

Induksi dan Multiplikasi Kalus *Eucalyptus* sp. pada Berbagai Media *Callus Induction Medium* (CIM) Secara *In Vitro*

BARAELA EZRA WIJAYA, RINDANG DWIYANI,
NI NYOMAN ARI MAYADEWI*)

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Jln. PB. Sudirman Denpasar Bali 80232, Indonesia

*)Email: arimayadewi@unud.ac.id

ABSTRACT

Callus Induction and Multiplication of *Eucalyptus* sp. on Various Media *Callus Induction Medium* (CIM) *In Vitro*. Callus induction in vitro can be done by planting specific part of plant such as leaf, root, stem, etc in aseptic condition by using medium that contains 2,4-D, a plant regulator for promoting callus formation. One of the objectives of callus production in vitro is to form secondary metabolites, because eucalyptus is known as a producer of essential oils. This research is an initial study for in vitro production of secondary metabolites for further research. The aim of this study was to determine the most suitable callus induction medium for callus formation and callus multiplication for *Eucalyptus* grown in vitro. This research was designed as a Completely Randomized Design (CRD), five treatments, repeated five times. Woody Plant Medium (WPM) was used as the basic media. Several Callus induction Medium (CIM) were used as treatments, i.e. CIM₁ = 1 ppm 2,4-D; CIM₂ = 1,5 ppm 2,4-D; CIM₃ = 2 ppm 2,4-D; CIM₄ = 1 ppm NAA+1 ppm BAP; and CIM₅ = 2 ppm NAA+ 2 ppm BAP. Variables observed were the time of curly leaf formation, time of the emerging callus, colour and texture of the callus, callus's weight, callus surface area, the weight of callus after multiplication. The result showed that CIM₄ and CIM₅ had the fastest emerging callus (7 days after planting), CIM₁ and CIM₂ formed green and crumb texture of callus, CIM₁ produced the highest of callus's weight, and CIM₂ resulted in the highest of callus's surface area. In conclusion, the most suitable CIM for callus induction was CIM₁, while for callus multiplication was CIM₂.

Keywords: Callus induction, callus multiplication, BAP, NAA, 2,4-D

PENDAHULUAN

Eucalyptus sp. atau ampupu adalah salah satu jenis tanaman berkayu yang dibudidayakan dengan tujuan untuk diolah menjadi tissue, kertas, mebel, dan

pulp. *Eucalyptus* sp. memiliki sifat *fast growing*, daya adaptasi terhadap iklim dan tempat tumbuh yang tinggi, daur hidup yang pendek (5-6 tahun), dan sifat kayu yang cukup baik (Purba, 2009).

Eucalyptus sp. diprioritaskan pengembangannya dalam pengelolaan HTI (Hutan Tanaman Industri) dan ditujukan sebagai kayu serat. Kriteria tanaman hutan yang diperlukan untuk pulp adalah tanaman yang cepat tumbuh, memiliki produktivitas tinggi, daur hidup pendek, dan sifat (kimia dan fisika) kayu sesuai persyaratan bahan baku industri pulp (Mindawati *et al.*, 2010). Diketahui pula bahwa kandungan senyawa kimia yang ada dalam *Eucalyptus* sp. berperan sebagai antibakteri (Astiani, 2014).

Selain itu *Eucalyptus* sp. dapat diolah menjadi minyak atsiri. Minyak atsiri adalah salah satu Hasil Hutan Non Kayu (HHNK) yang dapat digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Minyak atsiri diperoleh dengan cara menyuling bagian dari tanaman, yaitu daun, ranting atau kulit batang pohon (Damanik, 2009). Minyak atsiri bisa dihasilkan dari kalus yang diproduksi secara *in vitro* (Ribkahwati, 2015).

Kultur *in vitro* adalah kegiatan menumbuhkan jaringan kalus, sel, protoplas, dan organ tanaman pada kondisi aseptik (Dwiyani, 2015). Selanjutnya disebutkan bahwa kultur *in vitro* menggunakan media kultur yang ditambahkan zat pengatur tumbuh tertentu untuk mengarahkan

morfogenesis eksplan membentuk propagul. Propagul dapat berupa tunas ataupun kalus tergantung jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan.

