



Respon Pembentukan Kalus Daun *Tacca Chantrieri* dengan Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP Secara *In Vitro*

The Response of Callus Formation from *Tacca Chantrieri* Leaves with Various Concentrations of 2,4-D and BAP by *In Vitro*

Maya Sari^{*)} dan Mayta Novaliza Isda

Laboratorium Terpadu, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru, 28293

SUBMISSION TRACK

Submitted : 2021-02-10
Revised : 2021-03-22
Accepted : 2021-06-24
Published : 2021-06-24

KEYWORDS

Tacca chantrieri,
secondary metabolites,
in vitro, callus,
2,4-D,
BAP

*CORRESPONDENCE

email:
maya.sari0320@student.unri.ac.id

ABSTRACT

The an annual herbaceous tropical plant which is one of the species of the genus *Tacca* from the Dioscoreaceae family is *Tacca chantrieri*. *T. chantrieri* has a unique inflorescence morphology like that of a bat. The people of Southeast China and Thailand have used by *T. chantrieri* rhizome as traditional medicine because the methanol extract contains secondary metabolites such as diarylheptanoids, pseudofurostan, withanolide, taccalonolide, and saponins. To maintain its sustainability, it is necessary to propagate *T. chantrieri* by using *in vitro* culture techniques such as callus culture. The purpose of this study was to determine the response of *T. chantrieri* leaf callus formation and to determine the optimal concentration with various concentrations of 2,4-D and BAP *in vitro*. This study used a completely randomized design consisting of control treatments, 1 and 2 mg L⁻¹ 2,4-D and concentrations of 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 2,4-D combined with 3 mg L⁻¹ BAP. The observations were made for 60 days after planting. The results showed that the concentration of 1.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 3 mg L⁻¹ BAP affected the percentage of live explants and the percentage of callus formation by 100% respectively, and the time of callus appeared 18.75 days after planting.

PENDAHULUAN

Tacca chantrieri termasuk satu dari 15 spesies famili Dioscoreaceae merupakan tumbuhan herba tahunan dengan wilayah penyebaran meliputi Amerika Selatan, Afrika, Cina Selatan, Thailand, dan Indo-Malesia seperti Sumatera, Kalimantan dan Malaysia. *T. chantrieri* memiliki morfologi perbungaan yang unik seperti kelelawar (Zhang *et.al.*2005). *T. chantrieri* mempunyai rimpang berbentuk silindris dan sudah digunakan sebagai obat tradisional di Cina Tenggara dan Thailand (Zhang *et al.* 2011). *T. chantrieri* memiliki aktivitas analgesik, anti-perik, dan anti-inflamasi. Sifat anti-inflamasi baik untuk mengobati luka bakar, tukak lambung, sakit perut dan luka (Keardrit *et al.* 2010).

Rimpang *T. chantrieri* mengandung senyawa metabolit sekunder seperti diarylheptanoids, konstituen steroid termasuk spirostan, furostan, taccalonolide, dan saponin (Yokosuka *et al.* 2002). Kandungan metabolit

sekunder yang banyak pada *T. chantrieri* berpotensi sebagai sumber tanaman obat yang dapat diproduksi dalam skala besar. Hal tersebut belum banyak dilakukan karena banyaknya aksi pembukaan hutan (*landclearing*) dan pengalihfungsian hutan menjadi hutan tanaman industri (HTI) yang mengakibatkan jumlah *T. chantrieri* di habitat asalnya menjadi berkurang. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan perbanyakan yang bertujuan untuk mempertahankan kelestariannya. Perbanyakan *T. chantrieri* dapat dilakukan melalui teknik kultur *in vitro* yaitu *in vitro* adalah kultur kalus (Yelnitis *et al.* 1998).

Kalus adalah kumpulan sel yang belum terdiferensiasi, dan terbentuk pada bekas luka atau irisan pada organ tanaman yang dikulturkan (Dwiyani 2015). Penelitian Manullang (2018) menyatakan bahwa 3 mg L⁻¹ BAP dapat memacu waktu pembentukan kalus eksplan daun *T. chantrieri* berkisar antara 17,33-18,66 hari setelah tanam (HST), dan penelitian Rudiyanto *et al.* (2019) bahwa persentase

terbentuknya kalus daun *Dioscorea alata* L. pada perlakuan $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP sebesar 66,67 %. Berdasarkan uraian tersebut maka perlu dilakukan penelitian mengenai respon pembentukan kalus daun *T. chantrieri* Andre dengan berbagai konsentrasi 2,4-D dan BAP secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan mengetahui respon pembentukan kalus daun *T. chantrieri* dan menentukan konsentrasi optimal dari 2,4-D dan BAP terhadap pembentukan kalus daun *T. chantrieri* secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Sterilisasi eksplan menggunakan metode Martin *et al.* (2013). Daun dari tanaman induk direndam dalam air sabun (5%) selama 10 menit, kemudian direndam dalam larutan dithane M-45 80WP (3%) selama 30 menit, dan dicuci dengan air mengalir selama 1 jam 30 menit. Proses sterilisasi selanjutnya dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) LCB-0102H. Daun direndam alkohol (70%) selama 1 menit dan dibilas akuades steril 2 kali, kemudian direndam dalam sodium hipoklorit (20%) selama 10 menit dan dibilas dengan akuades steril 3 kali. Daun dipotong 3 cm pada ujung dan pangkal daun, dipotong dengan ukuran 2x2 cm dan diinisiasikan dengan cara meletakkan bagian permukaan atas daun (adaksial) menghadap ke media.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Eksplan Hidup

