

Scientific Article

INDUKSI DAN PERTUMBUHAN KALUS DARI HIPOKOTIL GAHARU (*Aquilaria malaccensis* Lam.) PADA MEDIA MURASHIGE SKOOG DENGAN PENAMBAHAN 2,4-DIKLOROFENOKSIASETAT (2,4-D) DAN KINETIN

*Induction and growth of callus from agarwood hypocotyl (*Aquilaria malaccensis* Lam.) with additional 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin*

Edi Fitriandi, Zulfa Zakiah*, Siti Ifadatin

Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura
Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Pontianak, Kalimantan Barat 78124

Informasi Artikel

Diterima/Received : 29 Agustus 2022
Disetujui/Accepted : 30 Agustus 2023
Diterbitkan/Published : 30 Agustus 2023

*Koresponden E-mail :
zulfa.zakiah@gmail.com

DOI: [10.55981/bkr.2023.1380](https://doi.org/10.55981/bkr.2023.1380)

Cara mengutip

Fitriandi E, Zakiah Z, Ifadatin S. 2023. Induksi dan pertumbuhan kalus dari hipokotil gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) pada media murashige skoog dengan penambahan 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-d) dan kinetin. Buletin Kebun Raya 26(2): 106–113.
DOI: [10.55981/bkr.2023.1380](https://doi.org/10.55981/bkr.2023.1380)

Kontributor

Kontributor Utama/Main author:

Edi Fitriandi
Zulfa Zakiah
Siti Ifadatin

Kontributor Anggota/Author member:

-

Keywords: 2,4-Dichlorophenoxyacetic, agarwood, callus, hypocotyl, kinetin

Kata Kunci: 2,4-Diklorofenoksi asetat, gaharu, hipokotil, kalus, kinetin

Abstract

Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) is one of the non-timber forest product commodities producing secondary metabolites in the form of gaharu oil. It contains chromone compounds and contains resin or mastic which produces a fragrant smell, so it is used as a raw material for the cosmetic to the perfume industry. Conservation to multiply and produce gaharu secondary metabolites can be carried out using in vitro culture through callus culture. The study aimed to determine the effect of adding 2,4-D and kinetin to the Murashige Skoog medium on callus induction and growth of gaharu hypocotyls. The study used a completely randomized design (CRD) factorial with two treatment factors, namely 2,4-D concentrations (0, 0.022, 0.111, 0.221 mg/L) and kinetin concentrations (0, 0.022, 0.108, 0.215 mg/L). Parameters observed were callus appearance time (DST), percentage of explants forming callus (%), callus color and texture, wet weight and dry weight of callus (g). The results showed that all explants formed callus (100%), single 2,4-D treatment significantly affected callus appearance time from gaharu hypocotyl explants. The fastest mean time for callus appearance was shown in the addition of 0.221 mg/L 2,4-D without kinetin, which was 13.17 days after planting (DAP). The single 2,4-D treatment and the combination of 2,4-D and kinetin significantly affected the average callus dry weight. The highest average callus dry weight was in the combination treatment of 0.111 mg/L 2,4-D + 0.108 mg/L kinetin. The 2,4-D and kinetin treatments had no significant effect on the wet weight of the callus.

Abstrak

Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) adalah salah satu komoditas hasil hutan bukan kayu penghasil metabolit sekunder dalam bentuk minyak gaharu. Minyak tersebut mengandung senyawa *chromone* dan kandungan resin atau damar wangi yang menghasilkan bau harum, sehingga digunakan sebagai bahan baku industri kosmetik, hingga industri parfum. Konservasi dengan tujuan perbanyakan dan produksi metabolit sekunder gaharu dapat dilakukan menggunakan kultur *in vitro* melalui kultur kalus. Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh penambahan 2,4-D dan kinetin pada media *Murashige Skoog* terhadap induksi dan pertumbuhan kalus dari hipokotil gaharu. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan 2 faktor perlakuan yaitu konsentrasi 2,4-D (0, 0,022, 0,111, 0,221 mg/L) dan konsentrasi kinetin (0, 0,022, 0,108, 0,215 mg/L). Parameter yang diamati yaitu waktu muncul kalus (hst), persentase eksplan membentuk kalus (%), warna dan tekstur kalus, bobot basah dan bobot kering kalus (g). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua eksplan membentuk kalus (100%), perlakuan 2,4-D tunggal memberikan pengaruh nyata terhadap waktu muncul kalus dari eksplan hipokotil gaharu. Rerata waktu muncul kalus tercepat ditunjukkan pada penambahan 0,221 mg/L 2,4-D tanpa kinetin yaitu 13,17 hari setelah tanam (hst). Perlakuan 2,4-D tunggal, kombinasi 2,4-D dan kinetin memberikan pengaruh nyata terhadap rerata bobot kering kalus. Rerata bobot kering kalus tertinggi pada perlakuan kombinasi 0,111 mg/L 2,4-D + 0,108 mg/L kinetin. Perlakuan 2,4-D dan kinetin tidak memberikan pengaruh nyata terhadap bobot basah kalus.

PENDAHULUAN

Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) merupakan komoditas hasil hutan bukan kayu (HHBK) penghasil resin (gubal) beraroma harum dan bernilai ekonomi tinggi. Menurut Pasaribu et al. (2015), senyawa sesquiterpena sebagai komponen minyak atsiri dan chromone yang terkandung dalam resin gaharu berindikasi kuat menyebabkan aroma harum, sehingga digunakan sebagai bahan pelengkap wewangian yang digunakan dalam industri parfum serta bahan pembuatan kosmetik. Selain itu, daun, kulit batang, dan akar gaharu juga dimanfaatkan sebagai bahan obat-obatan untuk asam urat, diabetes, stroke, dan bahan pengobatan malaria (Rosjadi 2017).

