

INDUKSI KALUS KRISAN (*Chrysanthemum morifolium* Ramat var. Tomohon Kuning) DENGAN 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) DAN 6-Benzylaminopurine (BAP) PADA KONDISI PENCAHAYAAN BERBEDA

Tia Setiawati^{1*}, Annisa Nur Arofah², Mohamad Nurzaman³)

^{1,2,3}Departemen Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Padjadjaran

*Corresponding author: tia.unpad@ac.id

Abstract

This study aims to obtain the optimum concentration of 2,4-D and BAP plant growth regulators (PGRs) to induce Chrysanthemum callus in light and dark conditions. The method used is an experimental method in the laboratory using a Completely Randomized Design (CRD) with 4 treatment of 2,4-D + BAP concentration combinations. The culture was incubated under different lighting conditions for 45 days after planting. The parameters observed included texture and color of callus, other responses produced by explants, size, fresh weight and dry weight of callus. Data were analyzed descriptively. The results showed that 4 ppm 2,4-D + 0.5 ppm BAP treatment was the best combination in inducing Chrysanthemum callus in both light and dark conditions. In bright conditions, most of the callus were dark green and dark brown with a compact texture, callus size of 1.36 cm, and the highest fresh weight and dry weight of callus were 0.62 gram and 0.17 gram respectively. Meanwhile, in the dark conditions most of the callus were light green and light brown with a compact texture, callus size 1.18 cm, and the highest fresh weight and dry weight of the callus produced were 0.51 grams and 0.15 grams, respectively.

Keywords: Callus, *Chrysanthemum morifolium*, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-Benzylaminopurine (BAP)

PENDAHULUAN

Tanaman krisan (*C. morifolium*) merupakan jenis tanaman hias atau tanaman pot yang banyak digemari oleh masyarakat serta memiliki nilai ekonomi yang tinggi (Kasli, 2009). Selain sebagai flora hias, krisan juga memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat tradisional dan penghasil racun serangga (Rukmana & Mulyana, 1997). Pada perdagangan internasional, krisan merupakan tanaman bunga potong terpenting ketiga setelah mawar dan anyelir (Mani & Senthil, 2011). Namun, telah terjadi penurunan produksi tanaman krisan dari 397.651.571 tangkai/ha di tahun 2012 menjadi 387.208.754 tangkai/ha pada tahun

2013 (Direktorat Jenderal Hortikultura, 2015). Pengembangan budidaya tanaman krisan juga terkendala oleh teknologi pembibitan yang belum mampu menyediakan bibit bermutu tinggi dalam jumlah banyak dan waktu yang relatif singkat (Kasli, 2009).

Permasalahan tersebut dapat diatasi melalui upaya perbanyak tanaman secara *in vitro* atau kultur jaringan. Kultur *in vitro* tanaman berpotensi besar dalam program pemuliaan tanaman serta penyediaan benih dan bibit berkualitas. Perbanyak *in vitro* dapat menghasilkan bibit dalam jumlah banyak dengan kurun waktu yang relatif singkat serta tidak tergantung pada iklim dan musim (Yuwono, 2008). Perbanyak

tanaman secara *in vitro* dapat dilakukan melalui proses organogenesis dan embriogenesis baik secara langsung maupun tidak langsung melalui pembentukan kalus yang akan beregenerasi menghasilkan tanaman utuh. Induksi kalus merupakan tahap awal yang sangat penting dalam perbanyakan tanaman secara *in vitro* yang dilakukan melalui organogenesis dan embriogenesis tidak langsung. Kalus dihasilkan melalui proses pembelahan sel secara terus menerus dari eksplan yang dikultur pada media dengan menggunakan zat pengatur tumbuh (ZPT) hingga terbentuk massa sel yang selanjutnya beregenerasi membentuk tanaman yang lengkap atau utuh (Bustami, 2011). Zulkarnain (2009) menyatakan bahwa kultur kalus memiliki beberapa kelebihan yaitu dapat menghasilkan tanaman yang bebas dari virus, senyawa metabolit sekunder, serta regenerasi varian genetica.

Kondisi lingkungan merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan induksi kalus secara *in vitro* (Putri, 2008). Menurut Afshari *et al.* (2011), cahaya memiliki efek yang signifikan terhadap pertumbuhan kalus dan morfogenesis. Forooghian & Esfarayeni (2013) menyatakan bahwa faktor cahaya seperti lama durasi pencahayaan, intensitas cahaya, dan komposisi spektral cahaya merupakan faktor yang penting pada kultur *in vitro*. Keberhasilan pelaksanaan kultur jaringan

juga ditentukan oleh faktor lain, seperti komposisi ZPT, sumber eksplan, dan jenis tanaman. Dalam kultur jaringan, terdapat dua kelompok ZPT yang sering digunakan, yaitu auksin dan sitokinin.

