



## Optimasi Jenis dan Konsentrasi ZPT dalam Induksi Kalus Embriogenik dan Regenerasi menjadi Planlet pada *Carica pubescens* (Lenne & K.Koch)

### *Optimization of Type and Concentration of PGR in Embryogenic Callus Induction and Regeneration into plantlets on Carica pubescens (Lenne & K.Koch)*

✉ Nika Sari, Enni Suwarsi R, Sumadi

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

#### Info Artikel

Sejarah Artikel:  
Diterima Desember 2013  
Disetujui Januari 2014  
Dipublikasikan Maret 2014

#### Keywords:

2,4-D, BAP, callus induction, *Carica pubescens*, NAA, thidiazuron

#### Abstrak

*Carica pubescens* (Lenne & K. Koch) Badillo atau *Vasconcellea pubescens*, di Indonesia hanya ditemukan di daerah pegunungan Dieng dan Bali. Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan yang efisien. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji pengaruh jenis dan konsentrasi ZPT terhadap induksi kalus embriogenik pada media  $\frac{1}{2}$  MS pada *C. Pubescens*. Penelitian pertama (induksi) merupakan percobaan 2 faktor yang disusun menggunakan rancangan acak petak tersarang (*Split block Design*) dengan 4 ulangan. Penelitian kedua (regenerasi kalus) merupakan percobaan satu arah yang disusun dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 ulangan. Analisis menggunakan ANAVA dan uji lanjut BNT dengan taraf kesalahan 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi kalus embriogenik dari eksplan jaringan daun paling tinggi didapatkan pada perlakuan ZPT 2,4-D 3 mg/l + TDZ 1 mg/l yang ditambahkan pada media  $\frac{1}{2}$  MS, menghasilkan persentase kalus dan berat kalus yang paling tinggi. Untuk regenerasi jenis ZPT BAP dengan konsentrasi 4 mg/l dalam media MS arang aktif yang mengandung NAA 0,2 mg/l, menghasilkan persentase pembentukan kalus menjadi tunas dan jumlah kalus yang membentuk tunas dengan hasil yang optimal. Berdasarkan hasil penelitian disarankan untuk menginduksi kalus embriogenik menggunakan kombinasi ZPT 2,4-D dan thidiazuron, sedangkan untuk regenerasinya menggunakan ZPT BAP dan NAA.

#### Abstract

In Indonesia, *Carica pubescens* (Lenne & K. Koch) Badillo and *Vasconcellea pubescens* only found in mountainous areas in Dieng and Bali. Tissue culture is an efficient propagation technique. The aim of this research was to assess the effect of the type and concentration of plant growth regulator on embryogenic callus induction on  $\frac{1}{2}$  MS medium in *C. Pubescens*. The first study (induction) was a two factor experiment were prepared using a nested plot randomized complete block design (*Split block design*) with 4 replications. The second study (callus regeneration) is a one-way experiment which prepared using a completely randomized design (CRD) with four replications. Data were analyzed using ANAVA and LSD to further test error level of 5%. The results showed that the induction of embryogenic callus from leaf tissue explants obtained at the highest 2,4-D treatment PGR 3 mg/l+TDZ 1 mg/l were added to the media  $\frac{1}{2}$  MS, produce weight percentage of callus and callus highest. For regeneration of PGR BAP with a concentration of 4 mg/l in MS medium containing activated charcoal NAA 0.2 mg/l, a greater percentage of callus formation into buds and the number of callus forming buds with optimal results. Based on the research results, it suggested to induce embryogenic callus using PGR combination with 2,4-D and thidiazuron, while for regeneration was suggested to use PGR BAP and NAA.

© 2014 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:  
FMIPA UNNES Gd D6 Lt 1 Jln. Raya Sekaran- Gunungpati- Semarang 50299  
Telp./Fax. (024) 8508033; E-mail: [sarinika@rocketmail.com](mailto:sarinika@rocketmail.com)

p-ISSN 2085-191X  
e-ISSN 2338-7610

## PENDAHULUAN

Di Indonesia *Carica pubescens* dapat ditemukan di Jawa yaitu di daerah pegunungan Dieng dan di Bali (Hidayat, 2000). *C. pubescens* dapat tumbuh dengan baik pada ketinggian diatas 1500 m dpl dengan curah hujan 2000-3000 mm/tahun oleh karena itu pelestarian *C. pubescens* dapat dilakukan secara *in situ* (di dalam habitat). Sejauh ini perbanyakan *in situ* dilakukan secara konvensional oleh masyarakat Dieng dengan menggunakan biji dan stek batang. Perbanyakan tanaman menggunakan biji seringkali menghasilkan keturunan yang tidak sama sifatnya dengan induknya.

Teknik kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan *C. pubescens* yang efisien. Metode perbanyakan melalui kultur *in vitro* yang dapat menghasilkan bibit dalam jumlah banyak dalam waktu singkat, bebas patogen dan tidak membutuhkan induk yang terlalu banyak. Menurut Damayanti *et al.* (2007) regenerasi tanaman secara *in vitro* dapat dilakukan melalui induksi tunas (organogenesis) atau induksi embrio somatik (embriogenesis).