Berdasarkan Tabel 1 persentase eksplan hidup berkisar antara 75-100 %. Berdasarkan hasil pengamatan eksplan hidup ditandai dengan eksplan dalam keadaan hijau, segar, dan tidak mengalami pencoklatan. Tingginya persentase hidup eksplan daun *T. chantrieri* secara *in vitro* tidak terlepas dari faktor-faktor yang mempengaruhinya. Menurut Dwiyani (2015) faktor-faktor yang berpengaruh terhadap

pertumbuhan dan perkembangan kultur *in vitro* adalah eksplan, media tanam, kondisi fisik media, zat pengatur tumbuh dan lingkungan tumbuh. Karakteristik eksplan yang digunakan meliputi umur eksplan, ukuran eksplan dan tipe pemotongan. Eksplan daun *T. chantrieri* dipilih yang muda, penggunaan eksplan daun *T. chantrieri* yang muda karena jaringan tanaman bersifat meristematik dan memiliki daya regenerasi yang tinggi, sehingga dapat tumbuh pada media kultur. Menurut Lestari (2011) bagian tanaman yang bersifat meristematik dapat berasal dari daun muda, ujung akar, ujung batang, keping biji atau tunas.

Eksplan daun *T. chantrieri* dipilih bagian tengah daun yang meliputi ibu tulang daun. Pemilihan bagian ini bertujuan karena pada bagian ibu tulang daun memiliki jaringan pengangkut, yang akan membantu proses difusi unsur hara pada media ke dalam eksplan. Media Murashige dan Skoog (MS) adalah media yang umum dan paling banyak digunakan karena mengandung unsur hara makro dan mikro yang lengkap (Martin *et al.* 2013). Selain itu berdasarkan pengamatan eksplan mengalami pencoklatan pada bagian yang mengalami perlukaan akibat pemotongan. Menurut Hutami (2008) pencoklatan pada jaringan terjadi karena aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase yang dilepaskan atau disintesis dan tersedia pada kondisi oksidatif ketika jaringan dilukai.

Persentase eksplan hidup yang disajikan dalam Tabel 1 mencapai 100% kecuali perlakuan 1 mg L^{-1} 2,4-D dan 2 mg L^{-1} 2,4-D + 3 mg L^{-1} BAP sebesar 75%, hal ini disebabkan karena eksplan mengalami kontaminasi jamur *Zigomycetes* pada 30 HST. Kontaminasi ini sama seperti hasil penelitian Oratmangun *et al.* (2017) terkait kontaminan kultur kalus *Catharanthus roseus* L yang didominasi oleh kontaminan jamur.

Tabel 1. Persentase Eksplan Hidup (%) dan Persentase Pembentukan Kalus (%) Eksplan Daun *T. chantrieri* dengan Perlakuan 2,4-D dan BAP Selama 60 Hari Ssetelah Tanam (HST)

Kode Perlakuan	Perlakuan		Persentase Eksplan Hidup (%)	Persentase Pembentukan Kalus (%)
	2,4-D (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)		
M0	0	0	100	50
M1	1	0	75	75
M2	2	0	100	75
M3	0,5	3	100	50
M4	1	3	100	50
M5	1,5	3	100	100
M6	2	3	75	75

Persentase Pembentukan Kalus

Berdasarkan Tabel 1 persentase pembentukan kalus eksplan daun *T. chantrieri* menunjukkan hasil yang berbeda, berkisar antara 50-100%. Persentase pembentukan kalus pada perlakuan kontrol (M0) sebesar 50% , hal ini disebabkan karena media pada perlakuan kontrol sebagai sumber makanan hanya mengandung senyawa organik dan anorganik, seperti nutrient makro dan mikro tanpa penambahan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). Pada perlakuan kontrol ZPT hanya berasal dari hormon auksin dan sitokinin endogen tanaman itu sendiri yang belum mencukupi, sehingga untuk meningkatkan persentase pembentukan kalus diperlukan penambahan hormon auksin dan sitokinin eksogen (Sugiyarto dan Paramita 2014).

Penambahan berbagai konsentrasi 2,4-D berpengaruh terhadap persentase pembentukan kalus. Penambahan 1 mg L⁻¹ 2,4-D (M1) dan 2 mg L⁻¹ 2,4-D (M2) secara tunggal mampu meningkatkan persentase pembentukan kalus sebesar 75% jika dibandingkan dengan kontrol. Penambahan 2,4-D dalam media kultur akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat menginduksi pembentukan dan pertumbuhan kalus.

