

Pengaruh 2,4-D terhadap Pertumbuhan Kalus Daun *Diospyros discolor* Willd pada Media MS secara *in Vitro*

The Effect of 2,4-D on Callus Growth of Diospyros discolor Willd in Media MS in Vitro

Ana Karunia Illahi*, Evie Ratnasari, Sari Kusuma Dewi
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Surabaya

*e-mail: anakarunia.18025@mhs.unesa.ac.id

Abstrak. Bisbul (*Diospyros discolor* Willd) semakin sulit ditemukan dan teknik perbanyakan masih dilakukan secara vegetatif seperti cangkok yang memerlukan waktu lama untuk menjadi bibit. Hal tersebut dapat diatasi dengan cara perbanyakan melalui teknik kultur jaringan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi 2,4-D (*Dichlorophenoxyacetic acid*) terhadap pertumbuhan kalus daun bisbul pada media MS (*Murashige and Skoog*) secara *in vitro*. Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap satu faktor perlakuan yaitu berbagai konsentrasi 2,4-D (0 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, dan 6 mg/l). Penelitian dilakukan lima kali pengulangan sehingga diperoleh 20 unit perlakuan. Data persentase pelengkungan eksplan dan persentase *browning* di analisis secara deskriptif kuantitatif menggunakan uji ANAVA satu arah dilanjutkan uji Duncan taraf 5% dan analisis kualitatif berupa morfologi kalus. Hasil penelitian menunjukkan eksplan daun bisbul konsentrasi 2,4-D 4 mg/l memiliki rata-rata persentase eksplan melengkung tertinggi sebesar 14,00% menunjukkan peubah memiliki pengaruh signifikan dan hasil yang tidak berbeda nyata dengan konsentrasi lainnya, rata-rata persentase *browning* terendah sebesar 4,00% berbeda nyata terhadap 0 mg/l tetapi tidak berbeda nyata pada konsentrasi lainnya. Konsentrasi pada perlakuan 4 mg/l memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan kalus dari eksplan daun bisbul di hari ke-63 dengan morfologi kalus berwarna putih dan bertekstur kompak.

Kata kunci: 2,4-diklorofenoksiasetat; *Diospyros discolor* Willd; murashige dan skoog; kalus

Abstract. Bisbul (*Diospyros discolor* Willd) is getting more difficult to find and its propagation is still carried out using old techniques vegetatively such as grafting which took a long time to become seedlings. This could be overcome by propagation of tissue culture techniques. The aim of this research was to determine the effect of various concentrations of 2,4-D (*Dichlorophenoxyacetic acid*) on callus growth of bisbul leaves on MS (*Murashige and Skoog*) *in vitro*. The research was conducted experimentally using a Completely Randomized Design with one factor was the concentration of 2,4-D (0 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, and 6 mg/l). The research was carried out with five repetition so that it was obtained 20 treatment units. The data of percentage explant curving and the percentage *browning* were analyzed descriptively quantitatively using one way ANOVA test followed by Duncan's test at 5% level and qualitative analysis in the form of callus morphology. The results showed that bisbul leaf explants at a concentration of 2,4-D 4 mg/l had the highest average percentage of curved explants was 14,00% indicating that the variables had a significant effect and the results were not significantly different from other concentrations, the lower average percentage of *browning* was 4,00% significantly different from 0 mg/l but not significantly different at other concentrations. The concentration of 2,4-D 4 mg/l had an effect on callus growth from bisbul leaf explants on day 63 with callus morphology of white colour and non friable texture.

Keywords: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; *Diospyros discolor* Willd; murashige and skoog; callus

PENDAHULUAN

Pengembangan terhadap suatu jenis tanaman adalah salah satu aspek penting dalam produksi bibit. Pada saat ini, tanaman jenis obat memiliki permasalahan untuk penyediaan dan kualitas bibit. Kultur jaringan tanaman termasuk teknik bioteknologi yang dapat digunakan memperbanyak tanaman dan pencarian varietas baru dalam industri hortikultura dan tanaman pangan. Penggunaan kultur sel terhadap produksi metabolit sekunder dari tanaman berkhasiat obat merupakan salah satu perkembangan dari penerapan teknik kultur jaringan (Silalahi, 2015). Keterbatasan metabolit sekunder yang diperoleh dengan cara mengisolasi dari tanaman sebagai sumber bahan baku akan menimbulkan

suatu permasalahan serius. Solusi alternatif dalam mengatasi penyediaan metabolit sekunder yaitu menggunakan teknik kultur jaringan (Yusnita, 2015).

Daerah beriklim tropis merupakan habitat tanaman bisbul (*Diospyros discolor* Willd) untuk tumbuh dan berkembang. Pengalaman empiris di masyarakat, buah bisbul dapat digunakan sebagai obat dalam mengatasi diare dan pertolongan pertama pada luka. Bagian lain dari tanaman bisbul seperti kulit, kayu, daun, dan akar digunakan untuk mengobati penyakit pernapasan dan penyakit kulit termasuk *eczema*. Minyak dari biji bisbul digunakan sebagai obat kumur untuk mengatasi stomatitis (Akter *et al.*, 2015). Buah bisbul memiliki aktivitas biologi seperti antiinflamasi, analgesik, antikanker, antioksidan, sitotoksik, antidiare dan antidiabetes (Setu *et al.*, 2017). Hal tersebut didukung oleh hasil fitokimia yang menunjukkan beberapa senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan steroid ada di dalam daun bisbul (Noviardi *et al.*, 2019). Bisbul merupakan tumbuhan yang tersebar luas pada wilayah hutan dataran rendah dan sedang serta telah dikembangkan oleh negara tropis lainnya. Pohon bisbul memiliki karakteristik yaitu tinggi 7-15 m, diameter batang 50-80 cm. Bisbul bertajuk rimbun menyerupai kerucut dan terkadang bentuknya bulat. Bunganya terdiri dari jantan dan betina memiliki warna putih kekuningan serta memiliki aroma harum. Berdaun tunggal dengan ukuran berkisar 8-30 cm x 2,5-12 cm, helaian daun berbentuk bulat memanjang tersusun berseling, dan memiliki tepi daun yang rata (Putri dan Aprilianti, 2010).