Perbanyakan tanaman melalui embriogenesis dapat berhasil apabila diperoleh persentase kalus embriogenik yang cukup tinggi dari eksplan yang dikulturkan ke dalam medium tertentu. Teknik regenerasi *C. pubescens* secara *in vitro* dapat dilakukan dengan berbagai jenis eksplan, di antaranya eksplan daun (Fikriati, 2009), anther (Ariantika, 2010) dan tunas aksiler (Amalia, 2010). Dalam penelitian tersebut efisiensi induksi embrio somatik berbeda-beda antara jenis eksplan yang satu dengan yang lain. Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan variasi umur eksplan dan genotip yang digunakan. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media dasar MS (Murashige dan Skoog), dengan penambahan zat pengatur tumbuh. Media yang digunakan untuk menginduksi kalus adalah media dasar MS yang diturunkan formulanya dari 1 menjadi ½ mampu menghasilkan persentase pembentukan kalus tertinggi dan meningkatkan 2 kali lipat kecepatan pembentukan kalus embriogenik (Damayanti *et al.*, 2007). Sel embriogenik berasal dari bagian lapisan perifer sel meristem yang memisah dari kelompoknya yang ditandai dengan tekstur remah.

Menurut Damayanti *et al.* 2007, regenerasi tanaman secara *in vitro* dapat dilakukan melalui induksi tunas (organogenesis) atau embrio somatik (embriogenesis). Regenerasi melalui organogenesis dimulai dengan perubahan di dalam sebuah sel atau sebuah kecil sel parenkim yang

membelah menghasilkan massa sel yang berbentuk globuler dan bersifat meristematik, plastik dan dapat berkembang menjadi primodial akar dan tunas yang bersifat unipolar, sedangkan regenerasi melalui jalur embriogenesis somatik mudah diregenerasikan menjadi embrio bipolar, yaitu mempunyai dua kutub yang langsung sebagai bakal tunas dan akar. Embriogenesis mempunyai beberapa tahap spesifik, yaitu (1) induksi sel dan kalus embriogenik, (2) pendewasaan, (3) perkecambahan, dan (4) *hardening* (Rahayu & Habibah, 2009).

Pada tahap induksi kalus embriogenik dilakukan isolasi eksplan daun yang diambil dari biji *C. pubescens* ditanam secara *ex vitro* di ruang kultur selama 3 bulan dengan tujuan untuk mengurangi kontaminan dari lapang. Menurut Gunawan 1995, untuk mendapatkan kalus eksplan daun lebih menguntungkan daripada penggunaan eksplan batang. Daun muda merupakan organ tanaman yang mempunyai daya regenerasi tinggi dan mudah didapat. Pada umumnya induksi kalus embriogenik membutuhkan zat pengatur tumbuh auksin yang dikombinasikan sitokinin.

Menurut Rahayu dan Habibah (2009), untuk menginduksi kalus embriogenik umumnya menggunakan auksin yang mempunyai aktifitas kuat atau dengan konsentrasi tinggi. Dari berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa 2,4-*dichlorophenoxy acetic acid* (2,4-D) merupakan auksin yang efektif untuk induksi kalus embriogenik. Zat pengatur tumbuh tersebut merupakan auksin sintesis yang cukup kuat dan tahan terhadap degradasi karena reaksi enzimatis dan fotooksidasi, sedangkan thidiazuron (TDZ) lebih kuat dari sitokinin yang bisa digunakan untuk meningkatkan persentase kalus membentuk tunas (Schulze, 2007). Kombinasi auksin dan sitokinin sebesar 1 mg/l dan 3 mg/l dilaporkan dapat menginduksi kalus dari berbagai organ seperti daun, batang dan akar pada tanaman anggrek vanda (Nguyen & Hang, 2006). Pemberian zat pengatur tumbuh 2,4-D dan TDZ dapat menginduksi kalus dari eksplan daun *Phalaenopsis* (Sri *et al.*, 2009). Kalus yang mempunyai struktur embriogenik dan mampu diregenerasikan adalah kalus yang diinginkan untuk efisiensi perbanyakan melalui teknik kultur jaringan. Kalus yang baru terbentuk berpeluang menghasilkan tunas lebih tinggi dibandingkan kalus yang telah disubkultur berkali-kali, karena kalus yang baru terbentuk kandungan poliamin atau senyawa yang berperan dalam sistem regenerasi masih tinggi (Lestari & Yunita, 2008).

Regenerasi tanaman memerlukan ZPT yang spesifik untuk menginduksi tunas. BAP merupakan ZPT yang sangat efektif dalam

menginduksi proliferasi tunas *in vitro* banyak jenis tanaman dibanding dengan sitokinin lain yang umum digunakan dalam kultur jaringan tanaman (George & Sherrington, 1984), sedangkan NAA berperan dalam pembentukan akar dan perpanjangan sel. Pemberian BAP pada media MS yang mengandung NAA, ternyata menghasilkan tunas yang lebih cepat perpanjangannya, walaupun jumlah tunasnya lebih sedikit dibandingkan yang diberi BAP tanpa NAA. Mengacu pada penelitian Imelda *et al.* (2008) tentang regenerasi tunas iles-iles (*Amorphophallus muelleri* Blume) yang akan digunakan dalam regenerasi kalus *C. pubescens* ada tiga taraf media perlakuan yaitu jumlah tunas terbanyak diperoleh pada media dengan konsentrasi BAP 1 mg/l; 2 mg/l dan 4 mg/l. Media dasar regenerasi *C. pubescens* digunakan media dasar MS penuh dengan menambahkan arang aktif. Arang aktif ditambahkan untuk menyerap senyawa fenol yang dikeluarkan eksplan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk (1) Mengkaji pengaruh jenis dan konsentrasi ZPT terhadap induksi kalus embriogenik pada media ½ MS pada *C. pubescens*. (2) Mengkaji pengaruh jenis dan konsentrasi ZPT terhadap regenerasi planlet dari kalus embriogenik *C. pubescens*. (3) Mengkaji interaksi jenis dan konsentrasi ZPT yang paling optimal untuk induksi kalus embriogenik dan regenerasi planlet *C. pubescens*.

