

INDUKSI KALUS EMBRIOGENIK TANAMAN TEBU (*SACCHARUM OFFICINARUM* L.) PADA BERBAGAI KOMBINASI 2,4D DAN BAP SECARA IN VITRO

*Induction of Embryogenic Callus in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) in Various Combinations of 2.4D and BAP Through in Vitro*

Riski Busaifi, Hirjani

Staf Pengajar Fakultas Pertanian Universitas Nahdlatul Wathan Mataram

Jl. Kaktus 1-3 Mataram

e-mail: qq_chilli@yahoo.com

ABSTRAK

Untuk mendukung program pemerintah tentang produksi tujuh komoditas Strategi Nasional yakni beras, jagung, kedelai, daging sapi, bawang merah, cabai merah, dan gula pasir. Perbanyakan tanaman tebu dalam jumlah banyak secara cepat dapat dilakukan dengan menggunakan metode perbanyakan melalui induksi kalus. Induksi kalus memiliki presentase hasil yang lebih tinggi dan sangat dipengaruhi keberhasilannya oleh pembentukan kalus embriogenik. Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan faktor yang paling mempengaruhi perkembangan kalus embriogenik menjadi embrio somatik. Kombinasi antara Auksin dan Sitokinin mempunyai peran penting untuk menginduksi kalus dimana 2,4 D dan BAP merupakan kombinasi yang digunakan dalam perbanyakan tanaman secara in-vitro. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menemukan metode in vitro yang cepat untuk tebu melalui induksi kalus embriogenik. Eksplan yang digunakan dari gulungan daun muda diisolasi dari tanaman tebu yang sehat berasal dari lapang kemudian ditumbuhkan pada media MS dengan kombinasi 2,4-D (0, 2, 4, dan 6 ppm) dan BAP (1, 2, dan 3 ppm) untuk menginduksi kalus embriogenik. Variabel yang diamati meliputi saat pelengkungan daun (hari), persentase saat pelengkungan daun, saat pembengkakan (hari), persentase saat pembengkakan, serta Tampilan fisik kalus seperti warna dan strukturnya. Luaran penelitian ini dapat berupa publikasi ilmiah pada jurnal lokal dan *bahan ajar* untuk pembelajaran pada mata kuliah Kultur Jaringan Tanaman.

ABSTRACT

To support the government's program on the production of seven National Strategy commodities, namely rice, corn, soybeans, beef, shallots, red chili, and granulated sugar. Multiplication of sugar cane in large quantities quickly can be done using the method of propagation through callus induction. Callus induction has a higher yield percentage and is strongly influenced by its success by embryogenic callus formation. Growth regulating substances (ZPT) are the factors that most influence the development of embryogenic callus into somatic embryos. The combination of Auxin and Cytokinin has an important role to induce callus where 2,4 D and BAP is a combination used in in vitro plant propagation. The purpose of this research is to find a fast-in vitro method for sugarcane through the induction of embryogenic callus. Explants used from young leaf rolls isolated from healthy sugarcane plants from the field were then grown on MS media with a combination of 2,4-D (0, 2, 4, and 6 ppm) and BAP (1, 2, and 3 ppm) to induce embryogenic callus. Variables observed included leaf curvature (days), percentage of leaf curvature, swelling (days), percentage of swelling, and physical appearance of callus such as color and structure. The output of this study can be in the form of scientific publications in local journals and teaching materials for learning in Plant Tissue Culture courses.

Kata Kunci: *in vitro*, induksi kalus, tebu, embriogenik, *Saccharum officinarum* L.

Keywords: *in vitro*, induction of callus, sugar cane, embryogenic, *Saccharum officinarum* L.