Indonesia adalah salah satu negara penghasil gaharu di dunia. Produksi gaharu Indonesia pada tahun 2020 sekitar 21,40 ton (Badan Pusat Statistik 2021). Sebagian besar gaharu tersebut diperoleh dari gaharu alam. Gaharu dieksploitasi untuk mendapatkan produk metabolit sekundernya berupa resin. Resin gaharu terbentuk sebagai respons pertahanan pohon gaharu terhadap berbagai gangguan seperti pelukaan, infeksi patogen, atau perlakuan senyawa kimia (Ng et al. 1997). Pengambilan metabolit sekunder pohon gaharu di alam dilakukan dengan menebang atau mencabut (merusak) pohon dewasa secara spekulatif (Azwin 2016). Hal tersebut menyebabkan *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES) (1994) menetapkan tumbuhan penghasil gaharu jenis *Aquilaria* spp., *Gonystylus* spp., dan *Gyrinops* spp. termasuk dalam kategori Appendix II yang keberadaannya harus diperhatikan karena populasi yang menurun akibat penjualan kayu gaharu yang tidak terkontrol (Barden et al. 2000). Produk yang dihasilkan berupa resin merupakan salah satu bentuk metabolit sekunder gaharu, jika terus menerus dieksploitasi akan menyebabkan kepunahan gaharu. Untuk mengatasi kondisi tersebut, salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk memperbanyak ataupun mendapatkan produk metabolit sekunder gaharu adalah dengan kultur *in vitro* melalui kultur kalus.

Kalus adalah kumpulan sel-sel amorf yang dihasilkan dari pembelahan sel secara terus menerus. Pembelahan sel pada kalus dipacu oleh hormon endogen dan zat pengatur tumbuh (ZPT) eksogen yang ditambahkan pada medium kultur (Suaib & Sadimantara 2014). Menurut Bustami (2011), keberhasilan kultur jaringan khususnya kultur kalus ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu komposisi ZPT, sumber eksplan, dan jenis tanaman. Neumann et al. (2009) menjelaskan bahwa ZPT yang umum digunakan untuk menginduksi kalus ialah auksin dan sitokinin. Jenis auksin yang sering digunakan adalah 2,4-D (*Dichlorophenoxyacetic acid*), karena 2,4-D sangat efektif merangsang pembelahan sel dan bersifat

lebih stabil dibandingkan jenis auksin lainnya, sedangkan sitokinin yang sering digunakan adalah kinetin. Jika perbandingan auksin dan sitokinin seimbang, maka eksplan akan membentuk kalus (Indriani et al. 2016). Menurut Leksonowati et al. (2017), kombinasi perlakuan 1-2 mg/L 2,4-D dan BA dengan konsentrasi rendah (0,1-0,3 mg/L) dapat menginduksi pembentukan kalus yang tinggi (>80%) dari eksplan potongan daun dan ruas batang *A. malaccensis* dan menghasilkan kalus bertekstur remah.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menginduksi kalus dari berbagai jenis gaharu. Wahyuni et al. (2020) menunjukkan bahwa penambahan 3,0 ppm NAA + 0,5 ppm BAP merupakan perlakuan terbaik untuk menginduksi kalus dari daun gaharu (*A. malaccensis*). Rosjadi (2017) melaporkan bahwa penambahan 2 ppm 2,4-D dapat menginduksi kalus gaharu *Gyrinops verstepgii* lebih cepat yaitu 14 hari setelah tanam (hst) dengan berat basah kalus yaitu 0,47 g pada hari ke 28 dan 1,48 g pada hari ke 56, tekstur kalus yang remah dan berwarna kuning. Saikia et al. (2013) menunjukkan bahwa waktu muncul kalus tercepat pada kultur daun dan nodus batang *A. malaccensis* asal India adalah media MS dan WPM dengan penambahan 2 mg/L 2,4-D dan 0,1 mg/L kinetin yaitu 14 hst. Penelitian induksi kalus dari hipokotil gaharu menggunakan kombinasi 2,4-D dan kinetin belum pernah dilakukan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan 2,4-D dan kinetin terhadap induksi dan pertumbuhan kalus gaharu (*A. malaccensis*). Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan alternatif jenis eksplan dan kombinasi ZPT untuk produksi kalus gaharu secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, UPT Laboratorium Terpadu Universitas Tanjungpura dan Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura, Pontianak. Penelitian dilakukan dari bulan November 2021 hingga Maret 2022.

Rancangan penelitian

Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial 2 faktor. Faktor pertama konsentrasi 2,4-D dengan 4 taraf perlakuan (0, 0,022, 0,111, dan 0,221 mg/L), dan faktor kedua konsentrasi kinetin dengan 4 taraf perlakuan (0, 0,022, 0,111, dan 0,221 mg/L). Masing-masing perlakuan terdiri atas 6 pengulangan dan diperoleh sebanyak 96 unit percobaan.