## METODE

### Penelitian Tahap I (Induksi Kalus Embriogenik)

Percobaan dua faktor yang disusun dengan pola Rancangan Blok Terpisah (*Split block Design* atau *Strip plot Design*). Faktor I : Pemberian 2,4-D pada medium ½ MS dengan dua konsentrasi, yaitu: D1 = 1 mg/l ; D3 = 3 mg/l . Faktor II : Pemberian Thidiazuron pada medium ½ MS dengan dua konsentrasi, yaitu : T1 = 1 mg/l dan T3 = 3 mg/l.

Langkah awal penelitian ini adalah menyiapkan medium dan mensterilkan media tersebut. Kemudian, eksplan yang berupa daun *C. pubescens* yang ditanam secara *ex vitro*. Daun diambil dari nodus pertama dan ke-dua dari pucuk. Hal ini dengan pertimbangan daun pertama dan kedua adalah daun yang masih muda, meristematik dan bagian-bagiannya sudah sempurna. Eksplan disterilisasi menggunakan metode Soede 1979 (Pierik, 1987). Setelah disterilisasi, eksplan diletakkan di cawan petri kemudian dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm. Setelah dipotong eksplan kemudian dimasukkan dalam media yang telah disiapkan. Selanjutnya eksplan diinkubasi pada rak

penyimpanan dengan suhu 23-25 °C. Sub kultur dilakukan tiap satu bulan sekali, karena dalam jangka waktu tersebut diperkirakan media mulai kehabisan nutrisi.

Pengumpulan data dilakukan dengan menghitung waktu mulai berkalus, persentase berkalus, berat kalus dan tekstur kalus pada berbagai konsentrasi 2,4-D dan thidiazuron. Parameter penelitian ini adalah pembentukan kalus dengan parameter waktu mulai berkalus, persentase berkalus, berat kalus dan tekstur kalus. Waktu mulai berkalus ditentukan berdasarkan jarak waktu (hari) sejak penanaman hingga mulainya muncul kalus dari tiap perlakuan. Kemunculan kalus diindikasikan dengan adanya kumpulan sel dari eksplan daun dengan ciri berwarna putih atau bening dengan lebar minimal 1-2 mm. Persentase berkalus ditentukan dengan menghitung ratio jumlah eksplan yang menumbuhkan kalus dengan seluruh eksplan yang ditanam. Berat segar kalus dihitung dengan menimbang botol yang berisi media dan kalus setelah eksplan ditanam selama 1,5 bulan dikurangi berat awal botol media dan eksplan.

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan uji statistik ANAVA dua arah dengan Rancangan Acak Petak Tersarang (*Split block Design*) menurut (Mattjik & Sumertajaya, 2002). Jika hasil uji ANAVA signifikan, dilakukan uji BNT 5 % untuk membandingkan antara rataan perlakuan yang dicoba (Sastrosupadi, 1995).

### Penelitian Tahap II (Regenerasi)

Pada kegiatan ini, kalus-kalus yang diperoleh pada perlakuan sebelumnya diregenerasikan untuk membentuk tunas sampai menjadi planlet. Percobaan satu faktor dengan tiga taraf konsentrasi BAP yang disusun dengan pola Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pemberian BAP pada medium MS yang mengandung NAA 0,2 mg/l dengan penambahan 2 g/l arang aktif dengan berbagai konsentrasi yaitu B1 = BAP 1 mg/l, B2 = BAP 2 mg/l, dan B4 = BAP 4 mg/l. Jika induksi kalus menggunakan ZPT dengan konsentrasi tinggi, maka proses regenerasinya membutuhkan asupan ZPT dalam konsentrasi rendah. Proses regenerasi membutuhkan asupan sitokinin dan auksin yang dalam hal ini diperoleh dari BAP dan NAA. BAP merupakan ZPT spesifik yang berperan dalam merangsang proses pembelahan sel dan diferensiasi tunas adventif dari kalus (Syahid & Kristina, 2007). Tanpa NAA kalus hanya akan menginduksi tunas saja, maka dari itu NAA ditambahkan pada media regenerasi untuk induksi akar.

Langkah pembuatan media seperti pada

penelitian tahap I. Media regenerasi menggunakan media dasar MS penuh dengan menambahkan arang aktif sebanyak 2 g/l dengan penambahan kombinasi hormon BAP dan NAA. Eksplan yang berupa kalus yang diinduksi dari daun *C. pubescens* secara *in vitro*. Kalus diperoleh dari perlakuan sebelumnya yang ditumbuhkan pada media regenerasi yang mengandung 2,4-D dan thidiazuron. Kalus yang berhasil diinduksi dibiarkan selama 3 minggu agar kalus yang diperoleh lebih banyak. Kemudian dari botol kultur dipindahkan ke dalam media regenerasi. Pengamatan dilakukan selama 4 bulan sampai muncul planlet.

Pengumpulan data dilakukan dengan menghitung kecepatan muncul tunas, persentase kalus yang membentuk tunas, jumlah tunas dan jumlah tunas yang membentuk planlet pada berbagai konsentrasi BAP dan NAA. Parameter penelitian ini adalah pembentukan tunas dengan parameter kecepatan muncul tunas, persentase kalus yang membentuk tunas, jumlah tunas dan jumlah planlet. Waktu mulai muncul tunas ditentukan berdasarkan jarak waktu (hari) sejak pemindahan kalus ke dalam media regenerasi hingga mulainya muncul tunas dari tiap perlakuan. Kemunculan tunas diindikasikan dengan kemunculan spot hijau.