Penelitian ini menggunakan auksin dengan jenis 2,4 *Dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D). Menurut Kristina *et al.* (2008), pembentukan dan pertumbuhan kalus dapat terjadi dengan pemberian ZPT seperti 2,4-D dan sering pula dikombinasikan dengan sitokinin. Mardini (2015) mengemukakan bahwa 2,4-D memiliki peran yang sangat signifikan terhadap proses pembentukan kalus, terkait dengan diferensiasi maupun peningkatan kompetensi sel yang terbentuk. Demikian juga dengan sitokinin yang berperan dalam memicu pembelahan dan pemanjangan sel, sehingga dapat mempercepat pertumbuhan dan perkembangan kalus (Indah & Ermavitalini, 2013). Salah satu jenis ZPT dari golongan sitokinin yang sering digunakan adalah 6-*Benzylaminopurine* (BAP), yang berfungsi dalam pembelahan sel dan diferensiasi tunas adventif dari kalus (Bhojwani and Razdan 1996 dalam Syahid & Kristina 2007). Beberapa penelitian mengenai pemberian variasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP untuk menginduksi kalus telah dilakukan. Penelitian yang dilakukan oleh Ariani *et al.* (2016) menunjukkan bahwa pada tahap diferensiasi, konsentrasi 2,4-D dan BAP berpengaruh terhadap

peningkatan persentase kalus yang sehat. Ayuningrum *et al.* (2015) juga melaporkan bahwa pemberian 2,4-D dan BAP dapat memacu pertumbuhan subkultur kalus kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill).

Berdasarkan uraian diatas, pengaruh kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP terhadap pertumbuhan kalus dari eksplan batang tanaman krisan (*C. morifolium*) yang didasarkan pada perbedaan kondisi pencahayaan menarik untuk dikaji lebih lanjut. Informasi ilmiah yang dihasilkan dari penelitian ini merupakan data awal untuk penelitian selanjutnya dalam perbanyakan krisan secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah agar bubuk, akuades steril, alkohol 70%, gula, media MS (*Murashige and Skoog*) bubuk (*PhytoTechnologyLaboratories*®), planlet *Chrysanthemum morifolium* Ramat var. Tomohon Kuning yang diperoleh dari Balai Pengembangan Benih Hortikultura dan Aneka Tanaman (BPBHAT) Pasir Banteng, spirtus, serta zat pengatur tumbuh golongan auksin (2,4-*Dichlorophenoxyacetic acid*) dan sitokinin (6-*Benzylaminopurine*).

Metode

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL)

faktor tunggal berupa 4 kombinasi konsentrasi 2,4-D + BAP, yaitu 2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP; 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP; 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP; 4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP. Kultur diinkubasi pada kondisi pencahayaan yang berbeda yaitu terang dan gelap. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak enam kali.

Sterilisasi Alat

Peralatan yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu menggunakan detergen, lalu dibilas dengan air bersih dan dikeringkan. Selanjutnya, peralatan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama \pm 15 menit. Sebelum digunakan, *Laminar Air Flow Cabinet* disterilkan dengan cara menyapu seluruh permukaan meja kerja menggunakan kapas yang telah dibasahi alkohol 70%. Lampu UV dinyalakan selama \pm 2 jam guna mematikan kontaminan.

Pembuatan Media Perlakuan

Pembuatan media perlakuan dilakukan dengan cara menimbang bubuk media MS (*Murashige and Skoog*) sebanyak 4,43 g/L dan gula 30 g/L. Kedua bahan tersebut dimasukkan ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dengan akuades steril secukupnya. Selanjutnya, ditambahkan kombinasi ZPT sesuai perlakuan yang telah ditentukan dan akuades hingga volume mencapai 1 L lalu dihomogenkan. Sebelum

ditambahkan bahan pematat, derajat keasaman (pH) media ditentukan sekitar 5,6-5,8. Nilai pH diatur dengan menambahkan beberapa tetes NaOH 1 N untuk menaikkan pH atau HCl 1 N untuk menurunkan pH. Agar bubuk sebanyak 9 g/L dimasukkan ke dalam larutan kemudian diaduk hingga homogen dan dipanaskan hingga mendidih. Media dimasukan dalam botol-botol kultur sebanyak \pm 10 mL/botol lalu disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama \pm 15 menit.

Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan berupa batang planlet krisan dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) yang sebelumnya telah disterilkan. Planlet diambil dari dalam botol kultur, kemudian diletakkan di dalam cawan petri steril yang telah dilapisi dengan kertas saring. Batang planlet dipotong dengan ukuran \pm 1 cm, kemudian ditanam ke media perlakuan dengan posisi horizontal. Kultur diinkubasi selama 45 hari pada temperatur 18-27°C dan intensitas cahaya 2000 Lux untuk kondisi terang dan ditutup menggunakan kain hitam untuk kondisi gelap.

Pengamatan dan Analisis Data

Pengamatan dilakukan pada hari ke-45 setelah tanam. Pengamatan dilakukan terhadap tekstur dan warna kalus, respon pertumbuhan lainnya, ukuran (diameter),

berat basah dan berat kering kalus. Data pengamatan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi Kalus *C. morifolium* (Tekstur dan Warna)

Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* berupa tekstur dan warna kalus menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui kalus dengan sel yang masih aktif melakukan pembelahan (meristematis) atau sel yang telah mengalami kematian (nekrosis). Morfologi kalus dapat menunjukkan variasi baik tekstur maupun warna tergantung dari perlakuan jenis dan konsentrasi ZPT yang ditambahkan, seperti yang dapat dilihat pada **Tabel 1** dan **Gambar 1**.