Media kultur *Murashige and Skoog* (MS) adalah faktor pendukung keberhasilan kultur jaringan yang mana terdapat berbagai komponen seperti garam mineral, hormon, sumber karbon, vitamin, dan asam amino (Wardani, 2016). Perangsang pertumbuhan tanaman menggunakan berbagai macam zat pengatur tumbuh berupa auksin dan sitokinin. Penyebab terjadinya perpanjangan sel merupakan salah satu fungsi dari senyawa auksin. Menurut Mahadi *et al.* (2016) proses pemanjangan sel oleh auksin dimulai dari masuknya auksin ke dalam sitoplasma yang mempengaruhi protein dalam membran dan menyebabkan ion H⁺ terpompa menuju dinding sel. Ion H⁺ mengakibatkan peningkatan pH menjadi asam dan menyebabkan teraktivasinya enzim yang akan memutuskan ikatan silang hidrogen rantai molekul selulosa penyusun dinding sel. Akibatnya, sel mengalami kelenturan di mana air masuk ke dalam sel melalui osmosis sehingga sel bertambah panjang. 2,4-D merupakan salah satu jenis auksin yang dapat digunakan untuk menginduksi kalus (Parmana, 2015). Menurut Robles-Martinez *et al.* (2016) auksin 2,4-D bisa digunakan untuk meningkatkan pertumbuhan kalus, tekanan osmotik, permeabilitas sel terhadap air, plastisitas, dan pengurangan tekanan dinding sel.

Kultur jaringan pada tanaman bisbul perlu dilakukan karena tumbuhan ini semakin sulit ditemukan. Selain itu, teknik perbanyak benih yang dilakukan masih secara vegetatif seperti pencangkokan, sambung mata, atau sambung pucuk yang mana memerlukan waktu 24 hari bahkan lebih untuk menjadi bibit (Etty, 2018). Penelitian sebelumnya oleh Kochanová *et al.* (2011) hasil tunas adventif yang berhasil diproduksi kultivar kesemek Hachiya (*Diospyros kaki* Thunb) melalui teknik kultur jaringan pada media MS dengan 5 µmol l⁻¹ BAP dan 1 µmol l⁻¹ IBA. Penelitian oleh Sugiura *et al.* (2008) pada tanaman kesemek (*Diospyros kaki* Thunb) pemberian ZPT 2,4-D dan BA pada 3 dan 10 µM lebih efektif digunakan daripada IAA dan zeatin dalam pembentukan kalus dan embriogenesis. Berdasarkan permasalahan tersebut, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi 2,4-D terhadap pertumbuhan kalus daun bisbul (*Diospyros discolor* Willd) dalam media MS.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan selama tiga bulan yaitu mulai bulan Oktober hingga Desember 2021 di Laboratorium Kultur Jaringan C9 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya mengenai pengaruh pemberian berbagai macam konsentrasi 2,4-D terhadap pertumbuhan kalus daun bisbul (*D. discolor* Willd) dalam media MS. Jenis penelitian ini termasuk penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor, yaitu induksi kalus berbagai konsentrasi 2,4-D dalam media MS terdiri dari empat taraf konsentrasi antara lain: 0 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, dan 6 mg/l (Yusuf *et al.*, 1995). Masing-masing konsentrasi terdiri dari lima kali pengulangan dengan total 20 unit percobaan. Prosedur dalam penelitian ini meliputi sterilisasi, pembuatan stok 2,4-D dan media serta inokulasi eksplan.

Alat yang terbuat dari logam dan kaca seperti cawan petri, botol kultur, *beaker glass*, pinset, dan *scalpel* sebelum digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu menggunakan alat berupa autoklaf dengan kondisi suhu 121°C selama 20 menit. Pembuatan media dalam 1 L memerlukan serbuk media MS *instant* 4,43 g, gula 30 g, arang aktif 3 g, agar 8 g, dan akuades. Seluruh bahan dijadikan satu dan ditambahkan 2,4-D sesuai konsentrasi perlakuan (Setiawati *et al.*, 2019). Bahan yang digunakan untuk

kultur jaringan seperti daun bisbul (*D. discolor* Willd) bagian yang muda dibersihkan dari trikoma menggunakan pisau setelah itu, daun direndam bakterisida dan fungisida selama 30 menit (Yuliani *et al.*, 2018).

Inokulasi eksplan dilakukan dalam LAF dengan cara mengambil eksplan daun yang telah disterilisasi menggunakan pinset, kemudian diletakkan pada cawan petri yang berisikan alas kertas saring. Daun bisbul dipotong menggunakan *scalpel* yang telah dipasang mata pisau dengan ukuran eksplan ± 1 cm². Kemudian, eksplan daun ditanam pada botol media perlakuan menggunakan pinset untuk masing-masing botol ditanam sebanyak 2 eksplan. Bagian abaksial daun yang ditanam menyentuh media dan sebelum botol ditutup, bagian mulut botol harus dipanaskan melalui api bunsen untuk mencegah kontaminasi. Setelah itu, botol ditutup menggunakan aluminium foil dan dilapisi plastik PP. Botol kultur dipasang label sesuai tanggal inokulasi dan perlakuan. Kultur tersebut diletakkan pada rak inkubasi dengan kondisi temperatur 18-21°C dan pencahayaan yang cukup (Admojo dan Indrianto, 2016).