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan uji statistik ANAVA dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu jalan dengan taraf kesalahan 5% untuk melihat pengaruh tiap kelompok perlakuan. Jika hasil uji ANAVA signifikan, dilakukan uji BNT 5 % untuk membandingkan antara rata-rata perlakuan yang dicoba (Sas-trosupadi, 1995).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penelitian Tahap I (Induksi Kalus Embriogenik)

Inisiasi kalus embriogenik pada irisan daun *Carica pubescens* tercepat rata-rata mulai terbentuk pada umur 20 setelah penanaman pada kombinasi media yang mengandung jenis dan konsentrasi ZPT 2,4-D 3 mg/l + TDZ 1 mg/l, sedangkan media kombinasi 2,4-D 1 mg/l + TDZ 3 mg/l dan 2,4-D 1 mg/l + TDZ 1 mg/l masing-masing terbentuk pada umur 26 dan 28 hari setelah penanaman, dan kombinasi media yang membutuhkan waktu cukup lama untuk menginisiasi adalah media 2,4-D 3 mg/l + TDZ 3 mg/l yang membutuhkan waktu 37 hari setelah penanaman.

Terbentuknya kalus berkisar antara 25 - 100 %. Pada perlakuan jenis dan konsentrasi ZPT 2,4-D dan TDZ dimulai dari perlakuan kombi-

nasi 2,4-D 1 mg/l + TDZ 1 mg/l (25%), 2,4-D 3 mg/l + TDZ 3 mg/l (37,5%), 2,4-D 1 mg/l + TDZ 3 mg/l (56,25%) dan 2,4-D 3 mg/l + TDZ 1 mg/l (100%). Interaksi 2,4-D dan TDZ 1-3 mg/l persentase kalus yang terbentuk dapat berhasil diinduksi dengan hasil yang cukup tinggi. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), 2,4-D merupakan jenis auksin yang mempunyai potensi tinggi untuk menumbuhkan kalus. Pembengkakan eksplan merupakan pemanjangan sel yang disebabkan 2,4-D, akan tetapi beberapa media yang mengandung 2,4-D, tidak semua media memberikan dampak yang sama pada irisan daun (Gill *et al.*, 2004).

Pengaruh media terhadap pembentukan kalus terjadi akibat kontribusi kombinasi jenis dan konsentrasi ZPT 2,4-D dan TDZ yang seimbang untuk pembelahan sel. Namun apabila terjadi akumulasi ZPT tersebut dengan adanya sitokinin endogenous akan menurunkan atau menghambat pembelahan sel. Menurut Chang dan Chang (2000), bahwa TDZ yang terakumulasi menjadi sangat tinggi konsentrasinya mampu menghambat pembelahan sel. Tetapi secara umum TDZ yang merupakan derivat phenylurea efektif sebagai regulator pertumbuhan (Srinivasan *et al.*, 2006). Kombinasi media yang menghasilkan kalus tertinggi diperoleh pada kombinasi 2,4-D 3 mg/l + TDZ 1 mg/l (100%) hal ini sesuai menurut pendapat Pierick (1987), bahwa perbandingan auksin dan sitokinin menentukan arah dan jumlah keberhasilan dalam kultur jaringan.

Pada proses pembentukan kalus ditemukan bahwa tidak semua eksplan yang dikulturkan membentuk kalus, seperti pada perlakuan 2,4-D 1 mg/l + TDZ 1 mg/l dan 2,4-D 1 mg/l + TDZ 3 mg/l dimana ada eksplan tidak mampu tumbuh dan membentuk kalus tetapi tetap hidup. Eksplan berwarna hijau kecoklatan dapat dilihat pada Lampiran 15, sedangkan pada perlakuan 2,4-D 3 mg/l + TDZ 3 mg/l eksplan berwarna kecoklatan seperti akan mati, akan tetapi perubahan warna atau kesegaran eksplan yang kecoklatan tidak menjadi tanda bahwa eksplan yang kecoklatan tidak mampu membentuk kalus. Hal ini dapat dimungkinkan konsentrasi ZPT eksogen yang diberikan tidak sesuai, sehingga eksplan membutuhkan waktu yang lama untuk merespon. Disamping itu kemungkinan adanya pengaruh hormon endogen. Data respon pertumbuhan kalus dari eksplan daun *C. pubescens* terhadap jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan TDZ disajikan pada tabel 1.

Setelah dilakukan penelitian selama 45 hari pada induksi kalus *C. pubescens* dengan kon-

sentrasi 2,4-D dan thidiazuron masing-masing 1 mg/l dan 3 mg/l dapat diamati waktu mulai berkalus. Analisis varian dua jalan dapat dilihat pada Tabel 7. Perlakuan 2,4-D, TDZ dan interaksi 2,4-D x TDZ tidak berpengaruh nyata terhadap waktu mulai berkalus eksplan daun *Carica pubescens*.

Dari analisis varian dapat dilihat bahwa perlakuan 2,4-D dan TDZ tidak berpengaruh nyata terhadap persentase berkalus, sedangkan interaksi 2,4-D x TDZ berpengaruh nyata terhadap persentase berkalus eksplan daun *Carica pubescens*. Karena interaksi 2,4-DxTDZ berpengaruh nyata, maka dilakukan uji lanjut BNT dengan menggunakan taraf kesalahan 5%. Dari perhitungan BNT 5%. Dari hasil uji BNT 5% dapat dilihat perlakuan kombinasi 2,4-D 3 mg/l+ TDZ 1 mg/l menghasilkan persentase berkalus paling tinggi yaitu sebesar 100%.