Berdasarkan Tabel 1 terdapat pengaruh interaksi antara 2,4-D dan BAP menunjukkan persentase pembentukan kalus yang berbeda-beda. Rerata persentase pembentukan kalus secara berturut diperoleh dari kombinasi perlakuan M3 dan M4 sebesar 50%, M5 sebesar 100%, dan M6 sebesar 75 %. Perbedaan

persentase pembentukan kalus pada perlakuan kombinasi auksin dan sitokinin disebabkan oleh peningkatan konsentrasi auksin yaitu 2,4-D yang digunakan.

Auksin dalam konsentrasi rendah akan menstimulasi pembesaran dan pemanjangan sel setelah terjadinya pembelahan sel yang distimulir oleh sitokinin yaitu BAP tetapi, pada perlakuan kombinasi M3 dan M4 hanya mampu menginduksi persentase pembentukan kalus sebesar 50%. Hasil tersebut lebih rendah jika dibandingkan dengan hasil persentase perlakuan yang menggunakan 2,4-D tunggal menunjukkan bahwa penambahan auksin dalam konsentrasi rendah belum mampu meningkatkan persentase pembentukan kalus eksplan daun *T. chantrieri*. Menurut Renicha (2016) keseimbangan efektifitas zpt auksin dan sitokinin eksogen bergantung pada konsentrasi hormon auksin dan sitokinin endogen dalam jaringan tanaman.

Hasil penelitian sebelumnya yaitu Manullang (2018) bahwa penambahan konsentrasi auksin yang rendah pada perlakuan kombinasi 0,1 mg L⁻¹ 2,4-D + 3 mg L⁻¹ BAP justru dapat memacu pembentukan kalus eksplan daun *T. chantrieri* sebesar 100%. Kombinasi auksin dan sitokinin juga dapat memberikan respon yang berbeda-beda tergantung spesies, macam organ, umur organ, konsentrasi hormon endogen, dan faktor lingkungan seperti cahaya dan suhu ruangan tempat kultur (Zulkarnain 2009). Kerja dari auksin dan sitokinin dapat menyebabkan konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen didalam sel menjadi meningkat sebab kedua

hormon tersebut merupakan faktor pemicu dalam proses pertumbuhan dan perkembangan suatu jaringan (Asra *et al.* 2020).

Perbandingan auksin dan sitokinin menjadi faktor kritis dalam mengontrol pertumbuhan organogenesis sehingga diperlukan kombinasi yang tepat agar dapat menginduksi pembentukan kalus yang optimal. Kombinasi auksin dan sitokinin yang seimbang dalam penelitian ini diperoleh pada perlakuan $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + 3 mg L^{-1} BAP (M5) mampu meningkatkan presentase pembentukan kalus sebesar 100%, hal ini terjadi karena konsentrasi hormon auksin eksogen berinteraksi dengan auksin endogen yang ada dalam jaringan untuk menstimulasi pemanjangan sel ditambah dengan hormon sitokinin eksogen mampu merangsang pembelahan sel, sehingga konsentrasi 2,4-D dan BAP yang optimal pada perlakuan M5 dapat meningkatkan persentase pembentukan kalus eksplan daun *T. chantrieri* dibandingkan dengan perlakuan kombinasi lainnya.

Peningkatan konsentrasi auksin pada perlakuan M6 menyebabkan terjadinya penurunan presentase pembentukan kalus sebesar 75%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi auksin yang ditambahkan dalam media dapat meningkatkan konsentrasi etilen yang dihasilkan, hal ini menyebabkan terhambatnya aktivitas auksin dalam pemanjangan sel. Hasil penelitian Latunra *et al.* (2017) menunjukkan bahwa kombinasi konsentrasi 2 mg L^{-1} 2,4-D + 3 mg L^{-1} BAP hanya dapat memacu pembentukan kalus *Musa acuminta* Colla sebesar 66%.

Waktu Muncul Kalus

Berdasarkan Tabel 2 rerata waktu muncul kalus pada setiap perlakuan berbeda-beda berkisar antara 18,75 - 30 HST. Rerata waktu muncul kalus tercepat adalah 18,75 HST pada perlakuan M5 BAP dan rerata waktu muncul kalus paling lama yaitu 30 HST pada perlakuan. M3. Perbedaan waktu muncul kalus pada setiap perlakuan diduga dipengaruhi oleh perbedaan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang

ditambahkan (eksogen) dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang dimiliki oleh tanaman itu sendiri dan umur eksplan.

Kemampuan bagian tanaman untuk membentuk kalus salah satunya tergantung pada umur fisiologi bahan tanam waktu diisolasi, untuk pengambilan bahan tanam dari umur fisiologi *juvenile* lebih baik dibanding umur fisiologi yang mendekati *mature* (Santoso dan Nursandi 2003). Rerata waktu muncul kalus pada perlakuan kontrol (M0) adalah 27 HST, diduga hormon endogen pada eksplan mencukupi untuk induksi kalus.