Tahapan penelitian

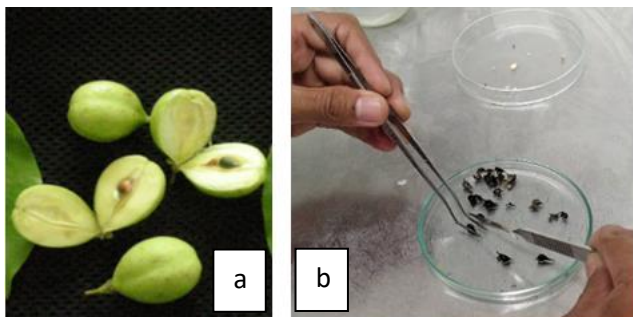
Tahapan penelitian yang dilakukan adalah pembuatan media, persiapan bahan tanaman, sterilisasi dan perkecambahan biji, penanaman eksplan, subkultur kalus, pengamatan dan pengukuran parameter, serta analisis data.

Pembuatan media

Larutan stok ZPT 2,4-D dan kinetin dibuat dengan konsentrasi 200 mg/L sebanyak 100 mL. Pembuatan media MS dilakukan dengan melarutkan 30 g/L glukosa dengan akuades di dalam gelas beaker dan mencampurkan dengan semua larutan stok serta agar-agar yang telah dipanaskan, selanjutnya dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Media MS yang sudah homogen ditambahkan ZPT sesuai kombinasi dan konsentrasi perlakuan 2,4-D (0, 0,022, 0,111, dan 0,221 mg/L) dan kinetin (0, 0,022, 0,108, dan 0,215 mg/L). Tingkat keasaman media diukur dengan menggunakan kertas pH, dan diatur tingkat keasaman untuk mendapatkan pH media 5,6-5,8. Selanjutnya media dituang ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 25 mL perbotol lalu ditutup rapat dan disterilisasikan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah steril disimpan pada ruang inkubasi pada suhu sekitar $\pm 25^\circ\text{C}$.

Persiapan bahan tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah buah gaharu yang diperoleh dari pohon yang tumbuh sekitar Kota Pontianak. Buah yang digunakan adalah buah yang belum matang (Gambar 1).



Gambar 1. Bagian tumbuhan gaharu *A. malaccensis* yang digunakan: (a) buah, (b) biji gaharu

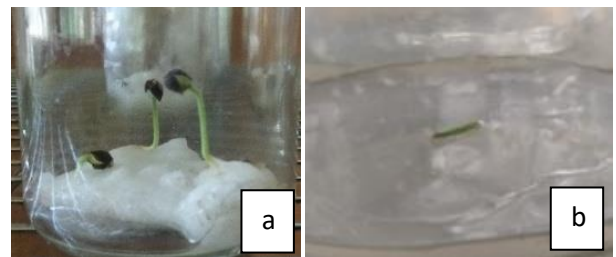
Sterilisasi dan Perkecambahan biji

Perkecambahan biji gaharu menggunakan media kapas basah steril. Buah gaharu dicuci dengan air dan detergen lalu dibilas di air mengalir selama 30 menit, selanjutnya dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali (Mariamah 2017). Proses sterilisasi selanjutnya dilakukan di dalam Laminar Air Flow Cabinet. Permukaan buah disterilisasikan secara berturut-turut dengan Bayclin bertingkat (15, 10, dan 5%) masing-masing 5 menit (Ginting 2018), dan buah dibilas 3x dengan akuades steril

masing-masing 3 menit. Tahapan selanjutnya adalah buah gaharu dicelupkan ke dalam alkohol 70%, kemudian dilewatkan di atas Bunsen (Gultom et al. 2012). Buah yang sudah steril diambil bijinya ditanam pada media kapas basah steril, setiap botol diisi sebanyak 3-4 biji sehingga diperlukan 100 buah gaharu yang disterilisasikan. Kemudian ditutup dengan plastik steril lalu disimpan di rak inkubasi dengan suhu $\pm 25^\circ\text{C}$ selama 14 hari.

Penanaman eksplan

Eksplan berupa hipokotil dari kecambah gaharu berumur 14 hari (Gambar 2) dipotong dengan ukuran 1 cm. Selanjutnya ditanam dalam botol kultur yang berisi media perlakuan induksi kalus, setiap botol ditanami satu potong hipokotil.



Gambar 2. Kecambah gaharu: (a) kecambah berumur 14 hari yang digunakan sebagai sumber eksplan, (b) eksplan hipokotil gaharu

Subkultur kalus

Subkultur dilakukan dengan cara memindahkan hipokotil yang telah menunjukkan respons berupa kalus ke media baru dengan kombinasi perlakuan yang sama. Subkultur dilakukan sebanyak 2x, yaitu saat kultur berumur 28 hari setelah tanam (hst) dan 56 hst.

Pengamatan mulai dilakukan sehari setelah penanaman sampai kultur berumur 84 hst. Parameter yang diamati berupa persentase eksplan membentuk kalus (%), waktu muncul kalus (hari), warna dan tekstur kalus, bobot basah kalus (g), dan bobot kering kalus (g).