AGROSAINS, ISSN 2407- 6287

, eISSN 2598- 4179

Volume 5, Nomor 2

PENDAHULUAN

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman penting yang bernilai ekonomi tinggi di berbagai negara, terutama di negara berkembang yang beriklim tropis seperti Indonesia karena kandungan gulanya yang tinggi pada bagian batangnya. Batang tebu dimanfaatkan terutama sebagai bahan dasar utama dalam industri gula dan bahan baku industri lainnya seperti farmasi, kimia, pakan ternak, pupuk, jamur, dan lain-lain. Oleh sebab itu, pemerintah Indonesia memasukkan tanaman tebu sebagai salah satu dari tujuh komoditas Strategi Nasional yakni beras, jagung, kedelai, daging sapi, bawang merah, cabai merah, dan gula pasir. Farid (2003) menyatakan bahwa, pengembangan industri gula saat ini tidak hanya berperan penting dalam pertumbuhan perekonomian negara, tetapi juga berkaitan langsung dengan pemenuhan kebutuhan pokok rakyat.

Untuk merealisasikan komoditas Strategi Nasional tersebut maka pemerintah Nusa Tenggara Barat (NTB) ikut serta dengan memprogramkan tanaman tebu sebagai komoditi unggulan NTB dalam bidang perkebunan serta adanya perusahaan gula yang sedang dikembangkan sejak tahun 2015 oleh pemerintah NTB. Dengan adanya pabrik gula membuat kebutuhan akan bibit unggul tanaman tebu semakin meningkat.

Hal ini membutuhkan bibit dalam jumlah yang besar dan pertumbuhan yang

seragam dalam waktu yang singkat. Untuk itu diperlukan suatu metode perbanyakan yang dapat memecahkan permasalahan bibit, salah satunya melalui metode *in vitro*. Metode ini dapat menghasilkan bibit dalam jumlah yang besar tanpa memerlukan jumlah induk yang banyak, waktu yang relatif singkat dan bibit yang dihasilkan bebas patogen. Metode ini banyak digunakan untuk menciptakan variasi genetik yang disebut variasi somaklonal. Kultur *in-vitro* pada dasarnya merupakan suatu sistem pertumbuhan sel-sel sebelum berdiferensiasi (kalus dan suspensi), sehingga mampu menghasilkan tanaman baru.

Regenerasi tanaman dapat dilakukan melalui dua cara yaitu organogenesis (melalui pembentukan organ langsung dari eksplan) dan *embryogenesis somatic* (Purnamaningsih, 2006). Kalus dapat dihasilkan dari semua bagian tanaman seperti akar, batang dan daun, tetapi organ yang berbeda memberikan pembentukan kalus yang berbeda pula (Musa dan Munir, 2002).

Embriogenesis somatik merupakan perkembangan sel-sel somatik (yaitu sel-sel tubuh seperti batang, daun, dan lainnya baik haploid maupun diploid) menjadi tumbuhan dengan membentuk embrio namun tanpa melalui fase menyatunya gamet (Suprasanna *et al*, 2005). Embriogenesis somatik terbagi menjadi dua jalur yaitu secara langsung dan tidak langsung. Embriogenesis somatic secara langsung terbentuk tanpa melewati fase

pengkalusan, sedangkan embriogenesis somatik secara tidak langsung terbentuk melalui fase pengkalusan (Percy *et al*, 2000). Williams dan Maheswaran (1986) menyebutkan bahwa biasanya hanya sejumlah kecil embrio somatik yang berhasil didapatkan melalui embriogenesis somatik secara langsung. Namun berbeda dengan embriogenesis somatik secara tidak langsung, hasil embrio somatik tinggi telah dilaporkan pada embriogenesis somatic secara tidak langsung. Perkembangan embriogenesis somatic terbagi menjadi dua tahap utama, yaitu diferensiasi sel somatic menjadi sel kompeten embriogenik kemudian berproliferasi sebagai sel embriogenik. Fase utama kedua yaitu sel embriogenik tersebut menunjukkan kompetensi embriogeniknya dan berdiferensiasi menjadi embrio somatik (Jimenez, 2001). Keberhasilan embriogenesis somatik tidak langsung dapat tercapai dengan terbentuknya kalus embriogenik.