Penelitian ini merupakan tahap awal dari pemanfaatan tanaman *Eucalyptus* sebagai penghasil minyak atsiri yang dapat dihasilkan dari kalus *Eucalyptus* (Alvarez & Alejandra, 2014). Media kultur yang digunakan untuk pembentukan kalus disebut sebagai *Callus Induction Medium* atau *CIM* (Dwiyani, 2012; Dwiyani, 2015). Media *CIM* terdiri dari media dasar kultur dengan penambahan 2,4-D atau auksin dan sitokinin dengan rasio (perbandingan) yang sama (Dwiyani, 2015). Produksi kalus secara *in vitro* dilakukan melalui tahapan pembentukan kalus melalui induksi serta memperbanyak kalus yang sudah terbentuk disebut dengan istilah multiplikasi. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan media *CIM* terbaik untuk pembentukan dan multiplikasi kalus *Eucalyptus* sp secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari – Juli 2021 di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Udayana

yang terletak di Kebun Percobaan Fakultas Pertanian, jalan Pulau Moyo, Denpasar.

Bahan tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah daun kedua (dihitung dari arah dari ujung apikal) dari tanaman *Eucalyptus* sp yang berumur 4 bulan (Gambar 1).



Gambar 1. Pengambilan bahan eksplan dari tanaman induk

Bahan lainnya yang digunakan adalah media dasar Woody Plant Medium (WPM), Polyvinylpyrrolidone (PVP), 2,4 - Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D), Naphthaleneacetic Acid (NAA), Benzylaminopurine (BAP), gula, agar, aquades, alkohol 70%, spiritus, sodium hypochlorite, Dhitane, dan detergen. Peralatan yang digunakan meliputi timbangan digital, *magnetic stirrer*, autoklaf, *laminar air flow*, rak kultur, botol kultur, gelas ukur, kompor, panci, spatula, pinset, scalpel, pisau, dan lampu bunsen. Seluruh peralatan kecil

yang digunakan sudah disteril menggunakan autoklaf selama 60 menit.

Penelitian ini menggunakan rancangan lingkungan Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor dengan perlakuan enam macam media penginduksi kalus atau *Callus Induction Medium* (CIM) meliputi: CIM₀= WPM; CIM₁ = WPM + 2,4-D 1 ppm; CIM₂ = WPM + 2,4-D 1,5 ppm; CIM₃ = WPM + 2,4-D 2 ppm; CIM₄ = WPM + NAA 1 ppm + BAP 1 ppm; dan CIM₅ = WPM + NAA 2 ppm + BAP 2 ppm. Perlakuan diulang sebanyak 4 kali, sehingga terdapat 24 unit perlakuan. Setiap unit perlakuan terdiri dari 3 eksplan dalam satu botol kultur. Cara pembuatan media mengikuti prosedur pembuatan media seperti yang tercantum dalam Dwiyani (2015).

Eksplan disterilisasi dengan cara sebagai berikut. Eksplan diambil, dicuci dengan air mengalir dan detergen selama 5 menit. Selanjutnya eksplan dibilas menggunakan air steril sebanyak 3 kali. Kemudian eksplan direndam menggunakan 10 % larutan sodium hypochlorite selama 5 menit sambil digoyang perlahan, kemudian kembali dibilas menggunakan air steril sebanyak 2 kali dan dimasukkan ke dalam laminar. Di dalam laminar, eksplan kembali

disteril dengan 5 % larutan sodium hypochlorite selama 2 menit, dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali, kemudian ditiriskan di atas kertas saring steril.