Analisis data

Data dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan jika menunjukkan beda nyata dilanjutkan dengan Uji Duncan pada taraf kepercayaan 95% (Sholeh 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase eksplan membentuk kalus dan waktu muncul kalus

Eksplan hipokotil yang ditanam mulai memperlihatkan respons pada kultur berumur 8 hst yaitu terjadinya pembengkakan pada bagian pinggir eksplan hipokotil yang terluka. Respon awal eksplan berupa pembengkakan diduga terjadi karena proses pembesaran sel yang dipengaruhi oleh ZPT endogen di dalam eksplan

dan ZPT eksogen yang ditambahkan ke dalam media. Keberadaan auksin endogen dan eksogen memengaruhi pemanjangan sel dengan mengubah plastisitas dinding sel yang dapat menyebabkan pembesaran sel. Lizawati (2012) menyatakan pembentukan kalus diawali dengan terjadinya pembengkakan pada permukaan eksplan dan terlihat pada bagian eksplan yang terluka. Menurut Sari et al. (2018), pembengkakan dan pemanjangan yang terjadi pada eksplan berhubungan erat dengan penyerapan nutrisi dari medium oleh eksplan. Munculnya kalus pada bagian yang terluka merupakan respons jaringan untuk memperbaiki kerusakan akibat perlukaan. Mathew et al. (2021) menjelaskan bahwa kalus merupakan massa sel parenkim yang berproliferasi dan tidak berdiferensiasi dapat diinduksi pada organ dan jaringan yang terbentuk sebagai respons terhadap luka pada tanaman.

Eksplan hipokotil yang di kultur pada media kontrol dan media dengan berbagai kombinasi 2,4-D dan kinetin mampu membentuk kalus dengan persentase sebesar 100% (Tabel 1). Persentase eksplan yang membentuk kalus lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian Saikia et al. (2013), yaitu 73% (eksplan daun muda) dan 70% (eksplan nodus batang) dari kultur *A. malaccensis* pada media MS dengan perlakuan kombinasi 2 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L kinetin.

Tabel 2. Rerata waktu muncul kalus (hst) kultur hipokotil gaharu pada media MS dengan penambahan kombinasi 2,4-D dan kinetin

2,4-D (mg/L)	Rerata waktu muncul kalus (hari)				Rerata
	Kinetin (mg/L)				
	0	0,022	0,108	0,215	
0	24,83 ± 1,60	24,83 ± 1,47	24,83 ± 1,47	25,33 ± 1,37	24,96 ^B
0,022	13,17 ± 1,17	13,33 ± 1,21	13,50 ± 1,38	13,33 ± 4,13	13,33 ^A
0,111	14,50 ± 1,38	13,00 ± 1,10	14,00 ± 1,26	14,67 ± 4,23	14,04 ^A
0,221	13,33 ± 1,03	13,33 ± 1,21	13,00 ± 0,63	13,00 ± 0,63	13,17 ^A
Rerata	16,45	16,12	16,33	16,58	

Perlakuan kontrol dan semua perlakuan konsentrasi kinetin tanpa pemberian 2,4-D menunjukkan waktu muncul kalus yang lebih lama dibandingkan perlakuan lainnya dengan rerata waktu muncul kalus 24,96 hst (Tabel 2). Pada perlakuan 2,4-D tunggal, rerata waktu muncul kalus lebih cepat, namun hasil ini tidak berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 2,4-D tunggal lainnya. Hasil tersebut menunjukkan bahwa induksi kalus gaharu dari eksplan hipokotil dapat terjadi tanpa penambahan ZPT eksogen. Hal ini menggambarkan kandungan auksin dan sitokinin endogen jaringan hipokotil telah cukup untuk merangsang pembentukan kalus. Hasil ini bertolak belakang dengan hasil penelitian Siti Nur Adila & Nor Azma (2021) yang menyatakan bahwa kombinasi 2,4-D dengan ZPT lain atau 2,4-D secara

Tabel 1. Rerata persentase eksplan membentuk kalus (%) kultur hipokotil gaharu pada media MS dengan penambahan kombinasi 2,4-D dan kinetin

2,4-D (mg/L)	Rerata persentase eksplan membentuk kalus (%)			
	Kinetin (mg/L)			
	0	0,022	0,108	0,215
0	100	100	100	100
0,022	100	100	100	100
0,111	100	100	100	100
0,221	100	100	100	100

Kalus pada semua perlakuan mulai terbentuk antara 13,00-25,33 hst. Berdasarkan hasil analisis sidik ragam (ANOVA), perlakuan konsentrasi 2,4-D tunggal berpengaruh nyata terhadap waktu muncul kalus, namun perlakuan konsentrasi kinetin tunggal dan perlakuan kombinasi tidak berpengaruh nyata. Waktu muncul kalus tercepat ditunjukkan oleh perlakuan 0,221 mg/L 2,4-D tunggal dengan rerata waktu muncul kalus 13,17 hst (Tabel 2). Waktu muncul kalus pada penelitian ini lebih cepat dibanding hasil penelitian Saikia et al. (2013) yang menggunakan eksplan nodus batang dengan waktu muncul kalus 14 hst pada perlakuan 2 mg/L 2,4-D + 0,1 mg/L kinetin. Konsentrasi 2,4-D yang digunakan pada penelitian ini (Tabel 1 dan 2) lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi 2,4-D pada penelitian Saikia et al. (2013).

tunggal dapat menginduksi kalus pada *Oryza sativa*, namun pada perlakuan kontrol tidak terbentuk kalus.