Bertambahnya berat mencirikan adanya pertumbuhan, sehingga pengukuran berat basah kalus dapat mewakili *variable* pertumbuhan kalus. Dari hasil penelitian diperoleh hasil pengukuran berat kalus pada eksplan *C. pubescens* dan analisis varian dua jalan. Setelah data dianalisis, perlakuan 2,4-D, TDZ dan interaksi 2,4-DxTDZ

berpengaruh nyata terhadap berat kalus eksplan daun *Carica pubescens*, maka dilanjutkan dengan uji lanjut BNT dengan taraf kesalahan 5%. Perlakuan 2,4-D perbandingan rata-rata antara pemberian 2,4-D 3 mg/l menunjukkan hasil berbeda dengan pemberian 2,4-D 1 mg/l. Nilai BNT 5% pada berat kalus sebesar 0,22 g sedangkan rata-rata yang diperoleh dengan pemberian 2,4-D 3 mg/l menunjukkan hasil yang lebih tinggi yaitu sebesar 0,82 g.

Perlakuan TDZ perbandingan rata-rata antara pemberian TDZ 1 mg/l dengan TDZ 3 mg/l menunjukkan hasil yang berbeda. Rataan yang diperoleh dengan pemberian TDZ 1 mg/l menunjukkan hasil yang lebih tinggi yaitu sebesar 0,86 g. Interaksi 2,4-DxTDZ menunjukkan hasil tertinggi pada kombinasi perlakuan 2,4-D 3 mg/l + TDZ 1 mg/l rata-rata yang diperoleh menunjukkan hasil yang lebih tinggi yaitu sebesar 0,750 g.

Bertambahnya berat yang *irreversible* mencirikan adanya pertumbuhan, sehingga pengukuran berat segar kalus dapat mewakili variabel pertumbuhan kalus yang berasal dari eksplan daun *Carica pubescens*. Menurut Ruswaningsih (2007), berat segar secara fisiologis terdiri dari dua kandungan yaitu air dan karbohidrat.

**Tabel 1.** Respon pertumbuhan kalus dari eksplan daun *C. pubescens* terhadap jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan TDZ

No.	Perlakuan	Waktu mulai berkalus (hari)	Persentase berkalus (%)	Berat kalus (gram)
1.	D1T1 <sub>(1)</sub>	29	50	0,24
2.	D1T1 <sub>(2)</sub>	27	50	0,18
3.	D1T1 <sub>(3)</sub>	-	0	0,00
4.	D1T1 <sub>(4)</sub>	-	0	0,00
5.	D1T3 <sub>(1)</sub>	24	100	0,44
6.	D1T3 <sub>(2)</sub>	28	50	0,28
7.	D1T3 <sub>(3)</sub>	26	75	0,15
8.	D1T3 <sub>(4)</sub>	-	0	0,00
9.	D3T1 <sub>(1)</sub>	20	100	0,90
10.	D3T1 <sub>(2)</sub>	19	100	1,10
11.	D3T1 <sub>(3)</sub>	21	100	0,62
12.	D3T1 <sub>(4)</sub>	20	100	0,38
13.	D3T3 <sub>(1)</sub>	-	-	0,00
14.	D3T3 <sub>(2)</sub>	-	-	0,00
15.	D3T3 <sub>(3)</sub>	36	75	0,12
16.	D3T3 <sub>(4)</sub>	38	75	0,15

Keterangan :

- : tidak tumbuh
- D1T1 : 2,4-D 1 mg/l dan TDZ 1 mg/l
- D1T3 : 2,4-D 1 mg/l dan TDZ 3 mg/l
- D3T1 : 2,4-D 3 mg/l dan TDZ 1 mg/l
- D3T3 : 2,4-D 3 mg/l dan TDZ 3 mg/l

Menurut Santoso dan Nursandi (2004), arah perkembangan kultur ditentukan oleh interaksi dan keseimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diproduksi oleh sel tanaman secara endogen, sebab di dalam eksplan itu sendiri sebenarnya sudah ada zat pengatur tumbuh endogen, tapi dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* zat pengatur tumbuh eksogen masih ditambahkan. Penambahan auksin seperti 2,4-D dilakukan karena berperan untuk mendorong proses morfogenesis kalus, induksi kalus dan dapat mempengaruhi kestabilan genetik sel tanaman. Sementara sitokinin seperti TDZ berperan dalam pembelahan sel, jaringan dan organogenesis.

Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai kualitas suatu kalus. Kalus yang baik diasumsikan memiliki tekstur remah (*friable*). Tekstur kalus yang remah dianggap baik karena memudahkan dalam pemisahan menjadi sel-sel tunggal pada kultur suspensi, di samping itu akan meningkatkan aerasi oksigen antar sel. Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam, yaitu : kompak (*non friable*), intermediet dan remah (*friable*) (Turhan, 2004). Secara visual, kalus remah yang terbentuk pada eksplan *daun Carica pubescens* ikatan antar selnya tampak renggang, mudah dipisahkan dan jika diambil dengan pinset, kalus mudah pecah dan ada yang menempel pada pinset. Kalus yang kompak mempunyai tekstur yang sulit untuk dipisahkan dan terlihat padat (Fitriani, 2008). Sedangkan kalus yang sebagian bertekstur kompak dan remah disebut kalus intermediet (Widiarso, 2010).

Inisiasi kalus embriogenik mulai terlihat sekitar 3 minggu setelah tanam sampai 5 minggu setelah tanam. Kalus embriogenik mulai tumbuh pada pinggir eksplan daun (bekas luka sayatan) dapat dilihat pada Lampiran 13. Kalus yang diinduksi dengan tambahan ZPT 2,4-D dan TDZ dapat menghasilkan kalus yang berwarna putih dan bening membentuk bulatan-bulatan dan mudah dipisahkan (remah) sehingga dapat disebut bersifat embriogenik.