Pengamatan kultur eksplan daun bisbul dilakukan setiap hari setelah dimulainya penanaman hingga munculnya kalus. Data dianalisis secara deskriptif kuantitatif dan kualitatif berupa persentase pelengkungan eksplan yang diamati setiap hari setelah tanam hingga terjadi pelengkungan, persentase *browning* eksplan yang mengalami pencoklatan, dan morfologi kalus berdasarkan warna dan tekstur kalus. Rumus yang digunakan untuk menghitung persentase pelengkungan (1) dan persentase *browning* (2) menurut Purba dan Astawa (2017) sebagai berikut:

$$\text{Persentase pelengkungan} = \frac{\text{eksplan yang melengkung}}{\text{eksplan yang ditanam}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Persentase } \textit{browning} = \frac{\text{eksplan yang } \textit{browning}}{\text{eksplan yang ditanam}} \times 100\% \quad (2)$$

Hasil data kemudian dianalisis menggunakan Analisis Varian (ANOVA) satu arah untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi 2,4-D terhadap pertumbuhan eksplan daun bisbul (*D. discolor* Willd) dan dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf 5%.

HASIL

Hasil penelitian menunjukkan bahwa adanya pengaruh dari berbagai konsentrasi 2,4-D terhadap pertumbuhan eksplan daun bisbul (*D. discolor* Willd) yang diamati setiap hari setelah tanam sebelum terbentuknya kalus. Berdasarkan Tabel 1. rata-rata persentase eksplan melengkung memiliki pengaruh signifikan tetapi, pada seluruh konsentrasi menunjukkan peubah mendapatkan hasil yang tidak beda nyata. Rata-rata persentase eksplan melengkung tertinggi yaitu konsentrasi 4 mg/l dan 2 mg/l sebesar 14,00%, sedangkan perlakuan konsentrasi 0 mg/l dan 6 mg/l menunjukkan persentase terendah yaitu 6,00% dan 10,00%. Perolehan perhitungan persentase eksplan melengkung berdasarkan rumus (1). Rata-rata persentase *browning* pada konsentrasi 4 mg/l menunjukkan hasil persentase terendah yaitu 4,00% sedangkan, persentase *browning* tertinggi sebesar 16,00% pada konsentrasi 0 mg/l. *Browning* merupakan salah satu penghambat pertumbuhan eksplan akan tetapi tidak selalu merugikan karena kalus dapat tumbuh pada eksplan yang coklat. Konsentrasi 4 mg/l berbeda nyata terhadap 0 mg/l tetapi tidak berbeda nyata terhadap 2 mg/l dan 6 mg/l. Perhitungan persentase eksplan yang mengalami *browning* dihitung berdasarkan rumus (2).

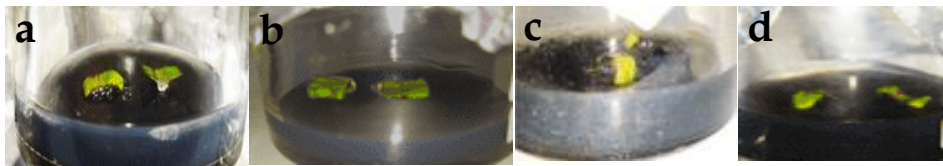
Tabel 1. Pengaruh berbagai macam konsentrasi 2,4-D terhadap rata-rata persentase eksplan daun *D. discolor* Willd melengkung dan *browning*

Konsentrasi	Rata-rata persentase eksplan melengkung (%)	Rata-rata persentase eksplan <i>browning</i> (%)
0 mg/l	6,00±8,944 ^a	16,00±5,477 ^b
2 mg/l	14,00±5,477 ^a	8,00±8,367 ^{ab}
4 mg/l	14,00±8,944 ^a	4,00±5,477 ^a
6 mg/l	10,00±10,000 ^a	12,00±7,947 ^{ab}

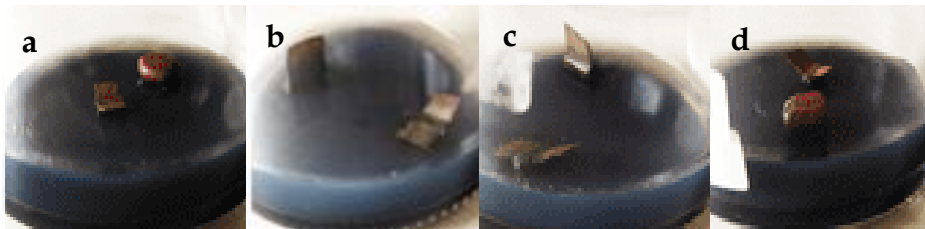
Keterangan : Nilai yang diikuti notasi huruf sama menunjukkan tidak berbeda nyata sedangkan, nilai yang diikuti oleh notasi huruf berbeda menunjukkan adanya beda nyata pada uji Duncan taraf 0,05.

Berdasarkan Gambar 1. masing-masing botol kultur dengan konsentrasi berbeda yang diamati setiap hari menunjukkan perubahan eksplan daun *D. discolor* Willd pada tepi daun yang telah dilukai mengalami pelengkungan mengarah media. Pada hari ke-3 hingga hari ke-8 setelah tanam, eksplan

telihat melengkung secara berurutan yang pertama mulai dari perlakuan konsentrasi 4 mg/l, 2 mg/l, 6 mg/l, dan 0 mg/l.