Bahan eksplan (daun) yang sudah disterilisasi dipotong dengan ukuran 0,5 x 0,5 cm lalu ditanam pada media kultur sesuai perlakuan, Selanjutnya kultur diinkubasi di ruang kultur dengan suhu 24° C. Kalus yang sudah terbentuk selanjutnya di sub kultur ke media yang sama untuk proses multiplikasi. Media yang digunakan dalam tahap multiplikasi sama dengan media yang digunakan

pada tahap induksi kalus. Variabel yang diamati adalah waktu pelengkungan eksplan, waktu muncul kalus, warna kalus, tekstur kalus, berat segar kalus, luas kalus, dan jumlah kalus yang terbentuk setelah multiplikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil terhadap variabel yang diamati dapat dilihat pada Tabel 1, Tabel 2, Tabel 3, dan Tabel 4, sedangkan pengamatan terhadap warna kalus yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 1. Rata-rata Waktu Pelengkungan dan Rata-rata Waktu Muncul Kalus

Perlakuan	Rata-rata Waktu Pelengkungan Eksplan (HST)	Rata-rata Waktu Muncul Kalus (HST)
CIM ₀	-	-
CIM ₁	6	10,00
CIM ₂	6	10,00
CIM ₃	4	10,00
CIM ₄	3	8,5
CIM ₅	3	8,5

Keterangan: HST=hari setelah tanam; tanda (-) menunjukkan tidak terjadi pelengkungan maupun terbentuknya kalus.

Tabel 2. Warna Kalus dan Tekstur Kalus

Perlakuan	Warna Kalus	Tekstur Kalus
CIM ₀	-	-
CIM ₁	Hijau	Remah
CIM ₂	Hijau	Remah
CIM ₃	Coklat	Remah
CIM ₄	Hijau kecoklatan	Remah
CIM ₅	Hijau kecoklatan	Remah

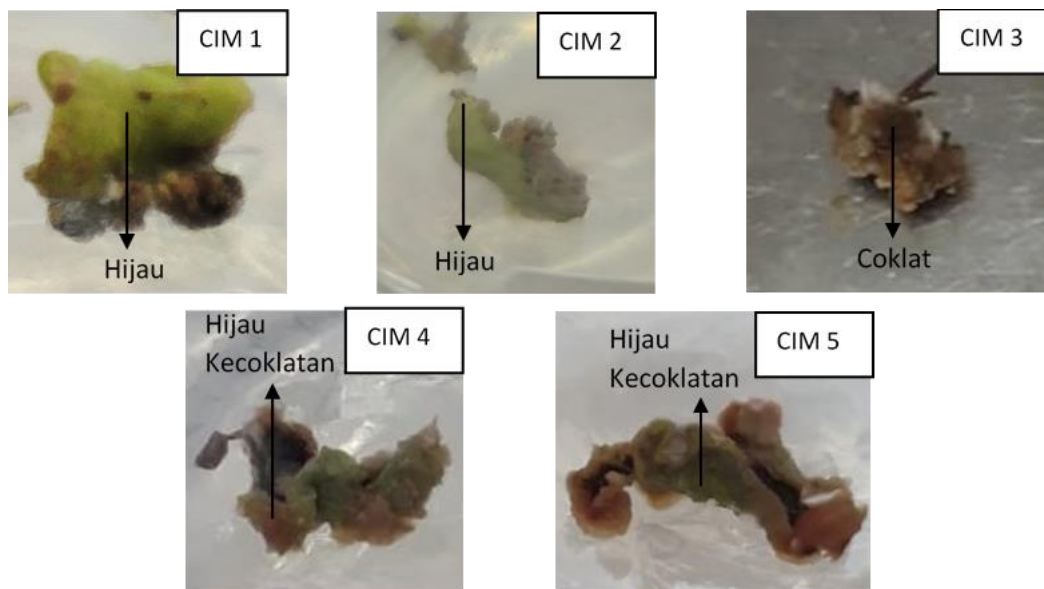
Tabel 3. Rata-rata Berat Kalus dan Rata-rata Luas Kalus

Perlakuan	Rata -rata Berat Segar Kalus (gram)	Rata -rata Luas Kalus (cm ²)
CIM ₀	0,7071 c	0,7071 a
CIM ₁	1,0295 a	1,0084 a
CIM ₂	0,8703 b	1,4075 a
CIM ₃	0,8356 b	1,0558 a
CIM ₄	0,8045 b	1,1638 a
CIM ₅	0,8166 b	1,1355 a

Keterangan : Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan tidak nyata pada uji Duncan 5%.