Dalam perkembangannya, proembrio mulai jelas bentuk dan warnanya setelah 45 hari dalam kultur media. Embrio yang mulai membesar berbentuk bulat (globuler) dengan warna transparan, kemudian berkembang menjadi beberapa warna, yaitu kekuningan, putih kekuningan, dan putih. Permukaan embrio terlihat halus dan mengkilap dengan ukuran relatif homogen. Di samping terbentuk proembrio dan embrio, juga terbentuk kalus berstruktur remah di sisi eksplan yang tidak ditumbuhi embrio somatik. Kalus re-

mah ini tampak seperti pasir berwarna putih (Riyadi & Tirtoboma, 2004).

Adapun eksplan yang tidak berhasil menginduksi kalus, eksplan yang berwarna hijau berubah menjadi kecoklatan. Perubahan warna eksplan dari hijau menjadi kecoklatan disebabkan karena mulai dihasilkannya fenolat oleh eksplan dimana fenol bereaksi dengan udara membentuk quinon dan akan menyebabkan warna coklat pada eksplan yang disebut browning (George & Sherrington, 1984).

### Penelitian Tahap II (Regenerasi)

Pada penelitian tahap I terlihat bahwa kalus yang berasal dari perlakuan jenis dan konsentrasi ZPT 2,4-D dan TDZ selama 45 hari belum mampu menginduksi tunas. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa tahap regenerasi adalah tahap yang paling sulit. Pada tahap ini kalus yang dihasilkan dari penelitian sebelumnya disubkultur pada media regenerasi yang mengandung BAP. Tanpa diberikannya BAP kedalam media regenerasi, kalus tidak mampu beregenerasi membentuk tunas baru. Sampai umur enam minggu tidak ada pembentukan nodul-nodul bakal tunas. Sedangkan pada semua perlakuan BAP yang tambahkan dengan auksin konsentrasi rendah, semua kalus mampu beregenerasi dengan baik. Dapat dikatakan disini bahwa proses regenerasi membutuhkan asupan sitokinin yang dalam hal ini diperoleh dari BAP pada berbagai konsentrasi. Pada tahap ini juga ditambahkan auksin dalam konsentrasi yang rendah yaitu 0,2 mg/l pada media MS dengan tujuan untuk menumbuhkan akar. Karena untuk mencapai tujuan embriogenesis pada tahap perkecambahan melalui fase dimana kalus embriogenik membentuk tunas dan akar.

Setelah dilakukan pemindahan kalus kedalam media regenerasi dengan tiga taraf konsentrasi BAP yang ditambahkan dalam media MS arang aktif yang mengandung NAA 0,2 mg/l dihasilkan tunas yang membentuk planlet seperti pada Gambar 14. Regenerasi tunas diinduksi dari kalus yang baru terbentuk 45 hari setelah tanam. Pada hari ke- 29 setelah ditanam pada media untuk regenerasi maka kalus tampak berubah warna dari putih menjadi kuning kecoklatan. Kalus kemudian membentuk spot atau nodul-nodul berwarna hijau bakal tunas. Perubahan warna tersebut merupakan adanya morfogenesis (Lestari & Yunita, 2008).

Kalus-kalus yang embriogenik akan mengalami beberapa fase perkembangan sampai menghasilkan tunas. Fase tersebut dimulai dari kondisi kalus dalam bentuk globular, kemudian

heart, torpedo, sampai pada fase akhir kotiledon dan akhirnya baru membentuk tunas. Sementara kalus-kalus yang bukan embriogenik akan selalu dalam fase globular. Induksi tunas pada kalus embriogenik pada irisan daun *Carica pubescens* tercepat rata-rata mulai terbentuk pada umur 29 sampai 47 hari setelah pemindahan ke dalam media regenerasi pada kombinasi media B1, B2, dan B4.

Penelitian tahap II data diambil selama 4 bulan atau sekitar 120 hari untuk meregenerasikan kalus menjadi planlet. Hasil pengamatan kecepatan muncul tunas dianalisis menggunakan analisis varian satu jalan. Pada perlakuan media regenerasi berdasarkan perhitungan analisis varian satu jalan perlakuan media regenerasi tidak berpengaruh nyata pada kecepatan muncul tunas kalus *Carica pubescens*.

Hasil analisis varian satu jalan persentase kalus yang membentuk tunas setelah 4 bulan (120 hari) dipindahkan pada medium regenerasi. Perlakuan media regenerasi berdasarkan perhitungan analisis varian satu jalan perlakuan media regenerasi berpengaruh nyata pada persentase kalus *Carica pubescens* membentuk tunas, maka dilanjutkan dengan uji BNT dengan taraf kesalahan 5 % untuk mengetahui nilai perbandingan rata-rata pada media perlakuan regenerasi. Perbandingan rata-rata antara media perlakuan regenerasi pada parameter persentase kalus yang membentuk tunas yang menunjukkan hasil yang paling tinggi yaitu pada perlakuan BAP 4 mg/l sebesar

57,75%.

Hasil analisis varian satu jalan jumlah kalus yang membentuk tunas setelah 4 bulan (120 hari). Perlakuan media regenerasi berdasarkan perhitungan analisis varian satu jalan maka perlakuan media regenerasi berpengaruh nyata pada jumlah kalus *Carica pubescens* membentuk tunas. Untuk itu dilakukan uji BNT dengan taraf kesalahan 5 % untuk mengetahui nilai perbandingan rata-rata pada media perlakuan regenerasi. Perbandingan rata-rata antara media perlakuan regenerasi pada parameter jumlah tunas yang menunjukkan hasil yang paling tinggi yaitu pada perlakuan BAP 4 mg/l sebesar 11,75.

Pada penelitian ini tunas yang membentuk planlet jumlahnya sedikit sekali hal ini dikarenakan dibutuhkan lebih banyak waktu agar tunas menjadi planlet. Selama 120 hari hanya beberapa tunas yang tumbuh menjadi planlet. Analisis varian satu jalan pada parameter jumlah tunas yang membentuk planlet menunjukkan jumlah tunas yang membentuk planlet tidak berpengaruh nyata pada perlakuan media regenerasi. Hasil penelitian regenerasi kalus dari eksplan daun *C. pubescens* dengan pemberian tiga taraf BAP dapat dilihat pada Tabel 2.