Waktu induksi kalus terjadi lebih cepat jika ke dalam media ditambahkan ZPT eksogen berupa 2,4-D dan kinetin (Tabel 2). Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi 2,4-D dan kinetin eksogen akan memengaruhi rasio konsentrasi auksin dan sitokinin endogen menjadi berimbang sehingga dapat memicu pembentukan kalus yang cepat. Menurut Rahayu et al. (2003), auksin dan sitokinin yang ditambahkan ke dalam media dengan konsentrasi yang tepat akan mengatur arah dan kecepatan respons pertumbuhan jaringan eksplan. Selanjutnya Ariati (2012) menjelaskan bahwa untuk dapat memunculkan kalus, perlu adanya keseimbangan auksin dan sitokinin. Penggunaan auksin dan sitokinin secara tunggal maupun dalam bentuk kombinasi dapat memicu

induksi kalus, proliferasi atau percepatan pertumbuhan. Simanungkalit (2022) menjelaskan bahwa induksi kalus tercepat dari eksplan daun gaharu terdapat pada kombinasi 2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP yaitu 17 hst.

Pada semua perlakuan konsentrasi 2,4-D tanpa kinetin memperlihatkan waktu muncul kalus yang lebih cepat dibandingkan kontrol (Tabel 2). Kondisi ini menunjukkan bahwa penambahan 2,4-D secara tunggal pada kultur hipokotil gaharu dapat mempercepat waktu induksi kalus. Hal ini diduga terjadi karena eksplan yang digunakan berupa hipokotil merupakan organ yang mengandung jaringan meristematik. Menurut Neumann *et al.* (2009), pertumbuhan eksplan yang mengandung jaringan meristematik dapat diinduksi pada media tanpa ZPT, namun pertumbuhan dapat ditingkatkan dengan penambahan auksin eksogen. Hasil penelitian Ramanta

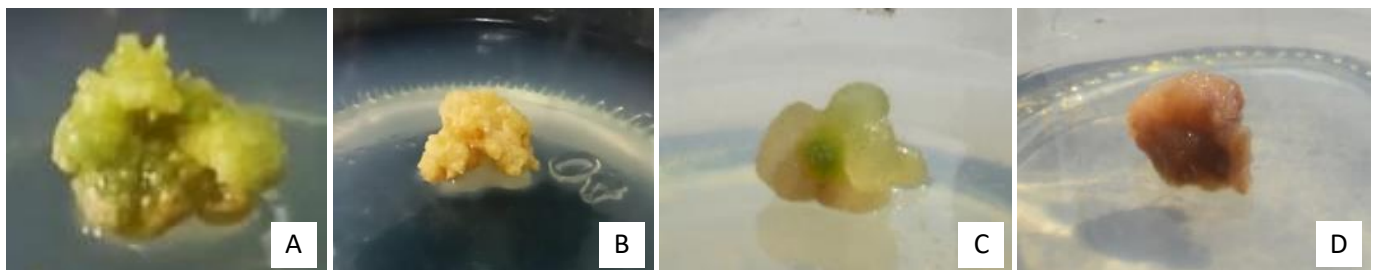
(2018) menjelaskan kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis*) dapat diinduksi dengan perlakuan tunggal 1,5 ppm 2,4-D dan menghasilkan waktu muncul kalus tercepat dengan rata-rata 17,4 hst dengan tekstur kalus kompak. Selanjutnya Satria *et al.* (2019) menunjukkan bahwa parameter waktu muncul kalus dari eksplan daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) tercepat adalah 15,33 hst, dengan pemberian 1 ppm 2,4-D secara tunggal.

Tekstur dan warna kalus

Berdasarkan hasil pengamatan, tekstur kalus yang terbentuk pada setiap perlakuan umumnya bertekstur kompak. Warna kalus yang terbentuk bervariasi yaitu warna putih, kehijauan, kuning, dan cokelat (Tabel 3, Gambar 2).

Tabel 3. Warna dan tekstur kalus kultur hipokotil gaharu pada media MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin berumur 84 hst

2,4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)							
	0		0,022		0,108		0,215	
	warna	tekstur	warna	tekstur	warna	tekstur	warna	tekstur
0	Kehijauan (66,7%) Putih (16,7%) Kuning (16,7%)	Kompak	Kehijauan (33,3%) Cokelat (33,3%) Kuning (33,3%)	kompak	Cokelat (100%)	Kompak	Putih (16,7%) Kehijauan (33,3%) Cokelat (50%)	Kompak
0,022	Kehijauan Kuning Cokelat	Kompak	Kehijauan putih cokelat	Kompak	Kehijauan Putih cokelat	Kompak	Kehijauan Kuning cokelat	Kompak
0,111	Cokelat Putih kuning	Kompak	Kehijauan putih Kuning cokelat	Kompak	Kehijauan Kuning Putih	Kompak	Kehijauan Kuning Putih Cokelat	Kompak
0,221	Kehijauan Kuning cokelat	kompak	cokelat	Kompak	Kehijauan Putih Kuning cokelat	kompak	Kehijauan Kuning cokelat	Kompak



Gambar 2. Warna dan tekstur kalus kultur hipokotil gaharu pada media MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin berumur 84 hst: (A) kehijauan (0,022 mg/L 2,4-D + 0,215 mg/L kinetin), (B) kuning (0,111 mg/L 2,4-D + 0,022 mg/L kinetin), (C) cokelat (0,221 mg/L 2,4-D + 0,022 mg/L kinetin), dan (D) putih (0,221 mg/L 2,4-D + 0 mg/L kinetin)

Warna kalus yang berbeda diduga terjadi karena pengaruh sitokinin endogen kalus atau interaksi ZPT endogen dengan ZPT eksogen terutama kinetin yang ditambahkan ke dalam media. Warna kalus kehijauan menunjukkan adanya kandungan klorofil di dalam kalus.