Berdasarkan **Tabel 1** dan **Gambar 1**, tekstur kalus yang dihasilkan pada seluruh media perlakuan menunjukkan hasil yang seragam yakni bertekstur kompak. Penambahan kombinasi 2,4-D+BAP dalam media dengan kondisi pencahayaan berbeda berpengaruh secara signifikan terhadap warna dan respon lain yang dihasilkan kalus. Sebagaimana yang diungkapkan Budiarti (2017) bahwa jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda. Hasil pengamatan pada awal pertumbuhan kalus menunjukkan bahwa sebagian besar kalus yang terbentuk menghasilkan warna bening, putih, dan hijau muda. Seiring

dengan pertumbuhan kalus, terjadi perubahan warna yang didominasi warna hijau tua, coklat muda, dan coklat tua. Seluruh kalus yang diinkubasi pada kondisi gelap menghasilkan warna yang lebih muda dan pucat dibandingkan pada kondisi terang. Respon pertumbuhan lain adalah terbentuknya akar dan tunas pada kalus.

Tekstur Kalus

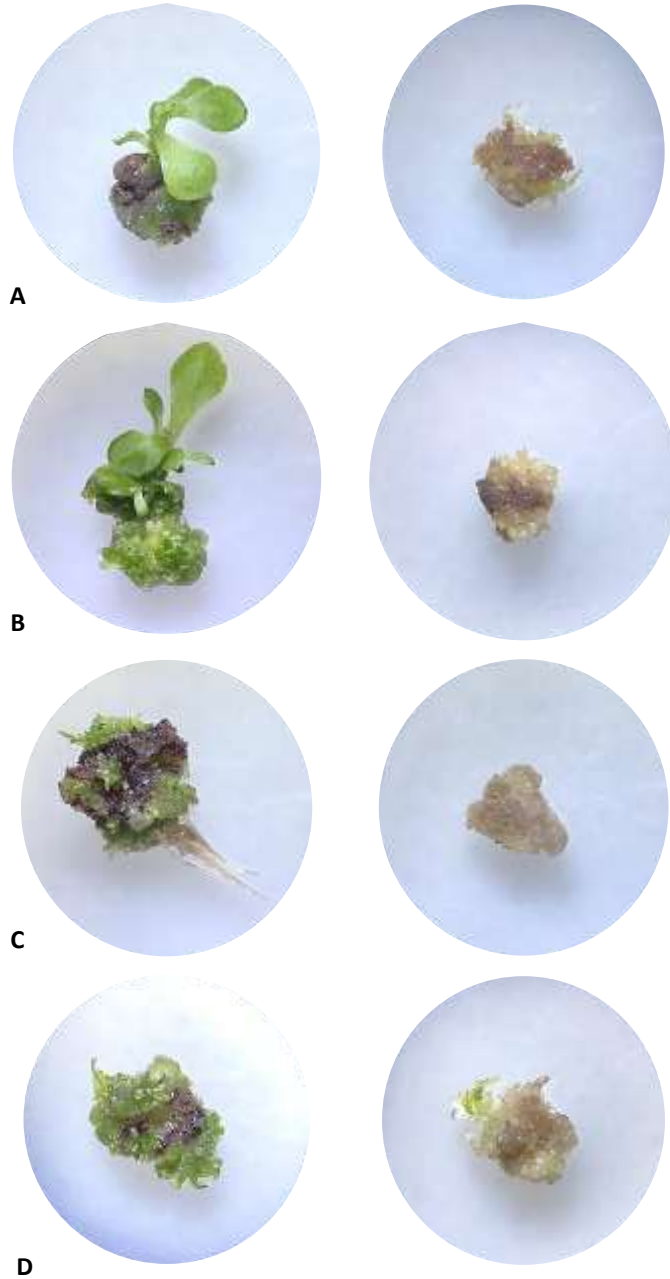
Berdasarkan hasil pengamatan secara visual, kalus yang terbentuk pada seluruh perlakuan memiliki tekstur kompak, ikatan antar sel-nya juga tampak kuat. Kalus yang kompak memiliki tekstur yang sulit untuk dipisahkan dan terlihat padat. Anniasari *et al.* (2016) mengemukakan bahwa selama masa pertumbuhan, kalus mengalami lignifikasi sehingga terbentuk tekstur kalus

yang keras, kompak, dan padat. Kalus dengan tekstur yang kompak umumnya memiliki ukuran sel yang kecil dengan sitoplasma yang padat, inti sel besar, dan mengandung banyak pati (karbohidrat).