Dapat dilihat pada Tabel 2, bahwa terbentuknya kalus menjadi tunas berkisar antara 3,75% sampai 57,75%. Pada perlakuan media regenerasi tiga taraf konsentrasi BAP yang ditambahkan dalam media MS yang mengandung NAA 0,2 mg/l diperoleh perlakuan media regenerasi kombinasi

**Tabel 2.** Respon kalus dari eksplan daun *C. pubescens* terhadap tiga taraf konsentrasi BAP dalam media MS arang aktif yang mengandung NAA 0,2 mg/l

No.	Kombinasi Taraf Perlakuan	Kecepatan muncul tunas (hari)	Persentase kalus menjadi tunas	Jumlah tunas	Jumlah planlet
1.	B1 <sub>(1)</sub>	58	7	1	0
2.	B2 <sub>(1)</sub>	53	18	1	0
3.	B4 <sub>(1)</sub>	30	88	19	1
4.	B1 <sub>(2)</sub>	36	8	3	0
5.	B2 <sub>(2)</sub>	36	30	3	0
6.	B4 <sub>(2)</sub>	27	78	12	6
7.	B1 <sub>(3)</sub>	0	0	0	0
8.	B2 <sub>(3)</sub>	43	15	2	0
9.	B4 <sub>(3)</sub>	0	0	0	0
10.	B1 <sub>(4)</sub>	0	0	0	0
11.	B2 <sub>(4)</sub>	32	9	6	3
12.	B4 <sub>(4)</sub>	30	65	16	0

Keterangan:

0 : tidak tumbuh

B1 : BAP 1 mg/l dalam media MS arang aktif yang mengandung NAA 0,2 mg/l

B2 : BAP 2 mg/l dalam media MS arang aktif yang mengandung NAA 0,2 mg/l

B4 : BAP 4 mg/l dalam media MS arang aktif yang mengandung NAA 0,2 mg/l

B4 lebih banyak membentuk tunas daripada B2. Jumlah persentase terendah dihasilkan kombinasi B1. Dalam proses embriogenesis peranan sitokinin sangat menentukan, namun demikian hanya sel-sel yang kompeten saja yang mampu menghasilkan tunas. Kombinasi sitokinin dan auksin lebih efektif dalam memacu pembentukan tunas.

Dapat dilihat pada Tabel 2, bahwa rata-rata jumlah tunas setelah 4 bulan (120 hari) dipindahkan pada medium regenerasi berkisar antara 1 sampai 11,75. Pada perlakuan tiga taraf media regenerasi diperoleh perlakuan media yang optimal untuk menghasilkan tunas lebih banyak adalah kombinasi B4. Jumlah persentase terendah dihasilkan kombinasi B1. Kemungkinan yang menyebabkan jumlah tunas sedikit adalah terjadi ketidak seimbangan kembali antara zat pengatur tumbuh sitokinin yang ada di dalam sel dengan di luar sel. Kemampuan kalus untuk menghasilkan tunas, selain dipengaruhi adanya zat pengatur tumbuh maka ukuran kalus yang dipindahkan ke media regenerasi juga menjadi faktor penentu. Pada kultur anther kalus yang berukuran 2-3 mm, merupakan kalus yang terbaik untuk dipindahkan ke medium regenerasi, sedangkan kalus yang berukuran kurang dari 2 mm akan sulit beregenerasi atau mati Yoshida 1995 (Lestari & Yunita, 2008). Pada penelitian Lestari dan Yunita 2008, tentang induksi kalus dan regenerasi tunas Padi Fatmawati dilaporkan bahwa pada kalus antara 3-4 mm merupakan eksplan terbaik untuk diregenerasikan, apabila terlalu besar maka umur kalus sudah lebih dari 4 minggu sehingga kemampuan regenerasinya sudah berkurang sehingga jumlah tunas yang diperoleh sedikit.

Pengambilan data pada tahap II dilakukan selama 4 bulan. Perlu waktu lama agar tunas menjadi planlet. Dari Lampiran 12, pada analisis varian dapat dilihat bahwa tiga taraf media regenerasi berpengaruh tidak nyata terhadap planlet yang terbentuk pada kalus *Carica pubescens*. Hal ini dikarenakan planlet yang dihasilkan melalui tahap embriogenesis tidak langsung membutuhkan waktu lebih lama daripada embriogenesis langsung karena embriogenesis langsung melalui tahap induksi kalus terlebih dahulu. Pada penelitian Imelda *et al* 2008 tentang Regenerasi Tunas dari Kultur Tangkai Daun Iles-iles (*Amorphophallus muelleri* Blume). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa sekitar satu minggu setelah dikulturkan, potongan tangkai daun mulai membengkak pada salah satu ujungnya, atau kadangkadang pada kedua ujungnya. Dalam perkembangan selanjutnya, dari bagian yang membengkak tersebut terbentuk tonjolan-tonjolan kecil yang kemu-

dian tumbuh menjadi bakal tunas melalui proses organogenesis dalam waktu 8-9 minggu. Sedangkan pada penelitian ini, induksi kalus dilakukan selama 6 minggu dan muncul tunas sekitar 4 minggu kemudian.