Penambahan zat pengatur tumbuh dalam media MS dapat memberikan efektifitas yang nyata pada tanaman tergantung pada konsentrasi yang diinginkan dalam kultur kalus sehingga lebih terarah dalam mempengaruhi morfogenesisnya. Rerata waktu muncul kalus penambahan auksin pada perlakuan 1 mg L^{-1} 2,4-D adalah 22 HST dan perlakuan 2 mg L^{-1} 2,4-D adalah 21 HST. Penambahan 2,4-D tunggal menghasilkan rerata waktu muncul kalus lebih cepat jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol. 2,4-D dapat menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel.

Pelonggaran dinding sel akibat pH rendah akan mengaktifkan enzim hidrogenase yang memutuskan ikatan silang hidrogen sehingga air masuk kedalam sel secara osmosis menyebabkan sel bertambah panjang dan terus tumbuh dengan cara mensintesis kembali mineral dinding sel dan sitoplasma. Diperkuat dengan hasil penelitian sari (2018) bahwa penambahan auksin tunggal pada perlakuan 1 mg L^{-1} dan 2 mg L^{-1} 2,4-D mampu menginduksi pembentukan kalus daun *Graptophyllum pictum* L. Griff pada 17,07-19,8 HST. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian auksin sangat efektif dalam memacu waktu muncul kalus. Walaupun demikian peranan sitokinin sangat dibutuhkan untuk induksi kalus sehingga kombinasi keduanya sangat baik untuk meningkatkan waktu muncul kalus.

Tabel 2. Waktu Muncul Kalus (HST) Eksplan Daun *Tacca chantrieri* dengan Perlakuan 2,4-D dan BAP secara *In Vitro* Selama 60 Hari Setelah Tanam (HST).

Kode Perlakuan	Perlakuan		Ulangan				Rerata (HST)
	2,4-D (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	U1	U2	U3	U4	
M0	0	0	-	26	-	28	27
M1	1	0	-	26	22	18	22
M2	2	0	22	22	19	-	21
M3	0,5	3	32	-	-	28	30
M4	1	3	18	-	-	22	20
M5	1,5	3	22	17	18	18	18,75
M6	2	3	28	-	18	22	22,67

Penambahan 2,4-D yang dikombinasikan dengan BAP memiliki perbedaan hasil rerata terhadap waktu muncul kalus eksplan daun *T. chantrieri*. Penambahan auksin dalam konsentrasi rendah pada perlakuan 0,5 mg L⁻¹ + 3 mg L⁻¹ BAP (M3) menghasilkan rerata waktu muncul kalus terlama yaitu 30 HST dan belum mampu memacu rerata waktu muncul kalus tercepat jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol dan perlakuan 2,4-D tunggal. Berdasarkan Tabel 2 menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi 2,4-D pada perlakuan kombinasi dapat meningkatkan rerata waktu muncul kalus eksplan daun *T. chantrieri*.

Perlakuan 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 3 mg L⁻¹ BAP merupakan perlakuan kombinasi yang optimal untuk memacu waktu muncul kalus tercepat. 2,4-D merupakan zat pengatur tumbuh golongan auksin eksogen yang stabil dan paling efektif untuk memacu terbentuknya kalus pada eksplan sedangkan BAP merupakan zat pengatur tumbuh golongan sitokinin eksogen yang mampu merangsang pembelahan sel daun dan melakukan proses dediferensiasi untuk membentuk kalus lebih cepat. Pemberian konsentrasi 2,4-D yang dikombinasikan dengan BAP dalam keseimbangan yang sesuai menurut Indriani *et al.* (2016) cenderung mampu memacu terbentuknya kalus pada eksplan daun lebih cepat.

Peningkatan konsentrasi auksin dari batas optimal keseimbangan hormon auksin dan sitokinin yang ditambahkan justru menurunkan fungsi kerja hormon, hal ini dapat dilihat pada perlakuan 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 3 mg L⁻¹ BAP mengalami penurunan rerata waktu muncul

kalus. Berdasarkan Tabel 2 dapat diketahui juga bahwa tidak semua ulangan dalam setiap perlakuan dalam penelitian ini menghasilkan kalus. Kalus yang tidak tumbuh ditunjukkan dengan tanda (-). Cepat atau lama munculnya kalus dipengaruhi oleh kerja hormon auksin dan sitokinin endogen dan eksogen yang saling berkorelasi. Penambahan auksin dan sitokinin eksogen akan mengubah konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen sel. Hal ini diperkuat oleh hasil penelitian Latunra *et al.* (2017) bahwa kombinasi 2 mg L⁻¹ 2,4-D + 3 mg L⁻¹ BAP efektif menginduksi kalus daun *Musa acuminata* Colla dengan waktu muncul kalus 2 minggu setelah tanam (MST), tetapi saat konsentrasi auksin ditingkatkan pada perlakuan 3 mg L⁻¹ 2,4-D + 2 mg L⁻¹ BAP eksplan *Musa acuminata* Colla tidak mengalami pembentukan kalus sampai akhir pengamatan.

