peranan sitokinin terhadap respon yang muncul pada eksplan. Anjani *et al.*, (2022) menyatakan sitokinin ditambahkan dalam media kultur akan memicu proses metabolisme sel dan menyebabkan peningkatan berat kering kalus. Sitokinin berperan penting terhadap morfologi, fisiologi, dan hasil tanaman, serta merupakan faktor utama mengatur penyerapan, transportasi, dan metabolisme nitrogen (Shah *et al.*, 2023). Selanjutnya dijelaskan sitokinin berperan dalam proses transkripsi molekul RNA dan memengaruhi metabolisme protein sehingga menambah bobot kering kalus. Rata-rata bobot kering tertinggi adalah 0,024 gram diperoleh perlakuan tunggal 0,75 ppm BAP. Pertumbuhan kalus di dalam kultur ditentukan interaksi dan keseimbangan antara auksin dan sitokinin eksogen ditambahkan dalam media dengan zat pengatur tumbuh endogen (Andaryani, 2010).

Kesimpulan

Perlakuan konsentrasi 2,4-D dan BAP memberikan pengaruh signifikan terhadap waktu

pembentukan kalus dan berat kering kalus, namun tidak berpengaruh nyata terhadap berat basah kalus. Warna kalus yang terbentuk bervariasi yaitu coklat, putih, dan kehijauan dengan tekstur kalus kompak. Rerata waktu terbentuknya kalus tercepat yaitu 11 hari pada perlakuan 0,75 ppm, 1ppm 2,4-D tanpa BAP dan perlakuan kombinasi 1 ppm 2,4-D dan 0,75 BAP.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih penulis ucapkan kepada Dr. Zulfa Zakiah dan Masnur Turnip, M.Sc sebagai ketua dan anggota peneliti atas bantuan dana penelitian melalui penelitian payung yang didanai oleh DIPA Fakultas MIPA Universitas Tanjungpura tahun 2022 dengan no kontrak 2894/UN22.8/PT.00/2022.

Referensi

- Adam, M., & Rasad, M. S. B. B. A. (2015). Expression of Matrix Metalloproteinase-13 in Human Skin Melanoma Cancer Treated by *Baccaurea angulata* in vitro. *Journal of Basic and Applied Research*,