Kemampuan kalus untuk beregenerasi sangat ditentukan oleh media yang digunakan dan komposisi zat pengatur tumbuh dalam media. Winata (1987) menyatakan bahwa dua golongan zat pengatur tumbuh yang sangat penting dalam kultur jaringan tanaman adalah auksin dan sitokinin. George dan Sherrington (1984), menyatakan bahwa inisiasi tunas dan akar diatur oleh interaksi auksin dan sitokinin yang diberikan ke dalam media. Demikian juga interaksi masing-masing auksin atau

sitokinin eksogen dengan auksin dan sitokinin endogen yang dikandung oleh eksplan. Hal ini diperkuat dengan beberapa penelitian yang menggunakan kombinasi zpt. Kombinasi antara BAP dan 2,4D pada kalus jarak pagar dengan hasil yang optimal (Andaryani, 2010). Menurut Indah dan Dini (2013) mengatakan bahwa kombinasi 0,5pp, 2,4 D + 2 ppm BAP kombinasi paling optimum dan menumbuhkan kalus daun nyamplung dengan berat segar 19,78.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari pemberian kombinasi 2,4D dan BAP pada induksi kalus embriogenik tanaman tebu

METODOLOGI PENELITIAN

Waktu dan tempat

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Agustus 2018 sampai Februari 2019 bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan BPTP Nrmada, Lombok Barat NTB.

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam melaksanakan penelitian ini yaitu: *laminar air flow cabinet* (L AFC), autoklaf, kompor gas, botol kultur, alat disetting set (pinset, skalpel), rak dorong, rak penyimpanan media, petridish, erlenmeyer, gelas ukur, handsprayer, lampu bunsen, gunting, beaker glass, timbangan digital, timbangan analitik, hot plate, magnetik stirrer, pH meter, kulkas, pipet tetes, pipet, pipet mikro, poci ukur, panci, spatula, shaker, sendok, alat pencuci,

stopwatch, ember, sprayer, alat tulis dan kamera.

Bahan-bahan yang digunakan pembuatan media perlakuan: media MS, zpt 2,4D dan BAP dengan beberapa konsentrasi, alluminium foil, tunas mikro kentang varietas Margahayu, alkohol 70% dan 96%, mata pisau, tissu steril, tissu gulung, air bersih, spiritus, plastik wrapping, korek api, kertas label, spidol, kertas saring.

Pelaksanaan Penelitian

Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 15-17 psi dan temperatur 121oC selama 20 menit. Alat-alat yang disterilisasi dengan menggunakan autoklaf, ialah tabung reaksi berisi media MS + perlakuan, scalpel, dan pinset yang telah terbungkus alluminium foil serta peralatan berupa glass ware disungkup kertas hanya pada bagian terbuka. Laminar Air Flow Cabinet dibersihkan dengan menggunakan alkohol 90 % dan lampu UV untuk membersihkan sumber-sumber kontaminan.

Pembuatan larutan stok (larutan persediaan) hara media MS

Pembuatan larutan stok hara dimaksudkan mempermudah membuat larutan hara dalam konsentrasi yang diinginkan dengan jumlah timbangan hara yang sedikit. Komposisi berbagai macam hara telah tercantum dalam tabel pada lampiran.

Pembuatan stok hara sebagai berikut: menyiapkan alat dan bahan, melakukan identifikasi bahan kimia, menimbang bahan kimia sesuai dengan kebutuhan, mengambil erlenmeyer lalu memasukkan air 1/3 bagian beserta kapsul pengaduk, kemudian letakkan diatas hot plate magnetic stirrer. Hidupkan hot plate magnetic stirrer, tunggu hingga larutan larut secara homogen. Matikan hot plate magnetic stirrer, kemudian angkat larutan dari atas hot plate magnetic stirrer dan masukan larutan kedalam gelas ukur untuk ditera sampai volume larutan 100 ml. Setelah ditera, tuangkan kedalam erlenmeyer 200 ml, kemudian letakkan di atas hot plate magnetic stirrer. Hidupkan hot plate magnetic stirrer sampai larutan tercampur, kemudian tuangkan lagi/campurkan dengan larutan bahan kimia lainnya, tunggu hingga larutan homogen selama 2 menit. Kemudian matikan hot plate magnetic stirrer dan angkat larutan, kemudian tuangkan lagi kedalam gelas ukur 500 ml untuk ditera sampai volume 200 ml. Masukan ke dalam botol jars (tutup), kemudian masukan ke dalam lemari es.