Tekstur kalus yang kompak disebabkan oleh adanya perbedaan kemampuan jaringan tanaman dalam menyerap unsur hara dan zat pengatur tumbuh dalam media inisiasi (Ibrahim *et al.* 2010). Santoso & Nursandi (2004) menjelaskan bahwa kalus yang kompak dapat disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya karena sel-sel yang semula aktif membelah mengalami penurunan aktivitas proliferasi. Aktivitas ini dipengaruhi oleh auksin alami (endogen) yang terdapat pada eksplan.

Tabel 1. Morfologi Kalus Krisan (*C. morifolium*) pada Perlakuan ZPT 2,4-D + BAP

Kondisi Pencahayaan	Perlakuan	Warna kalus	Tekstur kalus	Respon pertumbuhan lain
Terang	2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	Coklat tua, hijau tua	Kompak	tunas
	2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	Hijau muda, hijau tua, putih	Kompak	tunas
	4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	Coklat muda, coklat tua, hijau muda, putih	Kompak	akar
	4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	Coklat muda, coklat tua, hijau tua	Kompak	akar
Gelap	2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	Coklat muda, coklat tua, hijau muda	Kompak	akar
	2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	Coklat tua, hijau muda, putih	Kompak	-
	4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	Coklat muda, hijau muda	Kompak	-
	4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	Coklat muda, coklat tua, hijau muda, putih	Kompak	tunas



Gambar 1. Kalus krisan (*C. morifolium*) pada 45 HST pada kondisi terang (kiri) dan gelap (kanan). Keterangan : A (2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP); B (2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP), C (4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP), D (4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP)

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kalus kompak diperoleh pada seluruh media perlakuan dengan konsentrasi ZPT 2,4-D yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi BAP (**Gambar 1**). Hal ini dapat disebabkan karena tingginya konsentrasi auksin (2,4-D)

yang diberikan dapat memengaruhi peningkatan konsentrasi auksin endogen pada eksplan. Selain itu, adanya sitokinin (BAP) dalam konsentrasi rendah juga dapat memengaruhi terbentuknya kalus kompak tersebut. Tekstur kalus yang kompak merupakan efek dari penambahan auksin

dan sitokinin yang memengaruhi potensial air dalam sel. Hal ini menyebabkan penyerapan air dari medium ke dalam sel meningkat sehingga sel menjadi lebih keras (padat) (Ariati, 2012).

Perbedaan kondisi pencahayaan yang diberikan pada masa inkubasi eksplan tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap tekstur kalus. Seluruh kalus yang diinkubasi pada kondisi terang maupun gelap memiliki tekstur kompak (**Tabel 1** dan **Gambar 1**). Hal ini sejalan dengan penelitian Putri (2008) yang melaporkan bahwa kondisi gelap dan terang pada berbagai media perlakuan tidak berpengaruh pada tekstur kalus yang terbentuk.

Warna Kalus

Berdasarkan hasil pengamatan, penambahan 2,4-D + BAP dalam beberapa konsentrasi menghasilkan warna kalus yang beragam pada kondisi pencahayaan berbeda (**Tabel 1** dan **Gambar 1**). Pada awal masa pertumbuhan, kalus yang terbentuk pada seluruh media perlakuan menunjukkan dominansi warna bening dan putih. Hal ini sejalan dengan pernyataan Puteri *et al.* (2014) bahwa proses induksi kalus diawali dengan menggelembungnya atau melengkungnya eksplan, kemudian dilanjutkan dengan munculnya tonjolan-tonjolan berwarna putih pada bagian luka bekas potongan yang akan terus berkembang menjadi kalus. Desriatin

(2011) menambahkan bahwa warna putih yang terbentuk pada kalus adalah jaringan parenkim yang mengandung butiran pati dengan kadar yang tinggi serta merupakan tempat penyimpanan polisakarida pada tumbuhan.

Pada **Gambar 1** terlihat adanya perbedaan yang cukup signifikan antara warna kalus yang diinkubasi pada kondisi terang dan kondisi gelap. Pada akhir masa pengamatan (45 HST), kalus yang diinkubasi pada kondisi gelap menghasilkan warna lebih muda dan cenderung pucat dibandingkan pada kondisi terang. Kalus pada kondisi terang didominasi warna hijau tua dan coklat tua, sedangkan kalus pada kondisi gelap cenderung berwarna hijau muda dan coklat muda. Kresnawati (2006) menyatakan bahwa warna kalus yang bervariasi diakibatkan oleh adanya pigmentasi cahaya. Pigmentasi dapat merata ke seluruh permukaan kalus atau hanya sebagian saja.

Rainiyati *et al.* (2007) menjelaskan bahwa perkembangan klorofil pada eksplan yang diinkubasi dalam terang terjadi karena adanya rangsangan cahaya dan dimulainya proses fotosintesis. Sintesis klorofil terjadi melalui fotoreduksi protoklorofilid menjadi klorofilid a dan diikuti dengan esterifikasi fitol untuk membentuk klorofil a yang dikatalisis enzim klorofilase (Rahayu *et al.*, 2003).

Pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (kondisi terang) dan 4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP (kondisi gelap) kalus yang terbentuk berwarna putih pada kalus (**Tabel 1**). Leupin *et al.* (2000) menyatakan bahwa kalus yang berwarna putih akan tumbuh dan membentuk butir-butir klorofil akibat paparan cahaya sehingga kalus menjadi hijau. Semakin hijau warna kalus yang dihasilkan maka kandungan klorofilnya semakin besar (Fatmawati, 2008). Andaryani (2010) menjelaskan bahwa warna putih kehijauan pada kalus karena adanya interaksi antara 2,4-D (auksin) dan BAP (sitokinin) serta faktor cahaya yang berperan penting dalam pembentukan klorofil.

Hasil pengamatan menunjukkan pula adanya perubahan warna pada sebagian permukaan kalus yakni dari warna hijau tua hingga membentuk warna coklat muda ataupun coklat tua (**Gambar 1**). Hal ini terjadi seiring meningkatnya laju pertumbuhan kalus. Sesuai pernyataan Abdullah *et al.* (1998) bahwa sel-sel muda yang sehat menunjukkan warna kuning bening, namun akan berubah menjadi kecokelatan seiring dengan bertambahnya laju pertumbuhan dan umur kalus yang semakin tua. Lerch (1998) dalam Hutami (2008) mengemukakan bahwa pencokelatan jaringan (*browning*) disebabkan oleh senyawa fenolik yang

teroksidasi melalui aktivitas enzim polifenol oksidase.

Pembentukan tunas dan akar pada kalus

Pengamatan terhadap kalus dengan perlakuan 2,4-D+BAP dan kondisi pencahayaan berbeda menunjukkan adanya pembentukan organ akar dan tunas pada beberapa perlakuan (**Tabel 1** dan **Gambar 1**). Terbentuknya tunas dan akar dapat disebabkan oleh kalus yang memiliki tekstur kompak yang memudahkan tahap organogenesis (Trigiano dan Gray, 2005). Pada penelitian ini, kemunculan akar terjadi pada perlakuan 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP (kondisi terang); 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (kondisi terang); dan 2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP (kondisi gelap). Akar yang tumbuh pada kalus dapat disebabkan oleh penambahan konsentrasi 2,4-D yang lebih tinggi dibandingkan BAP. Hendaryono dan Wijayani (1994) menyatakan apabila konsentrasi auksin yang ditambahkan lebih besar maka akan merangsang pembentukan akar pada kalus sedangkan konsentrasi sitokinin yang tinggi akan mencegah pertumbuhan akar dan penghantaran respon auksin dalam inisiasi akar (George & Sherrington, 1984).

Pembentukan tunas terjadi pada perlakuan 2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP dan 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP pada kondisi terang, serta 4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP pada kondisi gelap. Hal ini dapat terjadi disebabkan peran sitokinin BAP. Sesuai

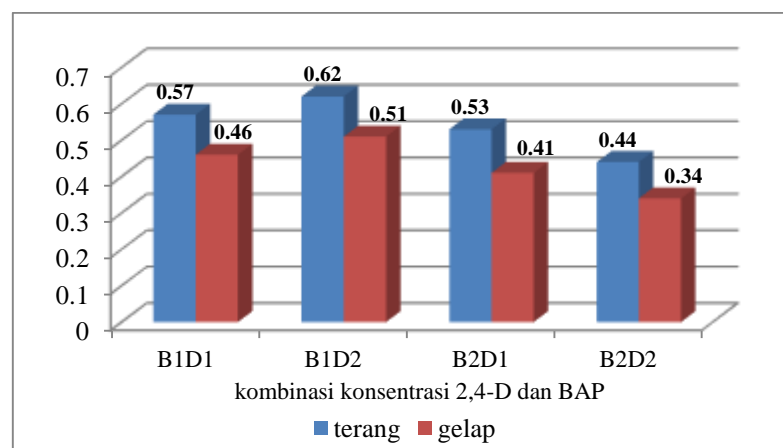
pernyataan George & Sherrington (1984) bahwa ZPT golongan sitokinin seperti BAP banyak digunakan dalam media perbanyakan secara *in vitro* untuk memacu pembentukan tunas. Pada perlakuan-perlakuan tersebut, tampak bahwa konsentrasi auksin (2,4-D) lebih tinggi daripada sitokinin (BAP), namun eksplan mampu membentuk tunas. Padahal menurut Hendaryono & Wijayani (1994) pemberian auksin dengan kadar yang relatif tinggi daripada sitokinin menyebabkan pembentukan primordia akar sedangkan jika pemberian sitokinin dengan kadar lebih tinggi daripada auksin akan mengarah pada pembentukan primordia batang atau tunas. Hal ini dapat terjadi karena adanya kontribusi hormon sitokinin endogen sehingga kebutuhan eksplan akan sitokinin untuk pembentukan tunas dapat terpenuhi. Sebagaimana Gunawan (1988) menyatakan bahwa arah perkembangan suatu kultur merupakan hasil interaksi dan perimbangan antara ZPT yang diberikan dalam media

(eksogen) dengan ZPT yang diproduksi oleh sel secara endogen.