Menurut Cortleven & Smulling (2015), sitokinin berperan dalam perkembangan kloroplas. Kloroplas berkembang dari proplastid yang ada di dalam sel meristematik. Selain sitokinin, cahaya merupakan faktor yang memengaruhi terbentuknya warna hijau pada kalus. Menurut Taiz &

Zeiger (2010), klorofil disintesis melalui reaksi enzimatik dari asam glutamat dan tahap sintesisnya juga dipengaruhi oleh cahaya. Siddique & Islam (2015) menjelaskan bahwa pada kondisi cahaya sel-sel pada kultur kalus akan membentuk pigmen fotosintetik, sehingga mampu menghasilkan karbohidrat dan metabolik lainnya yang diperlukan oleh sel untuk pertumbuhannya. Penelitian Setiawati *et al.* (2020) juga menghasilkan kalus berwarna hijau pada kultur kalus *Chrysanthemum morifolium* pada media MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin.

Warna kalus putih dan kekuningan menunjukkan bahwa konsentrasi sitokinin yang diberikan belum mampu memengaruhi perkembangan proplastid membentuk kloroplas. Ariati *et al.* (2012) menjelaskan bahwa kalus yang berwarna putih dan kekuningan merupakan kalus yang berkembang dengan baik dan aktif mengalami

pembelahan sel. Saikia *et al.* (2013) melaporkan bahwa penambahan konsentrasi 2,4-D yang tinggi dan konsentrasi kinetin yang rendah pada media MS yang diinkubasi pada kondisi gelap menghasilkan kalus gaharu (*A. malaccensis*) berwarna putih dengan tekstur kompak. Hal ini sebanding dengan hasil penelitian yang diperoleh bahwa konsentrasi 0,221 mg/L 2,4-D + 0,108 mg/L kinetin membentuk kalus berwarna putih, kuning dan hijau. Menurut Purba *et al.* (2017), warna putih pada kalus merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, namun memiliki kandungan butir pati yang tinggi.

Bobot basah dan bobot kering kalus

Hasil pengamatan dan pengukuran pertumbuhan kalus berupa rerata bobot basah dan bobot kering kalus ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Rerata bobot basah (BB) dan bobot kering (BK) kalus gaharu pada media MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin berumur 84 hst

2,4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)							
	0		0,022		0,108		0,215	
	BB	BK	BB	BK	BB	BK	BB	BK
0	0,113± 0,098	0,011± 0,004 ^a	0,260± 0,157	0,020± 0,025 ^{abc}	0,148± 0,138	0,019± 0,005 ^{abc}	0,122± 0,102	0,010± 0,005 ^a
0,022	0,250± 0,102	0,040± 0,041 ^{abc}	0,138± 0,073	0,018± 0,015 ^{abc}	0,235± 0,046	0,031± 0,053 ^{abc}	0,339± 0,239	0,110± 0,146 ^{bc}
0,111	0,145± 0,110	0,018± 0,018 ^{ab}	0,155± 0,150	0,021± 0,010 ^{abc}	0,188± 0,166	0,116± 0,152 ^c	0,115± 0,062	0,016± 0,007 ^a
0,221	0,168± 0,191	0,012 ± 0,011 ^a	0,204± 0,096	0,023± 0,017 ^{abc}	0,258± 0,154	0,020± 0,009 ^{abc}	0,178± 0,075	0,015± 0,011 ^a

Penambahan 2,4-D dan kinetin tidak berpengaruh nyata terhadap rerata bobot basah kalus gaharu, namun berpengaruh nyata terhadap bobot kering kalus (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi 2,4-D dan sitokinin mampu membentuk perimbangan dengan ZPT endogen, sehingga dapat memengaruhi pembesaran sel kalus. Pembesaran sel dapat disebabkan karena pengaruh 2,4-D yang dapat meningkatnya permeabilitas sel terhadap air sehingga air dan nutrisi di dalam media akan berdifusi masuk ke dalam sel dan menyebabkan bertambahnya massa sel kalus. Sementara itu, penambahan sitokinin dapat memengaruhi pertumbuhan karena sitokinin berperan dalam memacu pembelahan sel. Menurut Ulva *et al.* (2019), bertambahnya jumlah sel dan pembesaran sel terjadi karena difusi air dari media sehingga akan meningkatkan berat basah kalus. Auksin dapat meningkatkan permeabilitas sel terhadap air yang diikuti menurunnya tekanan dinding sel, sehingga air dapat masuk ke dalam sel yang disertai kenaikan volume sel. Sitokinin dapat memacu pertumbuhan kalus dengan cara meningkatkan pembelahan sel. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Satria *et al.* (2019) yang menyatakan bahwa pemberian 2,4-D tunggal dalam konsentrasi tinggi hanya mampu memberikan respons pembengkakan. Oleh karena itu, perlu penambahan konsentrasi sitokinin yang mampu memacu pembelahan sel lebih cepat. Menurut Massa (2016), auksin dan

sitokinin termasuk hormon yang tepat untuk induksi kalus, dan memberikan rangsangan pada pertumbuhan sel secara cepat. Kombinasi konsentrasi ZPT yang diberikan ke dalam media dapat menciptakan keseimbangan konsentrasi antara auksin endogen dengan sitokinin endogen yang terdapat pada eksplan.