Gambar 1. Eksplan daun *D. discolor* Willd mengalami pelengkungan (a) konsentrasi 0 mg/l; (b) konsentrasi 2 mg/l; (c) konsentrasi 4 mg/l; dan (d) konsentrasi 6 mg/l (Dokumentasi pribadi, 2021)



Gambar 2. Eksplan daun *D. discolor* Willd mengalami *browning* (a) konsentrasi 0 mg/l; (b) konsentrasi 2 mg/l; (c) konsentrasi 4 mg/l; dan (d) konsentrasi 6 mg/l (Dokumentasi pribadi, 2021)

Berdasarkan Gambar 2. eksplan daun *D. discolor* Willd yang ditanam pada masing-masing botol kultur dengan konsentrasi yang berbeda menunjukkan perubahan dari berwarna hijau menjadi coklat atau kehitaman. Hal tersebut membuat pertumbuhan terganggu dan menyebabkan kematian jaringan. Pencoklatan yang terjadi terkadang tidak selalu merugikan, kalus dapat muncul dari eksplan yang berwarna coklat. Minggu ke-3 sampai minggu ke-6 setelah tanam, eksplan terlihat mengalami *browning* secara berurutan yang pertama mulai dari perlakuan konsentrasi 0 mg/l, 2 mg/l, 6 mg/l, dan 4 mg/l.

Tabel 2. Pertumbuhan kalus eksplan daun *D. discolor* Willd pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi	Saat tumbuhnya kalus (HST)	Morfologi kalus
0 mg/l	-	-
2 mg/l	-	-
4 mg/l	63	Berwarna putih dan bertekstur kompak
6 mg/l	-	-

Berdasarkan Tabel 2. pengamatan saat muncul kalus dilakukan setiap hari dalam satu hingga dua minggu setelah tanam. Eksplan daun yang ditanam pada botol kultur sebanyak 20 unit botol dan masing-masing berisi 2 eksplan. Kalus yang berhasil tumbuh dianalisis secara deskriptif kualitatif berupa morfologi kalus di mana hanya terdapat pada satu eksplan yang tumbuh di hari ke-63 setelah tanam yaitu kalus berwarna putih dan bertekstur kompak (Gambar. 3) dan eksplan lainnya mengalami *browning* serta kontaminasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi 4 mg/l dapat menginduksi kalus eksplan daun bisbul (*D. discolor* Willd).



Gambar 3. Kalus dari eksplan daun *D. discolor* Willd pada konsentrasi 4 mg/l (Dokumentasi pribadi, 2021)

PEMBAHASAN

Eksplan daun bisbul (*D. discolor* Willd) yang ditanam dalam media MS dan ditambahkan 2,4-D pada berbagai konsentrasi efektif menunjukkan pertumbuhan eksplan sebelum munculnya kalus

seperti pelengkungan daun, tetapi yang tumbuh menjadi kalus hanya satu dan terdapat pada perlakuan konsentrasi 4 mg/l. Sedangkan, beberapa eksplan lainnya mengalami *browning* dan kontaminasi. Bagian tanaman yang bersifat meristematis seperti daun muda, ketika dilukai sel-sel akan mengalami pembelahan dan membentuk kumpulan sel *amorphous* yang disebut kalus. Keberhasilan kultur jaringan dalam menumbuhkan kalus salah satunya dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh yang sesuai karena memiliki sifat berupa mendukung, menghambat, ataupun merubah proses fisiologi tumbuhan. Pembentukan kalus melalui tiga tahap perkembangan yaitu induksi, pembelahan sel, dan diferensiasi sel (Sinaulan *et al.*, 2019).

Pelengkungan merupakan salah satu respon adanya pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh sebagai ciri perkembangan eksplan sebelum terbentuknya kalus (Wahyuni *et al.*, 2014). Dari penelitian yang dilakukan eksplan daun yang telah dilukai mengalami pelengkungan ke arah media (Gambar 1). Rata-rata persentase eksplan melengkung tertinggi yaitu konsentrasi 4 mg/l dan 2 mg/l sebesar 14,00%, sedangkan perlakuan konsentrasi 0 mg/l dan 6 mg/l menunjukkan persentase terendah yaitu 6,00% dan 10,00% (Tabel 1). Pada uji Duncan taraf 5% rata-rata persentase eksplan melengkung memiliki pengaruh signifikan tetapi, pada seluruh konsentrasi menunjukkan peubah mendapatkan hasil yang tidak beda nyata. Hal tersebut dikarenakan adanya perbedaan jumlah konsentrasi yang diberikan dan menyebabkan pelengkungan di beberapa perlakuan tidak optimal (Dwipayana *et al.*, 2016). Pelengkungan merupakan suatu respon sel yang terletak di bagian permukaan bawah eksplan daun mengalami pembesaran karena mengambil nutrisi dari media serta beberapa eksplan lain terjadi pelebaran. Hal tersebut dikarenakan adanya pengaruh dari auksin dan tekanan turgor. Pemberian 2,4-D dengan konsentrasi yang berbeda-beda akan mempengaruhi permeabilitas sel, sehingga menyebabkan terjadinya osmosis yakni air masuk ke dalam sel dan terbentuk kekakuan pada bagian daun serta mengalami pelengkungan (Purwianingsih dan Kusdianti, 2016). Menurut Robles-Martinez *et al.*, (2016) auksin 2,4-D dengan konsentrasi yang tinggi dapat digunakan untuk meningkatkan pertumbuhan kalus, tekanan osmotik, permeabilitas sel terhadap air, plastisitas, dan pengurangan tekanan pada dinding sel. Auksin dan tekanan turgor memberikan dampak terhadap eksplan daun yang menyebabkan pelengkungan diikuti dengan tulang daun membengkak dan mengakibatkan dinding sel mengendur serta merenggang. Dinding sel yang mengalami pengenduran disebabkan adanya pengaktifkan suatu enzim pada pH tertentu oleh sekresi asam sedangkan, merenggangnya sel mengakibatkan pemanjangan di sel. Tekanan turgor mengakibatkan perluasan sel, di mana terjadi penyerapan molekul air oleh sel sebagai tanda umpan balik adanya peningkatan konsentrasi zat terlarut di dalam vakuola (Wahyuni *et al.*, 2014).