Berat Basah, Berat Kering dan Ukuran Kalus

Hasil pengukuran terhadap berat basah kalus krisan (*C. morifolium*) pada kondisi terang dan kondisi gelap dapat dilihat pada **Gambar 2**.

Gambar 2 menunjukkan bahwa kalus pada kondisi terang memiliki berat basah lebih tinggi dibandingkan pada kondisi gelap. Berat basah kalus tertinggi pada kondisi terang dan gelap berturut-turut 0,62 dan 0,51 gram diperoleh pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP. Sementara itu, berat basah kalus terendah pada kondisi terang dan gelap berturut-turut 0,44 dan 0,34 gram diperoleh pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP. Zakaria (2010) mengemukakan bahwa keberadaan 2,4-D dan BAP dalam media dapat memacu proses metabolisme dalam sel eksplan sehingga meningkatkan pertumbuhan kalus.



Gambar 2. Rata-rata berat basah kalus krisan (*C. morifolium*) pada perlakuan 2,4-D + BAP
Keterangan : B1 = 0,5 ppm BAP; B2 = 1 ppm BAP; D1 = 2 ppm 2,4-D; D2 = 4 ppm 2,4-D

Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tanaman dalam melakukan pembelahan, perbanyakan, dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus (Rahayu *et al.* 2003).

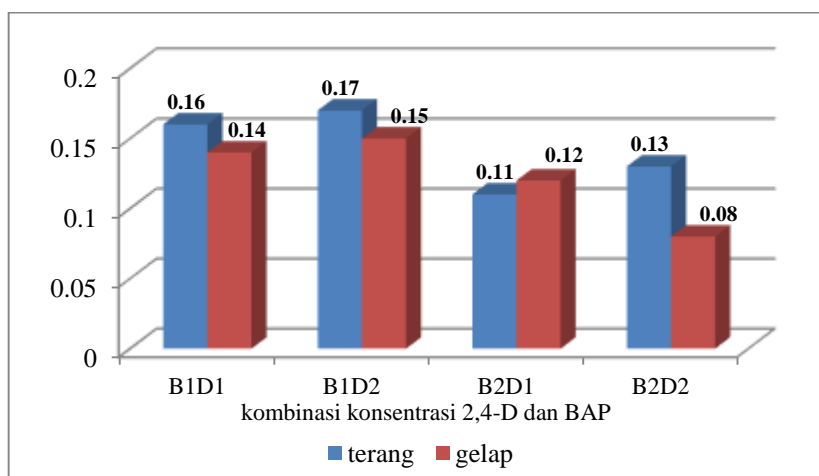
Hasil pengukuran berat kering kalus krisan (*C. morifolium*) yang diinkubasi selama 45 HST pada kondisi terang dan gelap dapat dilihat pada **Gambar 3**.

Gambar 3 menunjukkan bahwa berat kering kalus tertinggi pada kondisi terang maupun gelap diperoleh pada perlakuan yang sama yaitu 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP berturut-turut 0,17 dan 0,15 gram. Menurut Maftuchah *et al.* (1998), 2,4-D diduga memengaruhi metabolisme protein yang terjadi pada saat proses transkripsi molekul RNA. Hal tersebut menyebabkan peningkatan aktivitas dan berat kering kalus. Kenaikan sintesis protein juga menyebabkan bertambahnya sumber tenaga untuk pertumbuhan kalus. Rahayu *et al.*

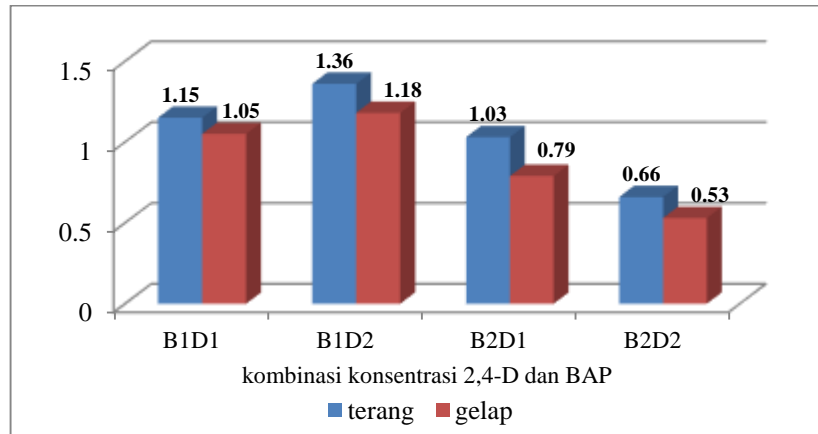
(2003) mengemukakan bahwa penggunaan 2,4-D dapat memacu pertumbuhan kalus.

Pertumbuhan berkaitan dengan pertambahan volume dan jumlah sel, pembentukan protoplasma baru, pertambahan berat, dan selanjutnya akan meningkatkan berat kering kalus.