Morfologi Kalus

Morfologi kalus eksplan daun *T. chantrieri* terdiri atas tekstur dan warna kalus (Gambar 1). Berdasarkan pengamatan kalus yang dihasilkan adalah kalus embriogenik. Kalus embriogenik mempunyai ciri yaitu mempunyai ukuran sel yang kecil dan bergerombol, ikatan antar sel tampak renggang, jika diambil dengan pinset akan mudah pecah, dan bertekstur remah.

Berdasarkan hasil pengamatan dalam Tabel 3 kalus eksplan daun *T. chantrieri* menghasilkan kalus bertekstur remah. Kalus remah merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel yang panjang berbentuk tubular dimana struktur sel-selnya renggang, tidak teratur dan rapuh (Wayastuti *et al.* 2017). Terbentuknya

kalus bertekstur remah dalam penelitian ini diduga karena pengaruh zat pengatur tumbuh baik endogen maupun eksogen pada eksplan.

Pengaruh zat pengatur tumbuh endogen pada tanaman dapat dilihat pada perlakuan kontrol (M0) yang merupakan perlakuan tanpa penambahan zpt menghasilkan kalus bertekstur remah. Penambahan zpt auksin berupa 2,4-D ke dalam media kultur mempengaruhi pertumbuhan tekstur kalus pada eksplan. Penambahan 2,4-D menyebabkan sel-sel akan lebih aktif membelah dan melakukan perbesaran sehingga penambahan 2,4-D secara tunggal dan dikombinasikan dengan BAP menghasilkan kalus bertekstur remah. Kalus yang terbentuk dominan berstruktur remah dapat dikatakan kalus berkualitas baik, karena kalus yang remah mudah untuk melakukan pemisahan menjadi sel-sel tunggal, disamping itu akan meningkatkan aerasi oksigen antar sel.

Menurut Nabilah (2016) adanya struktur tersebut dapat mengupayakan untuk perbanyak dalam hal jumlah kalus yaitu melalui suspensi yang lebih mudah. Hasil penelitian Manullang (2018) perlakuan 2,4-D yang dikombinasikan dengan BAP menghasilkan kalus bertekstur remah lebih banyak pada eksplan daun *T. chantrieri*, serta penelitian Rasud dan Bustaman (2020) pemberian 2,4-D pada semua konsentrasi 0,25–0,75 ppm menghasilkan kalus yang bertekstur remah terhadap induksi kalus daun *Syzigium aromaticum* L.

Warna kalus eksplan daun *T. chantrieri* pada Gambar.1 menggambarkan penampilan visual sel-sel kalus sehingga dapat diketahui tingkat keaktifan pembelahan sel-selnya. Perubahan warna pada kalus menunjukkan adanya perubahan fase pertumbuhan pada sel, dari sel-sel yang muda dan aktif membelah menjadi sel-sel yang dewasa atau *mature*. Hasil pengamatan morfologi warna kalus eksplan daun *T. chantrieri* disajikan dalam Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3 warna kalus dari eksplan daun *T. chantrieri* pada penelitian ini yaitu putih, putih hijau, putih kuning, putih coklat, dan hijau. Kalus yang berwarna hijau

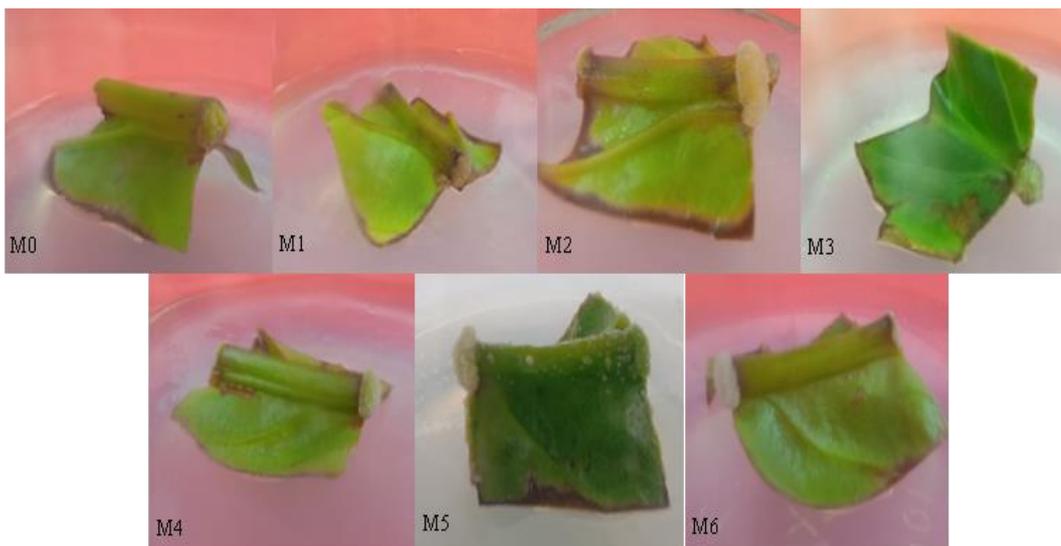
terdapat pada M0 yang merupakan perlakuan kontrol tanpa penambahan zpt. Terbentuknya warna kalus hijau pada perlakuan M0 diduga karena pengaruh hormon endogen yang berasal dari eksplan itu sendiri. Warna hijau pada kalus menunjukkan adanya akumulasi klorofil pada kalus yang terbentuk. Menurut Wardani *et al.* (2004) klorofil disintesis dari asam glutamat melalui reaksi enzimatik yang kompleks dan beberapa tahap sintesisnya dipengaruhi cahaya.