Tabel 4. Jumlah Kalus setelah dilakukan Multiplikasi Multiplikasi

Perlakuan	Jumlah kalus (buah)
CIM ₀	Tidak menghasilkan kalus.
CIM ₁	5
CIM ₂	7
CIM ₃	6
CIM ₄	5
CIM ₅	7



Gambar 2. Warna kalus yang terbentuk pada berbagai media CIM

Pembentukan kalus dipicu oleh auksin dan sitokinin yang ditambahkan ke dalam media kultur karena dapat meningkatkan zat pengatur tumbuh endogen pada tanaman (Lestari, 2011). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa media CIM baik yang ditambahkan 2,4-D maupun NAA+BAP (Dengan konsentrasi sama) mampu menginduksi kalus dibandingkan dengan kontrol. Munculnya kalus di pinggiran dan tulang daun menandakan pertambahan sel pada pinggiran daun dan pada tulang daun yang mengalami pelukaan hal ini ditandai dengan munculnya gumpalan sel berwarna putih kehijauan (Bustami, 2011).

Warna kalus menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui apakah kalus memiliki sel yang aktif membelah atau sel yang mati (Setianingrum, 2010). Pada minggu pertama setelah muncul kalus, kalus yang terbentuk masih berwarna putih kehijauan. Warna hijau pada kalus disebabkan oleh klorofil sebagai reaksi pencahayaan sehingga kloroplas melakukan fotosintesis (Ardiana, 2019). Sedangkan warna coklat pada kalus adalah akibat dari metabolisme senyawa fenol yang bersifat toksik, menghambat pertumbuhan bahkan menyebabkan

kematian pada jaringan (Yusnita, 2003). Selain itu menurut Palupi (2004) warna coklat disebabkan oleh umur sel dan jaringan kalus yang semakin bertambah sehingga mengalami proses penuaan (senesensi).

Selain warna kalus, tekstur kalus merupakan salah satu penanda untuk menunjukkan kualitas kalus. Hasil pada Tabel 2 menunjukkan semua perlakuan menghasilkan kalus bertekstur remah. Terbentuknya kalus bertekstur remah dipacu oleh hormon auksin endogen yang dihasilkan eksplan setelah membentuk kalus (Mahadi, 2016). Menurut Mahadi (2016) tekstur kalus yang kompak disebabkan oleh pembentukan lignifikasi sehingga kalus tersebut mempunyai tekstur keras yang mana merupakan efek dari sitokinin yang berperan dalam transpor unsur hara.

Bertambahnya berat kalus secara *irreversible* menunjukkan adanya pertumbuhan (Sari *et al.*, 2014) sehingga berat segar kalus dapat mewakili variabel pertumbuhan kalus yang berasal dari eksplan daun *Eucalyptus* sp. Pada penelitian ini berat segar terbesar diperoleh pada perlakuan CIM₁ (1,0295 g) yang berbeda nyata dengan perlakuan lainnya sedangkan yang terkecil terdapat

pada perlakuan CIM₀ (0,7071 g), namun berbeda tidak nyata dengan CIM₂, CIM₃, CIM₄, dan CIM₅ (Tabel 3). Berat segar sangat dipengaruhi oleh kecepatan sel pada eksplan membelah diri. Pertumbuhan dan morfogenesis *in vitro* dipengaruhi oleh adanya interaksi antara zat pengatur tumbuh dengan sel yang dikultur. Media CIM dengan 1,5 ppm 2,4-D adalah media terbaik untuk pertambahan berat segar kalus. Berat segar kalus berhubungan dengan warna kalus. Warna kalus coklat atau kecoklatan (browning) disebabkan oleh degradasi fisiologis akibat kekurangan unsur hara atau hormon tumbuh sehingga sel mengalami penuaan (Ardiana, 2019), hal ini menyebabkan kalus berhenti tumbuh dan berat segar berhenti bertambah, sehingga pada akhir penelitian rata-rata berat segar kalus untuk kalus berwarna coklat atau kecoklatan lebih rendah dibandingkan kalus berwarna hijau.