Pembuatan stok (larutan persediaan) 2,4D dan BAP.

Mengambil dengan pipet 2,4D dengan kandungan bahan aktif sebesar sebesar 1 mg, kemudian dilarutkan dalam akuades sebanyak 1000 ml dengan magnetik stirer (lampiran 3). Larutan disimpan dalam lemari pendingin.

Pembuatan media MS + perlakuan

Pembuaan media MS menurut Helgeson (1979 dalam Rina 2009) sebanyak 1,8-liter, 500 ml akuades dituangkan dalam beaker glass 2-liter, 48 g sukrosa ditimbang kemudian ditambahkan pada akuades sambil diaduk sampai larut. Lalu ditambahkan larutan stok A, B, G, H C, D, E, F masing-masing 10 ml/l atau 5 ml/l sesuai kepekatan stok yang tersedia, Volume larutan dijadikan mendekati 1-liter ukur sampai angka pH 5,6 – 5,8. Penambahan HCl 1 M, jika terlalu basa dan penambahan KOH, jika terlalu asam. Media ditepatkan menjadi 1-liter dengan menambahkan akuades. Kemudian media dituang ke dalam panci, ditambahkan agar 9,6 gram, dipanaskan hingga agar larut, dan tampak bening. Menambahkan dalam masing-masing beaker glass perlakuan masing-masing konsentrasi 2,4D dan BAP. Menuang media + perlakuan dalam tabung reaksi sebanyak 15 ml, kemudian disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121oC selama 20 menit.

Inokulasi Eksplan Tebu

1. Penyiapan alat dan bahan yang digunakan
2. Pemilihan eksplan mulai pucuk sepanjang 40-60 cm
3. Dipotong dari bagian bawah hingga terlihat batas antar ruas yang keras dan batasan gulungan daun muda pada batang sehingga muncul warna kuning
4. Dipotong dari batas bawah yang terlihat warna kuning sekitar 20 cm ke atas
5. Cuci menggunakan air bersih

6. (Sterilisasi dalam Laminar) merendam pada alkohol 70% selama 2 menit.
7. Merendam pada larutan HgCl 0,2% selama 4menit diulang sebanyak 2 kali
8. Merendam menggunakan aquades steril selama 4 menit diulang sebanyak 2 kali
9. Membuka lapisan hingga eksplan yang digunakan berdiameter 0.3-0.5 cm menggunakan pinset
10. Potong mulai dari bagian bawah yang paling muda sepanjang 0.2 cm
11. Tanam pada media MS + 2,4 D 3 ppm + air Kelapa 10% dengan 3 eksplan/ botol
12. Pemberian label nama penanam, komoditas tanaman, tanggal penanaman
13. Simpan pada rak penyimpanan di ruang pertumbuhan
14. Bersihkan alat dan ruangan yang telah digunakan

Rancangan Penelitian

Kegiatan ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh 2,4D dan BAP dalam memacu induksi kalus embriogenik tanaman tebu. Penelitian ini disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL)

Rancangan yang digunakan adalah rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 (dua) faktor yaitu 4 konsentrasi 2,4D dan 3 konsentrasi BAP. Penelitian ini terdapat 12 (dua belas) perlakuan dan 3 (tiga) ulangan. Setiap ulangan terdiri dari 2 botol. Jadi keseluruhan eksplan yang digunakan berjumlah $12 \times (3 \times 4) = 144$ eksplan.

Penempatan sampel dilakukan secara acak agar semua sampel untuk berbagai konsentrasi paclobutrazol mendapat kondisi yang sama. Perlakuan dalam penelitian ini, sebagai berikut:

Faktor I:

P1 = 0 ppm 2,4D (kontrol)

P2 = 2 ppm 2,4D

P3 = 4 ppm 2,4D

P4 = 6 ppm 2,4D

Faktor II:

B1 = 1 ppm BAP

B2 = 2 ppm BAP

B3 = 3 ppm BAP

Tabel 1 Perlakuan Konsentrasi 2,4D dan BAP

Perlakuan	B1	B2	B3
P1	P1B1	P1B2	P1B3
P2	P2B1	P2B2	P2B3
P3	P3B1	P3B2	P3B3
P4	P4B1	P4B2	P4B3

Variabel Penelitian

Pengamatan dilakukan sejak awal induksi kalus hingga percobaan berakhir.