## SIMPULAN

Berdasarkan uraian pembahasan dapat ditarik simpulan sebagai berikut: (1) Jenis dan konsentrasi ZPT berpengaruh terhadap induksi kalus embriogenik pada media ½ MS dari eksplan daun *C. pubescens*, khususnya pada parameter persentase pembentukan kalus dan berat kalus. (2) Jenis dan konsentrasi ZPT berpengaruh terhadap regenerasi planlet dari kalus embriogenik *C. pubescens*, khususnya pada parameter persentase kalus membentuk tunas dan parameter jumlah tunas. (3) Interaksi yang paling optimal untuk induksi kalus embriogenik *C. pubescens* adalah persentase pembentukan kalus dan berat kalus dalam media perlakuan yang mengandung 2,4-D 3 mg/l+thidiazuron 1 mg/l. sedangkan untuk regenerasi planlet *C. pubescens* media yang paling optimal dalam menginduksi tunas adalah media yang mengandung BAP 4 mg/l dalam media MS yang mengandung NAA 0,2 mg/l.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amalia, A. R. (2010). *Pembentukan Kalus Embriogenik dari Tunas Lateral Karika Dieng dalam Media In vitro dengan Penambahan BA dan NAA*. Skripsi. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Arifantika, D. (2010). *Penggunaan Naphthalene Acetic Acid dan Benzyl Adenine untuk Memacu Pertumbuhan Kalus Karika dari Eksplan Antera pada Keadaan Gelap dan Terang*. Skripsi. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Chang, C. & Chang, W. (2000). Effect thidiazuron on bud development of *Cymbidium sinensis* WilldWilld in vitro. *Plant Growth Regeneration*, 30, 171-175.
- Damayanti, D., Sudarsono, Mariska, I. & Herman M. (2007). Regenerasi Pepaya melalui Kultur In Vitro. *Jurnal AgroBiogen*, 3(2), 49-54.
- Fikriati, U. I. (2009). *Induksi Kalus dari Eksplan Daun Karika Dieng dengan Pemberian Zat Pengatur Tumbuh BA dan NAA*. Skripsi. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Fitriani, H. (2008). *Kajian Konsentrasi BAP dan NAA terhadap Multiplikasi Tanaman Artemisia annua L. secara In Vitro*. Skripsi. Surakarta : Fakultas Pertanian UNS.
- Gill, N. K., Gill, R. & Gisal, S. S. (2004). Factors enhancing somatic embryogenesis and plant regeneration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Indian Journal. Biochem*, 3, 119-123.
- Gunawan, L. W. (1995). *Teknik Kultur In Vitro dalam*

- Hortikultura*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- George, E. F. & Sherrington, P. D. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. England: Exegenetic Limited.
- Hidayat, S. (2000). *Prospek pepaya gunung (Carica pubescens Lenne & K. Koch) dari pegunungan Sikunang Dieng, Wonosobo*. UPT Balai Pengembangan Kebun Raya LIPI, Bogor: 89-95.
- Hendaryono, D. P. S. & Wijayani, A. (1994). *Teknik Kultur Jaringan : Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman Secara Vegetatif Modern*. Yogyakarta: Kanisius.
- Imelda, M., Wulansari, A. & Poerba, Y. S. (2008). Regenerasi Tunas dari Kultur Tangkai Daun Iles-Iles (*Amorphophallus muelleri* Blume). *Biodiversitas*, 9(3), 173-176.
- Lestari, E. G. & Yunita, R. (2008). Induksi kalus dan regenerasi tunas padi varietas Fatmawati. *Bul. Agron*, 36(2), 106-110.
- Mattjik, A. A. & Sumertajaya, I. M. (2002). *Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab Jilid 1 Edisi ke2*. Bogor: IPB Press.
- Lestari, E. G. & Yunita, R. (2008). Induksi Kalus dan Regenerasi Tunas Padi Varietas Fatmawati. *Bul. Agron*, 36(2), 106-110.
- Nguyen, T. L. & Ngo T. H. (2006). Using biotechnological approaches for vanda orchid improvement. *Delta Rise Research Institute, Vietnam: Omonrise*, 14, 140-143.
- Pierik, R. L. M. (1987). *In Vitro Culture of Higher Plants*. Dordrecht, Netherland: Martinus Nijhoff Publisher.
- Rahayu, E. S. & Habibah, N. A. (2009). *Buku Ajar Kultur Jaringan Tumbuhan*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Riyadi, I. & Tirtoboma. (2004). Pengaruh 2,4-D terhadap Induksi Embrio Somatik Kopi Arabika. Bogor : *Buletin Plasma Nutfah*, 10(2), 82-89.
- Ruswaningsih, F. (2007). *Pengaruh Konsentrasi Ammonium Nitrat dan BAP terhadap Pertumbuhan Eksplan Pucuk Artemisia annua L. pada Kultur In Vitro*. Skripsi. Surakarta : Fakultas Pertanian UNS.
- Santoso, U. & Nursandi, F. (2004). *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang Press.
- Sastrosupadi, A. (1995). *Rancangan Percobaan Praktis untuk Bidang Pertanian*. Yogyakarta : Kanisius.
- Syahid, S. F. & Kristina, N. N. (2007). Induksi dan regenerasi kalus Keladi tikus (*Typonium flagelliforme*. Lodd.) secara *in vitro*. *Jurnal Littri*, 13(4), 142-146.
- Srinivasan, M., Nachiappan, V. & Rajasekharan, R. (2006). Potential application of urea-derived herbisides as cytokinins in plant tissue culture. *J. Biosci*, 31(5), 599-605.
- Turhan, H. (2004). Callus Induction and Growth in Transgenic Potato Genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 3(8), 375-378.
- Widiarso, M. (2010). *Kajian Penggunaan BAP dan IBA untuk Merangsang Pembentukan Tunas Lengkeng (Dimocarpus longan Lour) Varietas Pingpong secara In Vitro*. Skripsi. Surakarta : Fakultas Pertanian UNS.