Tabel 3 menunjukkan luas kalus tertinggi terdapat pada perlakuan CIM₂ (1,4075 cm²) dan terendah pada perlakuan CIM₀ (0,7071 cm²), namun CIM₁ berbeda tidak nyata dengan perlakuan lainnya. Menurut Mahadi (2016) pembelahan sel yang optimal menyebabkan pertumbuhan kalus yang

optimal, artinya semakin cepat sel pada eksplan memanfaatkan hormon pertumbuhan maka peningkatan jumlah sel akan semakin cepat. Hal ini akan menambah luas kalus.

Kalus yang dihasilkan dari induksi kalus dapat dimultiplikasi secara tidak terbatas dengan cara memindahkan kalus ke media yang baru melalui sub kultur (Dwiyani, 2015). Jumlah kalus yang dihasilkan saat multiplikasi berhubungan erat dengan luas kalus. Semakin besar rata-rata luas kalus maka semakin besar jumlah potongan kalus. Hal ini sesuai dengan hasil perlakuan CIM₂ dengan rata-rata luas terbesar (1,4075 cm²) dan jumlah potongan kalus terbanyak (7 potongan).

. Menurut Fitriani (2019) berat segar kalus yang tinggi didukung oleh besarnya diameter kalus yang dihasilkan dan seluruh variabel tersebut saling berkaitan, selain itu diameter kalus dipengaruhi oleh waktu pelengkungan dan waktu munculnya kalus.

Perlakuan CIM₂ memiliki waktu pelengkungan eksplan terlama yaitu 7 HST dan waktu muncul kalus terlama yaitu 10 HST, selain itu walaupun memiliki rata-rata luas terbesar (1,4075 cm²), CIM₂ tidak memiliki berat terbesar (0,8703 g), maka pernyataan Fitriani

(2019) tidak sesuai dengan hasil penelitian ini. Hal ini diduga karena kalus yang dihasilkan berongga besar sehingga berat segar kalus menjadi rendah. Hasil yang berbeda ini juga bisa disebabkan karena spesies tanaman yang berbeda. Fitriani (2019) menggunakan tanaman nilam, sedangkan penelitian ini menggunakan *Eucalyptus*.

Berdasarkan warna (hijau), tekstur (remah), dan rata-rata berat segar kalus (1,0295 g), disimpulkan bahwa perlakuan CIM₁ merupakan media CIM yang paling sesuai untuk menginduksi kalus. Sedangkan media CIM terbaik untuk multiplikasi kalus adalah CIM₂, dilihat dari warna (hijau), tekstur (remah), rata-rata luas kalus (1,4075 cm²), dan jumlah kalus yang terbentuk setelah multiplikasi (7 potongan).

SIMPULAN

Media CIM terbaik untuk menginduksi kalus pada tanaman *Eucalyptus* sp secara in vitro adalah media WPM + 1 ppm 2,4-D. Media terbaik untuk menghasilkan jumlah kalus terbanyak pada multiplikasi adalah media WPM + 1,5 ppm 2,4-D.

DAFTAR PUSTAKA

Alvarez, M.A. (2014). *Plant Biotechnology for Health: From*

Secondary Metabolites to Molecular Farming. Springer International Publishing, Switzerland.

Ardiana, D.W. (2009). Teknik Pemberian Benzyl Amino Purin untuk Memacu Pertumbuhan Kalus dan Tunas pada Kotiledon Melon (*Cucumis melo* L.). *Buletin Teknik Pertanian*, 14 (2): 50–53.