Variabel yang diamati meliputi:

1. Induksi Pembentukan kalus (hari). Pembentukan kalus diamati setiap hari setelah Inokulasi sampai terjadinya pelengkungan
2. Saat pembengkakan/Pertumbuhan kalus (hari). Pertumbuhan kalus diamati setiap dua hari sekali setelah

inokutanam sampai terjadinya pembengkakan.

3. Morfologi Kalus: Morfologi kalus berupa visualisasi dari kalus yakni warna dan struktur dari kalus, di mana diamati dengan langsung melihat visualisasi dari kalus

Tampilan fisik kalus seperti warna dan strukturnya diperkirakan secara visual pada akhir tahapan induksi kalus sebelum transplantasi ke media regenerasi

4. Bobot segar. Berat atau bobot dari kalus dengan ditimbang tiap sampel

Analisis Data

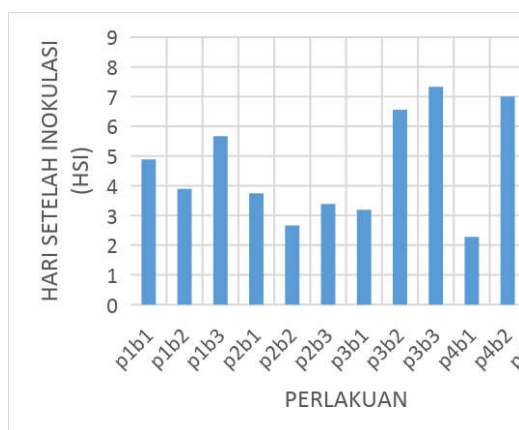
Data yang diperoleh seperti; induksi pembentukan kalus, pertumbuhan kalus, morfologi kalus, dan berat segar kalus dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembentukan Kalus

Munculnya kalus pada eksplan ditandai dengan munculnya jaringan berwarna putih bening seperti lendir pada bekas irisan eksplan dan sayatan di permukaan eksplan yang kemudian berkembang menjadi bulatan-bulatan kecil yang jelas.

Konsentrasi 2,4D	Konsentrasi BAP		
	B1	B2	B3
P1	5	4	6
P2	4	3	3
P3	3	7	7
P4	2	7	8



Gambar 1. Grafik pembentukan kalus untuk hari setelah inokulasi

Perlakuan 2,4-D 6 ppm dengan BAP 1 ppm menghasilkan inisiasi kalus dengan waktu tercepat yaitu 2 HSI (hari setelah inokulasi), dan juga untuk perlakuan dengan penambahan 2,4-D 2 ppm yang dikombinasikan dengan BAP 1; 2; 3, di mana bila dibandingkan dengan perlakuan yang lain.

Berdasarkan gambar 1 di atas, dapat disimpulkan bahwa penambahan 2,4-D yang tinggi yaitu 2 ppm dan atau lebih baik dengan diikuti penambahan BAP 1,2 dan 3 ppm menghasilkan rerata saat inisiasi kalus yang cepat. Sedangkan perlakuan dengan konsentrasi 2,4-D yang rendah akan mengakibatkan inisiasi kalus semakin lambat. Yelnititis (2012), mengatakan bahwa pembentukan kalus dari eksplan daun ramin membuktikan bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang digunakan, induksi kalus semakin cepat terjadi karena 2,4-D lebih mudah berdifusi ke dalam jaringan tanaman akibat adanya luka irisan sehingga 2,4-D yang

ditambahkan akan membantu auksin endogen untuk menstimulasi atau merangsang pembelahan sel terutama sel disekitar area luka.