Pemberian 2,4-D dan BAP ke dalam media tanam dapat memacu penambahan ukuran kalus krisan (*C. morifolium*). Lizawati (2012) menyatakan bahwa pemberian ZPT BAP, TDZ, dan 2,4-D dapat menyebabkan terjadinya penambahan ukuran atau diameter kalus eksplan daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L.). Aplikasi 2,4-D yang dikombinasikan dengan sitokinin (BA atau kinetin) akan lebih meningkatkan laju pertumbuhan kalus (Xie & Hong 2001; Thao *et al.* 2003). Hasil pengamatan terhadap ukuran kalus pada kondisi terang dan kondisi gelap disajikan pada **Gambar 4**.



Gambar 3. Rata-rata berat kering kalus krisan (*C. morifolium*) pada perlakuan 2,4-D + BAP
 Keterangan : B1 = 0,5 ppm BAP; B2 = 1 ppm BAP; D1 = 2 ppm 2,4-D; D2 = 4 ppm 2,4-D



Gambar 4. Rata-rata ukuran kalus krisan (*C. morifolium*) pada perlakuan 2,4-D + BAP
Keterangan : B1 = 0,5 ppm BAP; B2 = 1 ppm BAP; D1 = 2 ppm 2,4-D; D2 = 4 ppm 2,4-D

Gambar 4 menunjukkan bahwa kalus yang diinkubasi pada kondisi terang memiliki rata-rata ukuran lebih besar dibandingkan pada kondisi gelap. Rata-rata ukuran kalus terbesar pada kondisi terang dan kondisi gelap berturut-turut sebesar 1,36 cm dan 1,18 cm diperoleh pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP. Sementara itu, rata-rata ukuran kalus terkecil pada kondisi terang dan gelap berturut-turut sebesar 0,66 cm dan 0,53 cm diperoleh pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP. Kedua kombinasi konsentrasi ZPT tersebut merupakan keseimbangan yang optimal antara 2,4-D (auksin) dengan BA (sitokinin) dalam memacu pembelahan sel.

Data yang disajikan pada **Gambar 2** dan **Gambar 4** menunjukkan bahwa penambahan berat basah kalus yang dihasilkan pada setiap perlakuan sejalan dengan peningkatan ukuran kalus. Berat basah dan ukuran kalus terbesar pada

kondisi terang dan gelap diperoleh pada perlakuan yang sama yaitu 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP. Sementara itu, berat basah dan ukuran kalus terkecil pada kondisi terang dan gelap juga diperoleh pada perlakuan yang sama, yaitu 4 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP. Putri (2008) menyatakan bahwa berat basah kalus yang besar diikuti dengan ukuran kalus yang juga besar (korelasi positif) menunjukkan bahwa sel-sel kalus yang terbentuk akan mudah mengalami diferensiasi. Sebaliknya, apabila berat basah kalus cukup besar namun diikuti dengan ukuran kalus yang lebih kecil (korelasi negatif) maka sel-sel kalus yang terbentuk padat dan pejal, sehingga diperkirakan akan sulit terjadi diferensiasi kalus membentuk organ tanaman.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Perlakuan 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP merupakan konsentrasi optimum dalam menginduksi kalus krisan (*C. morifolium*) secara *in vitro* pada kondisi terang yang memiliki tekstur kompak, warna kalus hijau tua dan coklat tua, ukuran 1,36 cm, serta berat basah dan berat kering tertinggi berturut-turut sebesar 0,62 dan 0,17 gram.
2. Perlakuan 4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP merupakan konsentrasi optimum dalam menginduksi kalus krisan (*C. morifolium*) secara *in vitro* pada kondisi gelap yang memiliki tekstur kompak, warna kalus hijau muda dan coklat muda, ukuran 1,18 cm, serta berat basah dan berat kering tertinggi berturut-turut sebesar 0,51 dan 0,15 gram.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah MA, Ali M, Marziah NH & Arrif AB. 1998. Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 54:173-182.
- Afshari RT, Angoshtari R & Kalantari S. 2011. Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *Plant Omics J.*, 4 (2): 60-67.
- Andaryani S. 2010. Kajian penggunaan berbagai konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap induksi kalus jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) secara *in vitro*. *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Anniasari TD, Putri RBA & Muliawati ES. 2016. Penggunaan BA dan NAA untuk merangsang pembentukan tunas lengkung dataran rendah (*Dimocarpus longan*) secara *in vitro*. *Bioteknologi*, 13(2):43-53.
- Ariani R, Anggraito YU & Rahayu ES. 2016. Respon Pembentukan Kalus Koro Benguk (*Mucuna pruriens* L.) pada Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP. *Jurnal MIPA*, 39(1):20-28.
- 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.
- Ayuningrum K, Budisantoso I & Kamsinah. 2015. Pemberian hormon 2,4-D dan BAP terhadap pertumbuhan subkultur kalus Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) secara *in vitro*. *Biosfera*, 32(1):59-65.
- Badan Pusat Statistik [BPS]. 2013. *Luas panen, produksi, dan produktivitas tanaman Krisan 2009-2013*. Jakarta: BPS Pusat.
- Budiarti C. 2017. Pengaruh Teknik sterilisasi dan zat pengatur tumbuh 2,4-D (2,4 Dikloro Fenoksiasetat), BAP (Benzil Amino Purin) terhadap induksi kalus Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) secara *in vitro*. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati. Bandung.
- Bustami MU. 2011. Penggunaan 2,4-D untuk induksi kalus Kacang Tanah. *Media Litbang Sulteng*, 4(2):137-141.
- Desriatin NL. 2011. Pengaruh kombinasi zat pengatur tumbuh IAA dan kinetin terhadap morfogenesis pada kultur *in vitro* tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum* L. var. Prancak-95). *Skripsi*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya.
- Direktorat Jenderal Hortikultura. 2015. *Statistik Produksi Hortikultura Tahun 2014*. Jakarta: Direktorat Jenderal Hortikultura, Kementerian Pertanian.
- Fatmawati A. 2008. Kajian konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap induksi kalus tanaman *Artemisia annua* L. secara *in vitro*.