Astiani, D.P., Jayuska, A., & Arreneuz, S. (2014). Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri *Eucalyptus pellita* Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *JKK*, 3 (3): 49-53.

Bustami, M.U. (2011). Penggunaan 2,4-D Untuk Induksi Kalus Kacang Tanah. *Media Litbang Sulteng*, Vol IV: 139-141.

Damanik, M. (2009). Kajian Minyak Atsiri pada Eukaliptus (*Eucalyptus urophylla*) Umur 4 Tahun di PT Toba Pulp Leastari, TBK. *Skripsi USU*: 11-14.

Dwiyani, R. (2012). Micropropagation of an orchid of *Vanda tricolor* Lindl. *suavis* var. from Bali carrying KNOTTED1-LIKE Arabidopsis thaliana (KNAT1) gene (in Indonesian). Dissertation. Postgraduate School. Gadjah Mada University. Yogyakarta.

Dwiyani, R. (2015). *Kultur Jaringan Tanaman*. Palawa Sari, Denpasar.

Fitriani, Y. (2019). Teknik Sterilisasi dan Efektivitas 2,4-D terhadap Pembentukan Kalus Eksplan Daun Nilam (*Pogostemon Cablin* Benth) In Vitro. *Journal of Agricultural Science and Biotechnology*, 8 (1):1-7

Fitriani, Y., Wijana, G., & Darmawati, I.A.P. (2019). Teknik Sterilisasi dan Efektivitas 2,4-D Terhadap Pembentukan Kalus Eksplan Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth).

- In vitro. J. Agric. Sci. and Biotechnol* : 42-51.
- George, E.F., & Sherrington, P.D. (1984). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited, England.
- Hartmann, D., Burton, W.B., & Kerr, F. (1997). *Atlas of Galactoc Neutral Hydrogen*.
- Lestari, E.G. (2011). Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyak Tanaman Melalui Kultur Jaringan. *Jurnal Agro-Biogen*. 7(1), 63-68.
- Mahadi, I., Syafi'i, W., & Sari, Y. (2016). Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) Menggunakan Hormon. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*, Vol. 21 No. 2: 86
- Mindawati, N., Indrawan, A., Mansur, I., & Rusdiana, O. (2010). Kajian Pertumbuhan Tegakan Hybrid *Eucalyptus urogandis* di Sumatera Utara. *Jurnal Penelitian Hutan Tanaman*, 7(1): 39- 50.
- Palupi, A.D., Solichatun, & Marliana, S.D. (2004). Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benziladenin (BA) terhadap Kandungan Minyak Atsiri Kalus Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.). *BioSMART* 6(2): 99-103.
- Purba, M.P. (2009). Besar Aliran Permukaan (*Run-off*) Pada Berbagai Tipe Kelerengan Dibawah Tegakan *Eucalyptus* sp. *Skripsi*. Universitas Sumatra Utara.
- Ribkahwati (2015). Profil Minyak Atsiri Kalus Daun Pucuk Mawar (*Rosa hybrid* L. varietas hybride tea) Lokal Batu Hasil Elisitasi dengan Cahaya. Disertasi, Program Studi S3 MIPA, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.
- Sari, N., Suwarsi, E., & Sumadi. (2014). Optimasi Jenis dan Konsentrasi ZPT dalam Induksi Kalus Embriogenik dan Regenerasi menjadi Planlet pada *Carica pubescens* (Lenne & K.Koch). *Biosaintifika*, 6 (1): 56
- Setianingrum, A. (2010). Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi BAP dan 2,4-D Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Secara *In vitro*. *Skripsi*. Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret.
- Sulichantini, E.D. (2016). Pertumbuhan Tanaman *Eucalyptus pellita* F. Muell Di Lapangan Dengan Menggunakan Bibit Hasil Perbanyak Dengan Metode Kultur Jaringan Stek Pucuk, dan Biji. *ZIRAA'AH*, Vol 41, no 2: 269-275.
- Yusnita. (2003). *Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. AgroMedia Pustaka, Jakarta