Pembentukan kalus juga dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media. Berdasarkan Tabel 3 menunjukkan bahwa kalus berwarna putih banyak dihasilkan pada perlakuan M1, M2, M3, M4, M5, dan M6. Berdasarkan pengamatan warna putih (cerah) pada kalus lebih tahan lama dari awal pembentukan kalus sampai akhir pengamatan atau selama 60 hari setelah tanam (HST). Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Perlakuan 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 3 mg L⁻¹ BAP (M5) menghasilkan kalus berwarna putih hijau diasumsikan terjadi perubahan butir pati sedikit-demi sedikit tumbuh menjadi sistem membran yang jelas yang akhirnya terbentuk butir-butir klorofil dengan paparan cahaya, sehingga kalus menjadi berwarna hijau (Wayastuti *et al.* 2017).

Warna kalus putih kuning yang terdapat pada perlakuan 2 mg L⁻¹ 2,4-D (M2) mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik. Warna kalus putih hingga putih kekuningan mempunyai sel yang masih aktif melakukan pembelahan dan belum mengandung klorofil. Menurut Yelnitis (2012) menyatakan bahwa perubahan warna kalus dari putih hingga putih kekuningan merupakan salah satu ciri kalus yang dapat berkembang menjadi embrionik. Warna kalus putih coklat pada perlakuan 1 mg L⁻¹ 2,4-D (M1) menunjukkan adanya perubahan fase pertumbuhan pada sel, dari sel-sel yang muda dan aktif membelah (putih) menjadi sel-sel yang dewasa atau *mature* (putih kekuningan) kemudian berubah warna menjadi coklat.

Warna kalus berubah menjadi coklat pada perlakuan M1 disebabkan adanya metabolisme senyawa fenol yang bersifat toksik. Senyawa fenol akan teroksidasi membentuk quinon yang memiliki sifat racun terhadap sel-sel tanaman dan dapat menyebabkan kematian pada sel-sel tanaman. Oksidasi fenol jugadapat menyebabkan pencoklatan medium dan akan mengakibatkan kematian eksplan. Warna kecoklatan pada kalus dapat juga disebabkan adanya respon kalus terhadap lingkungannya atau kalus telah masuk pada fase stasioner (penuaan) yang selanjutnya dapat menyebabkan

kematian sel. Penambahan konsentrasi sitokinin BAP yang tinggi pada media mampu memperlambat proses senesen (penuaan) sel dengan menghambat perombakan-perombakan butir-butir pati dan protein dalam sel sehingga pencoklatan pada kalus terjadi diakhir-akhir masa pengamatan. Hutami (2008) juga melaporkan bahwa pencoklatan jaringan sangat menurunkan regenerasi secara *in vitro* dari kultur kalus. Berdasarkan penelitian Rudiyanto (2019) kombinasi $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP terbentuk kalus eksplan daun *Dioscorea alata* L. bewarna putih kecoklatan.



Gambar 1. Morfologi kalus eksplan daun *T. chantrieri* setelah 60 Hari Setelah Tanam (HST) menghasilkan kalus bertekstur remah dan warna kalus hijau (M0), putih coklat (M1), putih kuning (M2), putih (M3, M4 dan M6), dan putih hijau (M5).

Pertumbuhan Kalus

Kallogenesis merupakan kalus yang terbentuk tidak mengalami diferensiasi menjadi organ, hanya mengalami perubahan ukuran menjadi besar dan aktif membelah. Menurut Indriani *et al.* (2016) kallogenesis merupakan respon awal yang ditandai dengan terbentuknya kalus pada bagian tepi eksplan (bagian pelukaan) bagian atas maupun bagian bawah yang bersentuhan dengan media. Pertumbuhan kalus eksplan daun *T. chantrieri* dengan penambahan 2,4-D dan BAP selama 60 HST disajikan dalam Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3 respon pertumbuhan kalus eksplan daun *T. chantrieri* dengan penambahan 2,4-D dan BAP menghasilkan

respon yang berbeda. Pertumbuhan kalus pada penelitian ini hanya dijumpai pertumbuhan kalus sedikit yang diberi tanda (+) terdapat pada perlakuan M0, M1, M3, M4, dan M6. Pertumbuhan kalus sedang yang ditandai dengan tanda (++) terdapat pada perlakuan M2 dan M5.