Terlihat pada Tabel 1. rata-rata persentase *browning* pada konsentrasi 4 mg/l menunjukkan hasil persentase terendah yaitu 4,00% sedangkan, persentase *browning* tertinggi sebesar 16,00% pada konsentrasi 0 mg/l. Pada uji Duncan taraf 5% konsentrasi 4 mg/l berbeda nyata terhadap 0 mg/l tetapi tidak berbeda nyata terhadap 2 mg/l dan 6 mg/l. Hal tersebut dikarenakan penggunaan 2,4-D konsentrasi tinggi harus bersamaan dengan arang aktif, sedangkan konsentrasi auksin yang rendah digunakan bersamaan dengan penggunaan antioksidan seperti asam askorbat dan asam sitrat. Salah satu permasalahan yang menghambat kultur jaringan adalah adanya kontaminasi dan *browning*. *Browning* merupakan ciri kultur mati fisiologis dengan adanya warna coklat atau hitam pada eksplan yang membuat pertumbuhan terganggu dan menyebabkan kematian jaringan. Akan tetapi, pencoklatan yang terjadi terkadang tidak selalu merugikan karena kalus dapat muncul dari eksplan yang berwarna coklat atau bahkan hitam (Hapsoro dan Yusnita, 2016). Menurut Sainawal *et al.*, (2017) beberapa faktor penyebab *browning* diantaranya seperti penggunaan eksplan berasal dari jaringan dewasa, tindakan sterilisasi berlebihan, dan media atau lingkungan yang tidak mendukung. Eksplan yang diambil dari pohon dewasa dan termasuk spesies tanaman berkayu sering dijumpai mengalami masalah pencoklatan atau *browning*. Beberapa spesies tanaman memiliki kandungan tanin berkonsentrasi tinggi dan senyawa hidroksi fenol yang berpotensi sebagai penghambat pertumbuhan (Sudrajad *et al.*, 2016). Hal tersebut sesuai dengan kondisi eksplan daun bisbul (*D. discolor* Willd) yang memiliki kandungan metabolit sekunder salah satunya berupa senyawa tanin (Noviardi *et al.*, 2019). Metabolisme fenol dan metabolisme auksin memiliki keterkaitan kultur jaringan secara potitif, tetapi perubahan oksidasi fenol menjadi quinon dan senyawa lain yang beracun dapat mengakibatkan pencoklatan media dan kematian eksplan. Masalah pencoklatan dan penghitaman jaringan dapat diatasi dengan penambahan arang aktif dalam media yang biasa digunakan untuk menyerap eksudat fenolik beracun (Yusnita, 2015). Penggunaan arang aktif dan antioksidan dimaksudkan untuk mengatasi masalah pencoklatan jaringan dan media yang umum terjadi pada kultur jaringan. Beragam konsentrasi auksin dilaporkan dapat merangsang pembentukan kalus dari eksplan yang berbeda-beda. Arang aktif dapat mencegah

percoklatan karena arang aktif menyerap zat yang berwarna coklat atau hitam akibat dari sterilisasi media dengan autoklaf atau zat yang dikeluarkan oleh jaringan eksplan (Hapsoro dan Yusnita, 2016).

Daun bisbul memiliki karakteristik pada bagian abaksial terdapat bulu perak atau disebut trikoma yang memiliki fungsi sebagai pertahanan tumbuhan. Daun yang memiliki trikoma apabila digunakan sebagai sumber eksplan bisa menjadi habitat bagi mikroba dan rentan menjadi kontaminan baik bakteri maupun jamur. Oleh karena itu, trikoma pada eksplan harus dihilangkan dan disterilkan (Yuliani *et al.*, 2018). Perbedaan kedua jenis kontaminasi antara bakteri dan jamur dapat diketahui melalui ciri fisik yang terlihat di sekitar eksplan atau media kultur. Apabila kontaminasi yang diakibatkan oleh bakteri, maka eksplan terlihat basah dan berlendir. Kontaminasi yang disebabkan jamur, eksplan mengalami kekeringan dan muncul hifa dengan dicirikan adanya garis berwarna putih (Shonhaji, 2014).