Keberhasilan eksplan dalam merespon komposisi media untuk menginisiasi kalus juga tergantung pada kondisi eksplan. Bakti (2005) menyatakan bahwa musim ketika eksplan diambil, kualitas tanaman keseluruhan, kondisi aseptik media dan eksplan, ukuran eksplan dan umur fisiologis tanaman mempengaruhi keberhasilan kultur. Keberhasilan untuk menginduksi kalus lebih besar bila eksplan yang digunakan bersifat meristematik (aktif membelah).

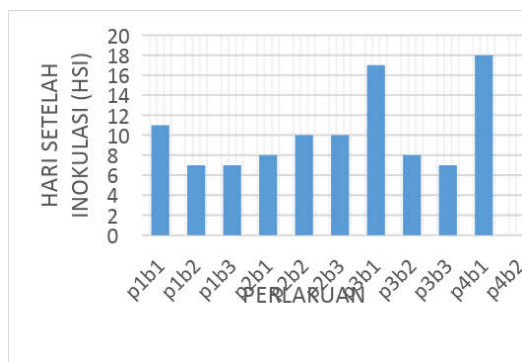
Pertumbuhan Kalus

Salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro* adalah munculnya kalus pada eksplan. Pada penelitian ini, kalus pertama kali terbentuk pada sayatan eksplan yang kontak dengan media. Diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian sayatan eksplan bergelombang (*swelling*). Kalus yang dihasilkan melalui kultur secara *in vitro* terbentuk karena adanya perlukaan pada jaringan dan respon terhadap zat pengatur tumbuh (ZPT). Munculnya kalus pada bagian yang terluka diduga karena adanya rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi lukanya.

Konsentrasi

Konsentrasi BAP

2,4D	B1	B2	B3
P1	11	7	7
P2	8	10	10
P3	17	8	7
P4	18		



Pada Gambar 2 menunjukkan bahwa kalus tumbuh pada beberapa perlakuan. Beberapa dari perlakuan tersebut juga tidak dapat menghasilkan atau tumbuhnya kalus. Kalus yang tidak tumbuh ini dimungkinkan karena kombinasi ZPT pada media belum mampu menumbuhkan kalus, dengan kata lain eksplan mempunyai kandungan sitokinin dan auksin endogen yang rendah, sehingga masih membutuhkan tambahan sitokinin eksogen yang lebih banyak pada media kultur.

Morfologi Kalus (Tekstur Dan Warna)

Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* berupa warna dan tekstur kalus menggambarkan penampilan *visual* kalus sehingga dapat diketahui kalus yang masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda. Kualitas kalus yang baik sebagai penghasil senyawa metabolit

sekunder yaitu mempunyai ciri-ciri warna dan tekstur yang sesuai dengan metabolit sekunder yang diinginkan.

Tabel 2 Struktur kalus yang terbentuk pada eksplan tebu dari beberapa taraf konsentrasi antara 2,4-D dan BAP.

Konsentrasi 2,4 D (ppm)	Konsentrasi BAP (ppm)		
	1	2	3
0	Kompak	Kompak	Kompak
2	Kompak	Kompak	Remah
4	Kompak	Kompak	Remah
6	Remah		

Berdasarkan tekstur dan komposisi selnya, kalus dapat dibedakan menjadi kalus yang kompak dan remah. Kalus kompak mempunyai tekstur padat dan keras, yang tersusun dari sel-sel kecil yang sangat rapat, sedangkan kalus remah mempunyai tekstur lunak dan tersusun dari sel-sel dengan ruang antar sel yang banyak. Perbedaan struktur kalus menimbulkan adanya perbedaan kemampuan memproduksi metabolit sekunder.

Kalus yang baik untuk digunakan sebagai bahan penghasil metabolit sekunder yaitu memiliki tekstur kompak (*non-friable*). Tekstur kalus yang kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak.