- I*(1),21–28.
<https://www.jbarbiomed.com/index.php/home/article/view/36>
- Andaryani, S. (2010). *Kajian penggunaan berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap induksi kalus jarak pagar secara in vitro*. Skripsi. Fakultas Pertanian, UNS.Surakarta
- Andriyanto, B. E., Ardiningsih, P., & Idiawati, N. (2016). Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Belimbing Hutan (*Baccaurea angulata* Merr.). *JKK*, 5(4), 9-13. <https://jurnal.untan.ac.id/index.php/jkkmpa/article/viewFile/16453/14268>
- Anjani, F. P., Rusmiyanto, E., & Zakiah, Z. (2022). Pertumbuhan Kultur Kalus Yang Diinduksi Dari Eksplan Hipokotil Lakum (*Causonis trifolia* (L.) Mabb. & J.Wen) Dengan Penambahan NAA (*Naphthalene Acetic Acid*) dan BAP (*6-Benzyl Amino Purin*). *Buletin Kebun Raya*, 25(2), 96-102. DOI: <https://doi.org/10.55981/bkr.750>
- Ariati, S. N., Waeniati, Muslimin, & Suwastika, I. N. (2012). Induksi Kalus Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) Pada Media MS Dengan Penambahan 2,4-D, BAP dan Air Kelapa. *Jurnal Natural Science*, 1(1), 74–84. <http://jurnal.untad.ac.id/jurnal/index.php/ejurnalfmipa/article/view/1022>
- Dodo. (2015). Keanekaragaman dan konservasi tumbuhan buah langka indonesia. *Warta Kebun Raya*, 13(2), 37–42.
- Evans, D. E., Coleman, J. O. D., & Kearns, A. (2003). *Plant Cell Culture*. Taylor&Francis. New York.
- Gultom, M. S., Anna, N., & Siregar, E. B. M. (2012). Respon Eksplan Biji Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) terhadap Pemberian IAA secara In Vitro. *Peronema Forestry Science Journal*. <https://www.neliti.com/id/publications/156144/>
- Haegens, R. M. A. P. (2000). Taxonomy, Phylogeny, and Biogeography of *Baccaurea*, *Distichirhops*, and *Nothobaccaurea* (*Euphorbiaceae*). *Blumea Supplement* 12(1), 1-208.
- Hendaryono, D. P. S., & Wijayani, A. (1994). *Teknik Kultur Jaringan Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman Secara Vegetatif*. Kanisius.Yogyakarta.
- Indah, P. N., & Ermavitalini, D. (2013). Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *JURNAL SAINS DAN SENI POMITS*, 2(1), 1–6. DOI: 10.12962/j23373520.v2i1.2571
- Intias, S. (2012). *pengaruh pemberian berbagai konsentrasi 2,4-D dan BAP terhadap pembentukan kalus purwoceng secara in vitro*. Skripsi. Fakultas Pertanian, UNS. Surakarta.
- Kamillia, G., Sulichantini, E. D. W. I., & Pujowati, P. (2019). Pengaruh Pemberian Berbagai Bahan Zat Pengatur Tumbuh Alami Pada Pertumbuhan Bibit Cempedak (*Artocarpus champeden* Lour.) *Jurnal Agroekoteknologi Tropika Lembab*, 2(1), 20–23. DOI: <http://dx.doi.org/10.35941/jatl.2.1.2019.2528.20-23>
- Lim, T. (2012). *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Vol. 1. Fruits.
- Mahadi, I., Syafi, W., & Sari, Y. (2016). Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) Menggunakan Hormon 2, 4-D dan BAP dengan Metode in vitro (*Callus Induction of Calamansi (Citrus microcarpa) Using 2, 4-D and BAP Hormones by in vitro Methods*). *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 21(2), 84–89. <https://doi.org/10.18343/jipi.21.2.84>
- Mardini, U. (2015). *Pengaruh Kombinasi 2,4-D dan BAP Terhadap Induksi Kalus Eksplan Daun Dan Batang Tanaman Binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis) Secara In Vitro*. Skripsi. FKIP, Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Mastuti, R., Widoretno, W., & Harijati, N. (2020). Kultur Kalus Tanaman Obat Ciplukan (*Physalis angulata* L.). *BIOTROPIKA Journal of Tropical Biology*, 8(1), 26–35. DOI: <https://doi.org/10.21776/ub.biotropika.2020.008.01.05>
- Rahayu, B., Solichatun, & Anggarwulan, E. (2003). Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*, 1(1), 1–6. <https://core.ac.uk/download/pdf/12345765.pdf>

- Rasud, Y., & Bustaman (2020). Induksi Kalus secara In Vitro dari Daun Cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.) dalam Media dengan Berbagai Konsentrasi Auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25(1), 67–72.
<https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>
- Rivai, R. R., & Helmanto, H. (2015). Induksi kalus *Chrysanthemum indicum* untuk meningkatkan keragaman genetik dari sel somatik. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 1, 167–170.
<https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010129>
- Shah, S., Cai, L., Li, X., Fahad, S., & Wang, D. (2023). Influence of cultivation practices on the metabolism of cytokinin and its correlation in rice production. *Food Energy Security*, 1–23.
<https://doi.org/10.1002/fes3.488>
- Soheili, S., Miri, S. M., & Ghazijahani, N. (2021). Callus Induction from In Vitro Cultured Leaf, Hypocotyl and Root of *Hyssopus officinalis*. *1st National Conference on the Application of Advanced chemical and Agricultural Research for Development of Medicinal Plants*.
- Sudarmono (2018). Belimbing darah (*Baccaurea angulata* Merr.), buah keluarga menteng endemik Kalimantan dan kerabatnya. *Warta Kebun Raya*, 6(1), 54–62.
- Vickery, M. L., & Vickery, B. (1981). *Secondary Plant Metabolism*. The Macmillan Press Ltd. London.
- Wardani, D. P., Solichatun, & Setyawan, A. D. (2004). Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin. *Biofarmasi*, 2(1), 35–43.
<https://doi.org/10.13057/biofar/f020106>
- Yelnititis (2012). Pembentukan Kalus Remah Dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 6(3), 181–194.
<http://ejournal.forda-mof.org/ejournal-litbang/index.php/JPTH/article/view/1747/0>
- Zulkarnain (2011). *Kultur jaringan tanaman : solusi perbanyak tanaman budi daya*.
- Zulkarnain, & Lizawati (2011). Proliferasi Kalus dari Eksplan Hipokotil dan Kotiledon Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) pada Pemberian 2,4-D. *Jurnal Natur Indonesia*, 14(1), 19–25.