Hasil pengamatan kultur kalus pada Tabel 2. konsentrasi 4 mg/l 2,4-D dapat menginduksi kalus dari eksplan daun bisbul (*D. discolor* Willd) di hari ke-63 setelah tanam dan hanya terdapat pada satu eksplan. Sedangkan, perlakuan pada konsentrasi 0 mg/l, 2 mg/l, dan 6 mg/l eksplan mengalami *browning* dan kontaminasi. Hal tersebut terjadi karena faktor eksplan daun bisbul dan faktor peneliti. Perlakuan konsentrasi 0 mg/l, 2 mg/l, dan 6 mg/l 2,4-D belum mampu menginduksi hormon endogen pada eksplan sehingga tidak terbentuk kalus selain itu, kondisi eksplan semakin menurun terlihat ada yang layu dan *browning*. Faktor yang disebabkan peneliti antara lain kurangnya ketelitian dan kesterilan (Purba dan Astawa, 2017). Media kultur dengan penambahan berbagai macam konsentrasi 2,4-D dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus yang mengakibatkan pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan (Sugiyarto dan Kuswandi, 2014). Menurut Zuraidassanaaz (2016), pembentukan kalus pada eksplan bergantung media kultur dan jenis tanamannya dalam melakukan kemampuan proliferasi yaitu tersusunnya sel-sel parenkim yang mempunyai dinding tipis dari hasil berkembangnya proliferasi sel-sel jaringan induk yang disebut masa *amorf*. Hasil penelitian serupa oleh Sudarajad *et al.*, (2016) perlakuan 2,4-D 4 ppm dan glukosa 15 g/l menunjukkan hasil yang baik dalam pembentukan dan perkembangan kalus, yang mana tidak semua sel pada eksplan memberikan kontribusi dalam proses terbentuknya kalus. Beberapa sel memiliki kompeten dalam melakukan regenerasi dan sebaliknya, ada sel lainnya yang tidak berkompeten. Sumber karbon dalam media kultur jaringan merupakan faktor penting selain auksin. Kultur jaringan memerlukan gula sebagai sumber karbon dan penghasil energi untuk morfogenesis (Yaseen *et al.*, 2013). Pertumbuhan dan perkembangan eksplan dapat meningkat maupun menurun salah satunya diakibatkan penambahan sukrosa yang mana dapat diketahui dalam regulasi metabolik yaitu transportasi auksin dan akumulasi karbohidrat sebagai penginduksi stres osmotik suatu sel serta jaringan tumbuhan (Huang *et al.*, 2012). Menurut Beinaime *et al.*, (2015) beberapa tanaman dalam kultur jaringan dengan pemberian auksin saja hanya akan menyebabkan sel-sel membesar tanpa proses pembelahan. Auksin dan tekanan turgor memberikan dampak terhadap eksplan daun yang menyebabkan pelengkungan diikuti dengan tulang daun membengkak dan mengakibatkan dinding sel mengendur serta merenggang. Oleh karena itu, pemberian kombinasi ZPT auksin dan sitokinin akan menghasilkan kalus lebih optimal daripada hanya auksin yang mana memiliki kecil kemungkinan jadi kalus.

Teixeira *et al.*, (1994) melaporkan bahwa pembentukan kalus dari eksplan infloresens bunga betina kelapa sawit diperoleh setelah eksplan dikulturkan selama 30 minggu dalam media MS mengandung 475-500 μ M 2,4-D + 3 g/l arang aktif. Menurut penelitian Hakim *et al.*, (2014) menginduksi kalus membutuhkan waktu yang lama disebabkan oleh penggunaan media padat MS, sehingga jaringan pada eksplan yang hendak masuk ke dalam media untuk melakukan pembelahan berlangsung lama. Masing-masing eksplan yang telah ditanam mempunyai sifat totipotensi sel yang berbeda, sehingga dalam proses kultur diperlukan penurunan konsentrasi zat pengatur tumbuh. Semua perlakuan yang telah diuji cobakan dapat menginduksi kalus walaupun tidak semuanya sama. Setelah beberapa hari, eksplan petal stamodia kakao yang dikulturkan mengalami pembengkakan dan perubahan warna semula putih berubah menjadi kecoklatan. Hal tersebut disebabkan karena tingginya kadar 2,4-D dalam media menyebabkan toksisitas terhadap eksplan. Auksin 2,4-D mempunyai sifat fitoksisitas tinggi yang mampu mengganggu proses rediferensiasi dan reinisiasi dari pembelahan sel. Penyebab pertumbuhan melambat diakibatkan konsentrasi auksin yang tinggi melebihi konsentrasi optimum dan bisa mengganggu proses pembesaran sel (*cell enlargement*). Beberapa spesies tanaman memiliki kandungan senyawa tanin atau hidroksi fenol dengan kadar yang tinggi dapat berpotensi sebagai penghambat pertumbuhan (Sudrajad *et al.*, 2016) dan juga pada eksplan daun yang memiliki trikoma (Yuliani *et al.*, 2018). Hal tersebut sesuai dengan kondisi eksplan daun bisbul (*D. discolor* Willd) yang mempunyai kandungan senyawa metabolit sekunder berupa tanin (Noviardi *et al.*, 2019) dan

karakteristik daun bisbul pada bagian abaksial terdapat bulu perak atau disebut trikoma apabila digunakan sebagai sumber eksplan bisa menjadi habitat bagi mikroba.