Pada table 1 menunjukkan bahwa semua perlakuan yang terbentuk kalus dominan membentuk kalus bertekstur

kompak. Terbentuknya kalus yang bertekstur kompak menurut (Andaryani, 2010) dipacu oleh adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan yang telah tumbuh membentuk kalus tersebut. Pemberian zat pengatur tumbuh dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder, hal ini disebabkan ZPT yang ditambahkan dapat menyebabkan perubahan fisiologi dan biokimia tumbuhan melalui pengaturan kerja enzim. ZPT berperan dalam pengikatan membran protein yang berpotensi untuk aktivitas enzim. Hasil pengikatan ini mengaktifkan enzim tersebut dan mengubah substrat menjadi beberapa produk baru. Produk baru yang terbentuk ini menyebabkan serentetan reaksi-reaksi sekunder salah satunya adalah pembentukan metabolit sekunder (Wardani, *et al*, 2004).

Beberapa pendapat mengatakan bahwa kalus yang berkualitas adalah kalus yang berwarna hijau. Menurut Fatmawati (2008), warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, sehingga semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya.

Tabel 3 Warna kalus eksplan Tebu pada beberapa taraf konsentrasi 2,4-D dan BAP secara in vitro.

Konsentrasi	Warna Kalus
2,4 D	Konsentrasi BAP (ppm)
(ppm)	

	1	2	3
0	Hijau	Hijau	Hijau
2	Hijau	Hijau	Kuning
4	Hijau	Hijau	Kuning
6	Hijau		

Pada tabel 2, menunjukkan warna yang terlihat pada kalus tebu berbeda. Perbedaan warna yang terjadi pada kalus menunjukkan tingkat perkembangan kalus yang berbeda-beda pula, hal ini dipengaruhi oleh konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan oleh media tumbuh. Hampir semua perlakuan menunjukkan warna hijau pada kalus yang terbentuk. Warna hijau pada kalus adalah akibat efek sitokinin dalam pembentukan klorofil. Menurut Wattimena (1991), sitokinin berperan dalam memperlambat proses senesensi (penuaan) sel dengan menghambat perombakan butir-butir klorofil dan protein dalam sel.

Pada penambahan sitokinin dengan konsentrasi yang semakin meningkat cenderung menunjukkan warna hijau (cerah) pada kalus lebih tahan lama (Hanifah, 2007). Kalus dengan warna yang hijau tidak hanya dimungkinkan mengandung banyak pigmen klorofil akan tetapi, kalus yang terbentuk juga memiliki ukuran cukup besar yang menandakan bahwa kalus beregenerasi dengan baik dan sel-selnya masih aktif membelah.

Selama masa perkembangannya kalus yang semakin lama berada pada media tanam akan mengalami degradasi fisiologis atau penurunan tingkat fisiologi tanaman akibat kekurangan unsur hara atau hormon tumbuhnya. Hal ini biasa ditandai dengan perubahan warna dari cerah menjadi kecoklatan (*browning*). Peristiwa pencoklatan terjadi akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat toksik, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan, yang menghambat pertumbuhan atau bahkan kematian jaringan (Yusnita, 2004). Selain menandakan terjadinya sintesis senyawa fenol, warna coklat disebabkan oleh semakin bertambahnya umur sel atau jaringan kalus. Konsentrasi yang tinggi oleh 2,4-D dan tidak adanya penambahan sitokinin dalam media juga mampu memacu terjadinya *senesensi* yang dapat menghambat proses pertumbuhan kalus.

Bobot Segar Kalus

Minimnya bobot segar kalus yang terbentuk pada rata-rata perlakuan lebih banyak disebabkan karena eksplan hanya menghasilkan kalus berupa lendir dan berair yang belum berkembang serta akibat eksplan *browning*. Eksplan yang mengalami mati fisiologis dan *browning* mengakibatkan kematian jaringan sehingga tidak mampu memproduksi kalus. Lizawati (2012), mengatakan bahwa peristiwa *browning* pada kalus akibat adanya metabolisme senyawa

fenol yang bersifat toksik dan dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kematian jaringan. Hal ini merupakan tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan dan juga menandakan terjadinya sintesis senyawa fenol dalam botol kultur.