Perbedaan hasil pertumbuhan kalus pada setiap perlakuan diduga karena pengaruh kemampuan eksplan daun *T. chantrieri* yang berbeda-beda dalam menyerap nutrisi dan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media MS. Menurut Rahayu (2003) eksplan daun memiliki tingkat rangsangan fisiologi yang berbeda-beda dalam pembentukan kalus karena dipengaruhi oleh fisiologi eksplan tersebut.

Kalus muncul pada eksplan daun *T. chantrieri* yaitu pada ujung potongan bagian pertulangan daun yang ditandai dengan butiran-butiran kecil berwarna putih. Kalus akan cepat terbentuk pada bagian abaksial daun, hal ini berkaitan dengan proses pengambilan nutrisi dalam medium oleh eksplan. Penyerapan unsur hara akan lebih baik karena terjadi kontak secara langsung antara media dengan bagian abaksial daun. Pembentukan kalus eksplan daun *T. chantrieri* diawali oleh proses pembengkakan sel pada tempat perlukaan akibat pemotongan dan tulang daun.

Perlukaan pada eksplan menyebabkan eksplan memperbaiki sel-sel yang rusak tersebut. Menurut Sitinjak *et al.* (2015)

pembentangan dinding sel terjadi karena adanya penyerapan air sehingga sel akan membengkak selanjutnya terjadi pembelahan sel yang akan membentuk kalus. Pemanjangan dan pembelahan sel diduga dipengaruhi oleh kinerja dari auksin dan sitokinin yang ditambahkan. Penambahan konsentrasi 2,4-D tunggal dan kombinasinya dengan BAP dianggap belum efektif untuk menginduksi pertumbuhan kalus eksplan daun *T. chantrieri* dalam jumlah yang banyak karena penambahan hormon eksogen akan mempengaruhi keseimbangan kerja hormon endogen eksplan menyebabkan pertumbuhan kalus eksplan daun *T. chantrieri* belum maksimal.

Tabel 3. Morfologi Kalus dan Pertumbuhan Kalus Eksplan Daun *Tacca chantrieri* dengan Perlakuan 2,4- D dan BAP secara *In Vitro* Selama 60 Hari Setelah Tanam (HST)

Kode Perlakuan	Perlakuan		Morfologi Kalus		Pertumbuhan Kalus
	2,4-D (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	Tekstur Kalus	Warna Kalus	
M0	0	0	Remah	Hijau	+
M1	1	0	Remah	Putih Coklat	+
M2	2	0	Remah	Putih Kuning	++
M3	0,5	3	Remah	Putih	+
M4	1	3	Remah	Putih	+
M5	1,5	3	Remah	Putih Hijau	++
M6	2	3	Remah	Putih	+

KESIMPULAN

Respon pembentukan kalus daun *T. chantrieri* dengan penambahan ZPT 2,4-D tunggal dan kombinasinya dengan BAP berpengaruh terhadap persentase eksplan hidup, persentase pembentukan kalus, dan waktu muncul kalus. Konsentrasi ZPT optimal yang mempengaruhi respon pembentukan kalus daun *T. chantrieri* secara *in vitro* adalah kombinasi 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D + 3 mg L⁻¹ BAP (M5) menghasilkan persentase eksplan hidup dan persentase pembentukan kalus masing-masing sebesar 100% serta waktu muncul kalus yaitu 18,75 HST.