Bobot kering kalus gaharu diukur dengan pengukuran biomassa kalus setelah pengeringan (Tabel 5). Menurut Panglipur *et al.* (2013), pertambahan bobot kering tanaman menandakan bertambahnya protoplasma, yang terjadi akibat bertambahnya ukuran dan jumlah sel serta biomassa. Bobot kering kalus tertinggi terlihat pada perlakuan 0,111 mg/L 2,4-D + 0,108 mg/L kinetin yaitu 0,116 g. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang seimbang menghasilkan biomassa kalus yang lebih besar dibanding perlakuan lainnya. Pertumbuhan kalus yang terjadi menggambarkan kemampuan sel-sel dalam membelah dan meningkatnya bobot kalus karena terjadinya jumlah atau ukuran sel. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian Indriani *et al.* (2016) yang memperoleh rerata bobot kering kalus tertinggi pada perlakuan 2,0 mg/L 2,4-D dan 1,0 mg/L kinetin sebesar 0,024 g pada kalus sambang nyawa (*Gynura procumbens*).

Bobot kering kalus juga disebabkan oleh tekstur kalus yang terbentuk yaitu berupa kalus kompak. Terbentuknya kalus kompak dipengaruhi oleh

penambahan sitokinin pada media kultur yang berperan dalam transpor hara. Menurut Purnamaningsih & Ashrina (2011), sitokinin berperan dalam transpor air dan zat hara, sehingga mempengaruhi potensial osmotik sel. Masuknya sukrosa yang terkandung dalam media kultur ke dalam sel akan menimbulkan tekanan turgor yang terjadi karena perbedaan konsentrasi larutan, sehingga air dan zat hara dari media akan masuk ke dalam sel melalui osmosis dan menyebabkan dinding-dinding sel menjadi kaku, dan membuat kalus menjadi kompak. Menurut Mahadi *et al.* (2016), kalus bertekstur kompak merupakan kalus yang bertekstur keras karena mengalami lignifikasi.

KESIMPULAN

Penambahan 2,4-D dan kinetin tidak berpengaruh nyata terhadap waktu muncul kalus dan bobot basah kalus, namun memberikan pengaruh nyata terhadap bobot kering kalus. Kombinasi perlakuan 0,111 mg/L 2,4-D + 0,108 mg/L kinetin menghasilkan rerata bobot kering kalus tertinggi yaitu 0,116 gram. Warna kalus yang dihasilkan bervariasi yaitu kehijauan, kuning, putih dan cokelat.

Penelitian lanjut perlu dilakukan untuk mengembangkan kultur kalus dengan pertumbuhan optimal untuk produksi metabolit sekunder dengan perlakuan penambahan prekursor/prazat melalui kultur kalus pada media padat atau kultur suspensi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada pihak/masyarakat penanam dan pemilik pohon gaharu di Pontianak sebagai tempat bagi peneliti mendapatkan bahan tanaman berupa buah gaharu yang akan digunakan sebagai sumber eksplan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariati SN. 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): 78-84.
- Astuti M, Suhartanto B, Umami N, Suseno N, Haq MS. 2022. Auxin and cytokinin effect on in vitro callus induction of maize (*Zea mays* L.) srikandi putih. *Biological Science Research* 21(4): 1-5.
- Azwin. 2016. Penggunaan BAP dan TDZ untuk perbanyak tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.). *Jurnal Ilmiah Pertanian* 13(1): 59-69.
- Badan Pusat Statistik. 2021. Statistik Produksi Hutan. BPS Statistik Indonesia, Jakarta.
- Barden A, Awang Anak N, Mulliken T, Song M. 2000. Heart of the Matter: Agarwood Use and Trade, and CITES Implementation for *Aquilaria malaccensis*. TRAFFIC International, Cambridge.
- Bustami MU. 2011. Penggunaan 2,4-D untuk induksi kalus kacang tanah. *Media Litbang Sulteng* 2(4): 137-141.
- Cortleven A, Schmülling T. 2015. Regulation of chloroplast development and function by cytokinin, *Journal of Experimental Botany* 66(16): 4999–5013, <https://doi.org/10.1093/jxb/erv132>
- George EF, Sherrington PD. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetic Ltd., England.
- Ginting BAA. 2018. Pengaruh penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) terhadap perkecambahan dan induksi kalus embrionik tanaman cendana (*Santalum album* L.) secara in vitro. [Skripsi] Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang
- Gultom MS, Anna N, Siregar EBM. 2012. Respon eksplan biji gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) terhadap pemberian IAA secara in vitro. [Skripsi] Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Indriani MD, Manuhara YSW, Utami ESW. 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.
- Leksonowati A, Witjaksono, Ratnadewi D. 2017. Induksi biak kalus dan biak suspensi sel *Aquilaria malaccensis* Lam. *Berita Biologi* 16(1): 1-11.
- Lizawati. 2012. Induksi kalus embriogenik dari eksplan tunas apikal tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan penggunaan 2,4-D dan TDZ. *Bioplantae* 1(2): 75-87.
- Mariamah. 2017. Pertumbuhan kalus tanaman markisa (*Passiflora* sp.) dengan penambahan Naphtalene Acetic Acid (NAA) dan 6-Benzyl Amino Purine (BAP). *Jurnal Protobiont* 6(3): 37-41.
- Mahadi I, Syafi'i W, Sari Y. 2016. Pengaruh Pemberian Hormon 2,4-D dan BAP terhadap pertumbuhan kalus jeruk kasturi [*Citrus microcarpa*]. *Jurnal Biogenesis* 12(2): 99-104.
- Massa GNO. 2016. Pengaruh variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP terhadap induksi dan kandungan senyawa metabolit sekunder kalus sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz dan Pav.). [Skripsi] Universitas Airlangga, Surabaya
- Mathew FA, Rajesh S, Rajagopal B, Chandirakala R. 2021. Studies on factors influencing callus induction in elite groundnut (*Arachis hypogaea*) cultivar TMV (Gn) 13. *Biological Forum* 13(2): 540-545.