- vitro*. Skripsi. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Forooghian S & Esfarayeni. 2013. An evaluation of effects of plant growth regulators and light on callus induction for varieties of potatoes. *American-Eurasian J. Agric. and Environ. Sci.*, 13 (8): 1129-1134.
- George EF & Sherrington PD. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. England: Easter Press.
- Hendaryono DPS & Wijayani A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan: Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakkan Tanaman secara Vegetatif Modern*. Yogyakarta: Kanisius.
- Hutami S. 2008. Ulasan Masalah Pencokelatan pada Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*, 4(2):83-88.
- Ibrahim MSD, Rostiana O & Khumaida N. 2010. Pengaruh umur eksplan terhadap keberhasilan pembentukan kalus embriogenik pada kultur meristem Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.). *Jurnal Litri*, 16(1):37-42.
- Indah PN & Ermavitalini D. 2013. Induksi kalus daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-Benzylaminopurine(BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid(2,4-D). *Jurnal Sains dan Semi Pomits*, 2(1):1-6.
- Kasli K. 2009. Upaya Perbanyakkan tanaman Krisan (*Chrysanthemum sp.*) secara *in vitro*. *Jerami*, 2(3):121-125.
- Kresnawati E. 2006. Pengaruh zat pengatur tumbuh NAA dan kinetin terhadap induksi kalus dari daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth). *Skripsi*. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Leupin RE, Leupin M, Ehret C, Erismann KH & Bernard W. 2000. Compact callus induction and plant regeneration of a non-flowering vitiver from java. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 62:115-123.
- Lizawati L. 2012. Proliferasi kalus dan embriogenesis somatik Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan berbagai kombinasi ZPT dan asam amino. *Bioplantae*, 1(4):256-265.
- Maftuchah M, Ardiana HK & Joko BS. 1998. Induksi kalus artemisia (*Artemisia vulgaris* L.) melalui kultur *in vitro*. *Tropika*, 6(2):135-141.
- Mani T & Senthil K. 2011. Multiplication of *Chrysanthemum* through somatic embryogenesis. *Asian Journal Pharma Technology*, 1 (1): 13-16.
- Mardini U. 2015. Pengaruh kombinasi 2,4-D dan BAP terhadap induksi kalus eksplan daun dan batang tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) secara *in vitro*. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Puteri RF, Ratnasari E & Isnawati. 2014. Pengaruh penambahan berbagai konsentrasi NAA (Naphthalene Acetic Acid) dan BAP (Benzyl Amino Purine) terhadap induksi kalus daun Sirsak (*Annona muricata*) secara *in vitro*. *LenteraBio*, 3(3):154-159.
- Putri NI. 2008. Kajian berbagai komposisi media serta kondisi gelap dan terang terhadap induksi kalus tanaman Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.). *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Rahayu B, Solichatun S & Anggarwulan E. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid kultur kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*, 1(1):1-6.
- Rainiyati DM, Gusniwati G & Jasminarni J. 2007. Perkembangan pisang Raja Nangka (*Musa sp.*) secara kultur jaringan dari eksplan anakan dan meristem bunga. *Jurnal Agronomi*, 1(11):35-40.
- Rukmana R & Mulyana A. 1997. *Krisan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Santoso U & Nursandi F. 2004. *Kultur jaringan tanaman*. Malang:

- Universitas Muhammadiyah
Malang.
- Sitompul SM & Guritno B. 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Syahid SF & Kristina NN. 2007. Induksi dan regenerasi kalus Keladi Tikus (*Typonium flagelliforme* Lodd.) secara *in vitro*. *Jurnal Littri*, 13(4):142-146.
- Thao NTP, Ozaki Y & Okubo H. 2003. Callus induction and planlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 73:285-289.
- Xie D & Hong Y. 2001. *In vitro* regeneration of *Acacia mangium* via organogenesis. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 66:167-173.
- Zakaria D. 2010. Pengaruh konsentrasi sukrosa dan BAP (Benzil Amino Purine) dalam Media Murashige Skoog (MS) terhadap pertumbuhan dan kandungan reserpin kalus Pule Pandak (*Rauwolfia verticillata* Lour.). *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Zulkarnain H. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta: Bumi Aksara.