Kalus dari eksplan daun *D. discolor* Willd pada konsentrasi 4 mg/l berwarna putih dan bertekstur kompak (Gambar 3) berhasil tumbuh hanya pada satu eksplan di hari ke-63. Kalus yang dihasilkan berwarna putih, hal tersebut menandakan kondisi kalus yang baik. Kalus mempunyai tekstur yang kompak (*non friable*) artinya kalus terbentuk dari kumpulan sel yang kuat dan terlihat padat (Mahadi *et al.*, 2016). Bagian abaksial eksplan yang menempel pada media menandakan terjadinya hubungan secara langsung sehingga, menyebabkan penyerapan unsur hara lebih cepat (Nisak *et al.*, 2012). Bagian eksplan yang telah dilukai mengakibatkan timbulnya rangsangan dari jaringan untuk menutupi luka, hal tersebut menyebabkan muncul kalus. Morfologi kalus berupa bentuk, warna, dan tekstur kalus yaitu bentuk fisik yang dihasilkan serta diamati dalam setiap perlakuan. Eksplan daun anggur perlakuan 2,4-D 1,5 ppm menghasilkan kalus berwarna putih, berstruktur dan kompak (Purba dan Astawa, 2017). Zhao *et al.*, (2010) melaporkan penelitiannya bahwa 2,4-D konsentrasi 4 ppm mampu menumbuhkan kalus embrionik tanaman sorgum dengan persentase 68,4%. Berdasarkan uraian tersebut diharapkan, adanya penelitian lanjut mengenai kultur jaringan dengan penambahan konsentrasi 2,4-D 4 mg/l atau dilakukannya kombinasi auksin dan sitokinin yang tepat sehingga dapat menginduksi kalus sebagai upaya perbanyak tanaman untuk konservasi sumberdaya genetik tanaman bisbul (*D. discolor* Willd) dimasa yang akan datang.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa, konsentrasi 2,4-D 4 mg/l pada hasil uji Duncan taraf 5% adanya pengaruh terhadap pertumbuhan eksplan daun bisbul (*D. discolor* Willd) sebelum terbentuknya kalus berupa rata-rata persentase eksplan melengkung tertinggi sebesar 14,00% menunjukkan peubah memiliki pengaruh signifikan dengan hasil yang tidak berbeda nyata dengan konsentrasi lainnya. Rata-rata persentase *browning* terendah yaitu pada konsentrasi 4 mg/l yang menghambat pertumbuhan sebesar 4,00% berbeda nyata terhadap 0 mg/l tetapi tidak berbeda nyata pada konsentrasi lainnya. Konsentrasi pada perlakuan 4 mg/l memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan kalus dari eksplan daun bisbul (*D. discolor* Willd) di hari ke-63 dengan morfologi kalus berwarna putih dan bertekstur kompak (*non friable*).

DAFTAR PUSTAKA

- Admojo L dan Indrianto A, 2016. Pencegahan Browning Fase Inisiasi Kalus pada Midrib Daun Klon Karet (*Hevea brasiliensis* Muel Arg) Pb 330. *Indonesian Journal of Natural Rubber Research*; 34(1): 25-34.
- Akter S, Majumder T, Karim R, Ferdous Z, dan Sikder M, 2015. Analgesic Activities of *Geodorum densiflorum*, *Diospyros blancoi*, *Baccaurea ramiflora* and *Trichosanthes dioica*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 4(3): 209-214.
- Bienaime C, Melian A, Bensaddek L, Attoumbre J, Nava-Saucedo E, dan Baltora-Rosset S, 2015. Effect of Plant Growth Regulators on Cell Cultures of *Lycopodiella inundata*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*; 123(3): 523-533.
- Dwipayana GAJ, Yuswanti HESTIN, dan Mayun IA, 2016. Induksi Kalus Stroberi (*Fragaria* spp.) melalui Aplikasi Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat secara In Vitro. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*; 5(3): 310-321.
- Etty H, 2018. *Buku Pembibitan dan Pengembangan Tanaman Buah Lokal*. Jakarta: Pusat Pemberdayaan Masyarakat Universitas Nasional.
- Hakim AR, Munandar DE, dan Dewanti P, 2014. Induksi Somatik Embriogenesis Primer Kakao (*Theobroma cacao* L.) melalui Eksplan. *Berkala Ilmiah Pertanian*; 1(1).
- Hapsoro D dan Yusnita Y, 2016. *Kultur Jaringan untuk Perbanyak Klonal Kelapa Sawit (Elaeis guineensis* Jacq). Bandar Lampung: CV Anugrah Utama Raharja.
- Huang WL, Lee CH, dan Chen YR, 2012. Levels of Endogeneous Abscisic Acid Andindole-3- acetic Acid Influence Shoot Organogenesis in Callus Cultures of Rice Subjected to Osmotic Stress. *Plant Cell Tissue Organ Culture*; 108: 257-263.
- Kochanová Z, Onus N dan Brindza J, 2011. Adventitious Shoot Regeneration from Dormant Buds of Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) Cv Hachiya. *Journal of Agribiology*; 28(2): 113.
- Mahadi I, Syafi'i W, dan Sari Y, 2016. Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) menggunakan Hormon 2,4-D dan BAP dengan Metode In Vitro. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*; 21(2): 84-89.
- Nisak K, Nurhidayati T, dan Purwani K I, 2012. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi ZPT NAA dan BAP pada Kultur Jaringan Tembakau *Nicotiana tabacum* var Prancak 95. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*; 1(1): 1-6.