SARAN

Saran dari penelitian ini adalah perlu dilakukan optimalisasi konsentrasi 2,4-D dan BAP untuk meningkatkan pertumbuhan kalus eksplan daun *T. chantrieri*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Project Implementation Unit (PIU) Universitas Riau yang telah membiayai penelitian ini melalui dana Asian Development Bank (ADB) yang tergabung dalam proyek Advance Knowledge and Skills for Sustainable Growth (AKSI) untuk tahun ajaran 2020/2021 yang telah diberikan kepada penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Asra R, Samarlina RA, dan Silalahi M. 2020. Hormon Tumbuhan Cet. 1. UKI Press. Jakarta.
- Dwiyani R. 2015. *Kultur Jaringan Tanaman*. Pelawan Sari. Denpasar Barat.
- Hutami S. 2008. Ulasan Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. *Jurnal Agro Biogen* 4(2):83-88.
- Indriani, Muhtafharottul D, Manuhara Y, Wulan S dan Setiti EW. 2016. Pengaruh Variasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D, Kinetin Dan BAP Terhadap Pertumbuhan Dan Perkembangan Ekstrak Daun Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* merr) [Skripsi]. Departemen Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Keadrit K, Rujjanawate C, dan Amornlerdpison D. 2010. Analgesic, antipyretic, dan anti-inflammatory Effect of *Tacca chanrieri* Andre. *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (19) : 1991-1995.
- Latunra AI, Masniawati A, Baharuddin, Wiwik AT, dan Tuwo M. 2017. Induksi Kalus Pisang Barangan Merah *Musa acuminata* Colla dengan Kombinasi Hormon 2,4-D dan BAP Secara *In Vitro*. *Jurnal Ilmu alam dan lingkungan* 8(15) : 53-61.
- Lestari EG. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyak Tanaman melalui Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen* 7(1) : 63-68.
- Manullang SE. 2018. Induksi Kalus Dari Eksplan Daun *Tacca Chanrieri* Andre Pada Media Ms Dengan Penambahan Bap Dan 2,4-D Secara *In Vitro* [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau. Pekanbaru.
- Martin AF, Maulana E dan Ermayanti TM. 2013. Seleksi Media untuk Regenerasi Kalus dan Peningkatan Pembentukan Planlet Tanaman *Tacca leontopetaloides*. *Seminar Nasional Kimia Terapan Indonesia* ; Solo, 23 Mei. Solo. Hlm 1-7.
- Nabilah IZ. 2016. Induksi Kalus Eksplan Daun Sirih Hitam (*Piper betle* L.) Degan Kombinasi Konsentrasi Zat Pegatur Tumbuh IAA dan BAP [skripsi]. Fakultas Sains Dan Teknologi, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Oratmangun KM, Pandiangana D, dan Kandou FE. 2017. Deskripsi Jenis-Jenis Kontaminan Dari Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Donn. *Jurnal Mipa Unsratonline* 6(1):47-52.
- Rahayu B. 2003. Pengaruh 2,4-D Terhadap Pembentukan Dan Pertumbuhan Kalus Serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi* 1(1) :1-6.
- Rasud Y dan Bustaman. 2020. Induksi Kalus secara *In Vitro* dari Daun Cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.) dalam Media dengan Berbagai Konsentrasi Auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)* 25 (1): 67–72.
- Renicha. 2016. Analisis Metabolit Sekunder Hasil Kultur Eksplan Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) pada Medium Murashige & Skoog (Ms) dan Gamborg (B5) [skripsi]. Universitas Pendidikan. Jakarta.
- Rudiyanto, Wulandari DR dan Ermayanti TM. 2019. Induksi Kalus Uwi Ungu (*Dioscorea alata* L.) Pada Media Ms dengan Penambahan BAP Yang Dikombinasikan dengan 2,4-D. *Jurnal Agroteknologi*: 112-121.
- Santoso U dan Nursandi F . 2004. *Kultur Jaringan Tanaman*. Penerbit UMM. Malang.
- Sari D E. 2018. Pengaruh 2,4-D Dan BAP Dengan Berbagai Konsentrasi Terhadap Induksi Kalus Embriogenik Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* L. Griff) [Skripsi]. Fakultas Sains Dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Sitinjak MA, Isda MN, dan Fatonah S. 2015. Induksi Kalus Dari Eksplan Daun *In Vitro* Keladi Tikus (*Typhonium* Sp.) Dengan Perlakuan 2,4-D Dan Kinetin. *Al-Kaunyah Jurnal Biologi* 8(1):32-39.
- Sugiyarto L dan Paramita CK. 2014. Pengaruh 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) dan Benzyl Aminopurin (BAP) terhadap Pertumbuhan Kalus Daun Binahong (*Anredera cordifolia* L.) serta Analisis

Kandungan Flavonoid Total. *Jurnal Penelitian Saintek* 19(1) : 23-30.

- Wardani D, Solichtun P dan Setiawan AD. 2004. Pertumbuhan Dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* gaer Pada Variasi Penambahan 2,4 -D Dan Kinetin . *Biofarmasi* 2(1):35-43.
- Wayastuti DE, Setyobudi L, dan Wardiyanti T. 2017. Pengaruh Tingkat Konsentrasi 2,4-D Dan Bap Pada Media Ms Terhadap Induksi Kalus Embriogenik Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Jurnal Produksi Tanaman* 5(1) :140-149.
- Yelnitas. 2012. Pembentukan Kalus Remah Dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (miq)mkurz). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan* 6:181-194.
- Yelnititis. Yuliani S, dan Syahid SF. 1998. Induksi senyawa alkaloid pada tanaman kemukus (*Piper cubeba* L.) Melalui kultur jaringan. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat.
- Yokosuka A, Mimaki Y dan Sashida Y. 2002. Steroidal and Pregnane Glycosides from the Rhizomes of *Tacca chantrieri*. *Journal National Product* 65 : 1293-1298.
- Zhang L, Li HT, Gao LM, Yang JB, Li DZ , Cannon CH, Chen J, dan Li Qi. 2011. Phylogeny and evolution of bracts and bracteoles in *Tacca* (Dioscoreaceae). *J. Integr. Plant Biology* 1(1)..
- Zhang L, Barrett SCH, Gao JY, Chen J , Cole WW, Liu Y, Bai ZL, dan Li QJ. 2005. Predicting mating patterns from pollination syndromes: the case of "sapromyophily" in *Tacca chantrieri* (Taccaceae). *American Journal of Botany* 92(3): 517-524.
- Zulkarnain. 2009. Kultur Jaringan Tanaman: Solusi Perbanyak Tanaman Budidaya. Bumi Aksara. Jakarta.