Konsentrasi 2,4D	Konsentrasi BAP		
	B1	B2	B3
P1	0.782	0.371	0.128
P2	0.437	0.202	0.293
P3	0.188	0.066	0.057
P4	0.129		

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian 2,4-D yang cukup tinggi mampu mengurangi penggunaan BAP pada media dan menghasilkan induksi dan proliferasi kalus yang optimal. Perlakuan 2,4-D 2 ppm dengan BAP 0 ppm mampu menginisiasi kalus dengan baik, banyak, inisiasi yang cepat dan efisien (optimal).

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan variasi konsentrasi ZPT yang berbeda untuk menghasilkan kalus tebu yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

Andaryani, S. 2010. Kajian Berbagai konsentrasi BAP dan 2,4D terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha*

- curcas L.) secara In Vitro. Skripsi. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Bakti, C. 2005. Embriogenesis Somatik Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) Pada Berbagai Zat Pengatur Tumbuh. Tesis. Pascasarjana IPB. Bogor
- Blackburn, F. 1984. Sugar Cane. Logman Group. London. Jimenez VM. 2001. Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. R. Bras. Fisiol. Veg. 13(2):196-223.
- D.P. Wardani, Solichatun dan A.D. Setyawan, "Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. Pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin, "Biofarmasi, Vol. 2, No. 1 (2004) 35-43.
- E.F. George and P.D. Sherrington, Plant Propagation by Tissue Culture, England: Exegetis Limited (1984).
- Farid, M.B. 2003. Perbanyakan tebu (*Saccharum officinarum* L.) secara in vitro pada berbagai konsentrasi IBA dan BAP. J. Sains dan Teknologi 3(3):103- 109.
- Gray, D.J. 2005. Propagation from nonmeristematic tissue: nonzygotic embryogenesis. 187-200. In : R.N. Trigiano and D.J. Gray (Eds). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. United States of America.
- George, E. F., and P. D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetic Limited. London
- Gunawan, L.W. 1995. Teknik Kultur in Vitro dalam Hortikultura. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Indah, PN dan Dini E. 2013 Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) pada Beberapa Kombinasi konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). Jurnal Sains dan Seni Pomits. Vol 2(1).
- Lizawati. 2012. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Tunas Apikal Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan Penggunaan 2,4-D dan TDZ. *Menara Perkebunan FP* Universitas Jambi 1(2): 75-87.
- Musa, Y dan Munir (2002). Pembiakan In Vitro dari beberapa varietas tebu (*Saccharum officinarum* L.) di PTP XIV, Gula Takalar, Sulawesi Selatan. Internal Report, PTP XIV Nusantara.IV Agronomis.
- Percy RE, K Klimaszweska and DR Cyr. 2000. Evaluation of Embriogenesis Somatic for Clonal Propagation of Western White Pine. NRC Research Press. Canada.
- Purnamaningsih, R. 2006. Induksi Kalus dan Optimasi Regenerasi Empat Varietas Padi Melalui Kultur in Vitro. Jurnal AgroBiogen Vol. 2 (2): 74-80.
- Rina, S. 2009. Penggunaan Paclobutrazol Terhadap Pertumbuhan Minimal Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Secara In Vitro. Surabaya: Universitas Negeri Surabaya.
- Rusdianto dan A Indrianto. 2012. Induksi kalus embriogenik pada wortel (*Daucus carota* L.) menggunakan 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). Jurnal Bionature.13 (2):136-140.
- S. Andaryani, "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 (2010).

- Santoso, U dan F Kurnia. 2003. Kultur Jaringan Tanaman. Yogyakarta: Universitas Muhammadiyah Malang Press.
- Santoso, U dan Nursandi, F. 2001. Kultur Jaringan Tanaman. Universitas Muhammaiya Malang: Malang.
- Suprasanna P, RS Choudhary, NS Desai and VA Bapat. 2005. Regulation of somatic embryogenesis by plant growth regulators in sugarcane. Sugar Tech 7(4):123-128.
- Williams EG and Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. Ann Botany 57:443- 462.
- Winata, L. 1987. Teknik Kultur Jaringan Tanaman. Lab. Kultur Jaringan. PAU Bioteknologi Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor.
- Yelnititis. 2012, Pembentukan Kalus Remah dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.). *J. Pemuliaan Tanaman Hutan*. 6(3): 181-194.