- Neumann KH, Kumar A, Imani J. 2009. Plant Cell and Tissue Culture-A Tool in Biotechnology: Basic and Application. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Ng LT, Chang YS, Kadir AA. 1997. A review on agarwood (gaharu) producing *Aquilaria* species. <https://cites.org/eng>.
- Panglipur DB, Sulistyawati L, Muhibuddin A, Hidayah N. 2013. Uji ketahanan kalus kultivar tebu (*Saccharum officinarum* L.) terhadap penyakit pokahbung menggunakan filtrat kultur *Fusarium moniliforme* secara in vitro. Jurnal Hama Penyakit Tumbuhan 1(4): 51-58.
- Pasaribu G, Waluyo TK, Pari G. 2015. Keragaman komponen kimia gaharu pada kelas super dan kemedangan. Jurnal Penelitian Hasil Hutan 33(3): 247-252.
- Purba RV, Yuswanti H, Astawa ING. 2017. Induksi kalus eksplan tanaman anggur (*Vitis vinifera* L.) dengan aplikasi 2,4-D secara in vitro. E-Jurnal Agroteknologi Tropika 6(2): 218-228.
- Purnamaningsih R, Ashrina M. 2011. Pengaruh BAP dan NAA terhadap induksi kalus dan kandungan artemisinin dari *Artemisia annua* L. Berita Biologi 10(4): 481-489.
- Rahayu B, Solichatun, Anggarwulan E. 2003. Pengaruh asam 2,4-Diklorofenoksiasetat acid (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *Acalypha indica* L. Biofarmasi 1(1): 1693-2242.
- Ramanta SS. 2018. Induksi kalus tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) pada beberapa konsentrasi 2,4-D secara in vitro. Universitas Andalas, Padang.
- Rosjadi SH. 2017. Induksi kalus tanaman gaharu (*Grynos verstepii*) menggunakan 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetid acid). [Skripsi] Fakultas Pertanian Universitas Jember, Jember.
- Saikia M, Shrivastava K, Singh SS. 2013. Effect of culture media and growth hormones on callus induction in *Aquilaria malaccensis* Lam., a medicinally and commercially important tree species of north east India. Biological Science 6(2): 96-105.
- Sari YP, Kusumawati E, Saleh C, Kustiawan W, Sukartingsih S. 2018. Effect of sucrose and plant growth regulators on callogenesis and preliminary secondary metabolic of different explant *Myrmecodia tuberosa*. Nusantara Bioscience 10(3): 183–192.
- Satria MT, Neliyati, Jasminarni. 2019. Pengaruh zat pengatur tumbuh 2,4-D (Dichlorophenoxyacetid-Acid) dan kinetin terhadap induksi kalus dari eksplan daun kayu manis (*Cinnamomun burmanii*). Jurnal Agroekoteknologi 2(1): 2621-2846.
- Setiawati T, Ayalla A, Nurzaman M, Kusumaningtyas VA, Bari I. 2020. Analisis metabolit sekunder kultur pucuk, kalus, dan tanaman lapang *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Jurnal Ilmu Dasar 21(1): 1-10.
- Sholeh AZ. 2005. Ilmu Statistika: Pendekatan Teoritis dan Aplikasi Disertai Contoh Penggunaan SPSS, cetakan pertama. Penerbit Rekayasa Sains, Bandung.
- Siddique AB, Islam SMS. 2015. Effect of light and dark on callus induction and regeneration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Bangladesh Journal of Botany 44(4): 643–651.
- Silvina F, Isnaini I, Ningsih W. 2021. Induksi kalus daun binahong merah (*Basella rubra* L.) dengan pemberian 2,4-D dan kinetin. Jurnal Agro 8(2): 274-286.
- Simanungkalit RY. 2022. Pengaruh kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP terhadap induksi kalus eksplan daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.). [Skripsi] Program Studi Kehutanan, Fakultas Pertanian, Universitas Jambi, Jambi.
- Siti Nur Adila H, Nor Azma Y. 2021. Optimization of selected plant growth regulators on callus induction of *Oryza sativa* L. var MR 219. Food Research 5 (Suppl. 4): 38-45.
- Suaib, Sadimantara IGR. 2014. Kultur Jaringan Tanaman. Sulo Printing, Kendari.
- Taiz L, Zeiger E. 2010. Plant physiology. 3rd Edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland MA.
- Ulva M, Nurchayati Y, Prihastanti E, Setiari N. 2019. Pertumbuhan kalus tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) varietas permata F1 dari jenis eksplan dan konsentrasi sukrosa yang berbeda secara in vitro. Life Science 8(2): 160-169.
- Wahyuni A, Satria B, Zainal A. 2020. Induksi kalus gaharu dengan NAA dan BAP secara in vitro. Agrosains: Jurnal Penelitian Agronomi 22(1): 39-44.
- Wardani DP, Solichatun, Setyawan AD. 2004. Pertumbuhan dan produksi saponin kultur kalus (*Talinum paniculatum* Gaertn.) pada variasi penambahan 2,4-D dan kinetin. Biofarmasi 2(1): 35-43.
- Wattimena GA. 1991. Zat pengatur tumbuh. PAU Bioteknologi IPB, Bogor.