- Noviardi H, Triyani S, dan Patoni, 2019. Potensi Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Bisbul (*Diospyros discolor* Willd) terhadap Edema Mencit Putih Jantan (*Mus musculus*) Terinduksi Keragenan. *Riset Informasi Kesehatan*; 8(2): 83-90.
- Parmana D, 2015. Pengaruh Konsentrasi Hormon 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid) terhadap Induksi Kalus Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) melalui Kultur In Vitro. *Skripsi*. Dipublikasikan. Jember: Universitas Jember.
- Purba RV dan Astawa ING, 2017. Induksi Kalus Eksplan Daun Tanaman Anggur (*Vitis vinifera* L.) dengan Aplikasi 2,4-D secara In Vitro. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*; 6(2): 218-228.
- Purwianingsih WFS dan Kusdianti, 2016. Formation Flavonoid Secondary Metabolites in Callus Culture of *Chrysanthemum cinerariifolium* as Alternative Provision Medicine. *AIP Conference Proceedings*; 1708,030005.
- Putri W dan Aprilianti P, 2010. Karakteristik Buah dan Perkecambahan Biji Bisbul (*Diospyros blancoi* A. Dc) Koleksi Kebun Raya Bogor. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*; 1075-1078.
- Robles-Martinez M, Barba-de la Rosa AP, Gueroud F, Negre-Salvayre A, Rossognol M, dan Santo-Diaz MS, 2016. Establishment of Callus and Cell Suspensions of Wild and Domesticated *Opuntia* Species: Study on their Potential as a Source of Metabolite Production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*; 124(1): 181-189.
- Sainawal SB, Nugroho JD, dan Kesaulija FF, 2017. Kultur Embrio Merbau (*Intsia bijuga* OK.) pada Media Murashige and Skoog (MS) siperkaya dengan Zat Pengatur Tumbuh BAP, GA3 dan IBA. *Jurnal Kehutanan Papuaasia*; 3(2): 132-141.
- Setiawati T, Avalla A, dan Witri A, 2019. Induksi Kalus Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Rahmat.) dengan Penambahan berbagai Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). *EduMatSains: Jurnal Pendidikan, Matematika dan Sains*; 3(2): 119-132.
- Setu JR, Akhter A, Rahman R, Islam M, Koly MN, Amran MS, dan Foyzun T, 2017. Study on Antioxidant and Cytotoxic Activities of Menthanolic and Ethyl Acetate Extracts of Peel and Seed of *Diospyros blancoi*. *ARRB*; 21(5): 1-9.
- Shonhaji A, 2014. *Efektivitas Sterilisasi Eksplan Lapang Acacia manginium Willd dalam Perbanyak Tanaman melalui Teknik Kultur Jaringan* (Doctoral dissertation). Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Silalahi M, 2015. *Bahan Ajar Kultur Jaringan*. Jakarta: Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Kristen Indonesia.
- Sinaulan JS, Lengkong EF, dan Tulung S, 2019. Respon Pembentukan Kalus Embrionik Tanaman Krisan Kulo (*Chrysanthemum morifolium*) terhadap Pemberian Zat Pengatur Tumbuh Sitokinin. *COCOS*; 1(1).
- Sudrajad H, Suharto D, dan Wijaya NR, 2016. Inisiasi Kalus Sanrego (*Lunasia amara* Blanco.) dalam Kultur Jaringan. *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Environmental, and Learning*; 13(1): 619-623.
- Sugiura L, Matsuda-Habu Y, Gao M, Esumi T, dan Tao R, 2008. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) embryos. *Hortscience*; 43(1): 211-214.
- Sugiyarto L dan Kuswandi PC, 2014. *Pengaruh 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Aminopurin (BAP) terhadap Pertumbuhan Kalus Daun Binahong (Anredera cordifolia L.) serta Analisis Kandungan Flavonoid Total*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Texeira JB, Shondhl MR, dan Kirby EG, 1994. Somatic Embryogenesis from Immature Inflorescences of Oil Palm. *Plant Cell Rep*; 13: 247-250.
- Wahyuni Dk, Prasetyo D, dan Hariyanto S, 2014. Perkembangan Kultur Daun *Aglaonema* sp. Dengan Perlakuan Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh NAA dan 2,4-D dengan BAP. *Jurnal BIOSLOGOS*; 4(1): 10-16.
- Wardani IB, 2016. *Pengaruh Kombinasi BAP (6-Benzyl Amino Purine) dan NAA (Naphthalen Acetic Acid) terhadap Induksi Tunas Aksilar Cendana (Santalum album L.)*. Doctoral dissertation. Dipublikasikan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Yaseen M, Ahmad T, Sablok G, Standardi A, dan Hafiz IA, 2013. Role of Carbon Sources for in vitro Plant Growth and Development. *Molecular biology reports*; 40(4): 2837-2849.
- Yuliani Y, Dewi SK, dan Rachmadiarti F, 2018. The Morphological, Anatomi, and Physiological Characteristics of *Elephantopus scaber* as Explant Source for Tissue Culture. *International Conference on Science and Technology (ICST 2018): Atlantis Press*; 61-66.
- Yusnita, 2015. *Kultur Jaringan Tanaman sebagai Teknik Penting Bioteknologi untuk Menunjang Pembangunan Pertanian, Lampung*. Aura Publishing; 23-54.
- Yusuf Y, Kusmadji LR, dan Nurisman LS, 1995. *Mikropropagasi Melalui Kultur Meristem dan Embriogenesis Somatis pada Tanaman Eboni Diospyros celebica BAKH*. Depok: Universitas Indonesia.
- Zhao L, Liu S, dan Song S, 2010. Optimization of Callus Induction and Plant Regeneration from Germinating Seeds of Sweet Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench.). *African Journal of Biotechnology*; 9(16):2367-2374.
- Zuraidassanaaz NI, 2016. *Induksi Kalus Eksplan Daun Sirih Hitam (Pipper betle L.) dengan Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Indole-3-Acetic Acid (IAA) dan Benzyl Amino Purin (BAP)*. Doctoral dissertation. Dipublikasikan. Surabaya: Universitas Airlangga.

Article History:

Received: 23 Februari 2022

Revised: 10 Maret 2022

Available online: 27 Juni 2022

Published: 30 September 2022

Authors:

Ana Karunia Illahi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang Gedung C3 Lt. 2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: anakarunia.18025@mhs.unesa.ac.id

Evie Ratnasari, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang Gedung C3 Lt. 2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: evieratnasari@unesa.ac.id

Sari Kusuma Dewi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang Gedung C3 Lt. 2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: saridewi@unesa.ac.id

How to cite this article:

Illahi AK, Ratnasari E, dan Dewi SK, 2022. Pengaruh 2,4-D terhadap Pertumbuhan Kalus Daun *Diospyros discolor* Willd secara *In Vitro*. *LenteraBio*; 11 (3): 369-377