Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi *6-Benzylaminopurine* (BAP) dan *2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D)

Putri Nur Indah dan Dini Ermavitalini
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim , Surabaya 60111
E-mail: dinierma@bio.its.ac.id

***Abstrak*—Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kombinasi konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) *2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D) dan *6-Benzylaminopurine* (BAP) yang paling optimal menginduksi kalus dari eksplan daun *Calophyllum inophyllum* Linn. Penelitian ini dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi 2,4-D yang terdiri dari 0 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 1,5 ppm dan 2 ppm dan faktor kedua adalah konsentrasi BAP yaitu 0 ppm; 1 ppm; 2 ppm; dan 3 ppm. Parameter pengamatan yang diamati, antara lain berat segar kalus (mg), hari saat muncul kalus (HSI), dan warna serta tekstur kalus. Berat segar kalus dianalisis menggunakan ANOVA two-way. Sedangkan hari saat muncul kalus dan warna tekstur kalus dianalisis secara deskriptif. Pengamatan dilakukan pada 45 hari setelah inokulasi (HSI). Hasil uji ANOVA two-way menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D, BAP serta interaksi antara kedua faktor tersebut berpengaruh terhadap berat segar kalus daun *C. inophyllum* Linn. ($P \leq 0,05$). Perlakuan kombinasi konsentrasi 2,4-D 0,5 ppm + BAP 2 ppm merupakan kombinasi konsentrasi ZPT yang paling optimal untuk kandungan berat segar kalus yaitu 197,8 mg dan untuk hari muncul kalus lebih cepat yaitu pada 13 HIS. Sedangkan pengamatan terhadap warna dan tektur kalus menunjukkan paling banyak kalus berwarna coklat tua dan bertekstur kompak pada perlakuan yang membentuk kalus.**

***Kata Kunci*—*Calophyllum inophyllum* Linn., *2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D), *6-Benzylaminopurine* (BAP), Induksi Kalus.**

I. PENDAHULUAN

Indonesia sangat kaya akan keanekaragaman hayati yang terdiri atas flora dan fauna. Salah satu flora jenis pohon yang hidup dan banyak ditemui di Indonesia terutama di kawasan pesisir adalah mangrove. Indonesia mempunyai hutan mangrove terluas di dunia dengan keanekaragaman hayati terbesar di dunia dan struktur paling bervariasi di dunia [1]. Berdasarkan data tahun 1984, Indonesia memiliki mangrove dalam kawasan hutan seluas 4,25 juta ha, kemudian berdasarkan hasil interpretasi citra landsat (1992) luasnya tersisa 3,812 juta ha [2]. Sedangkan data FAO (2007) luas hutan mangrove di Indonesia pada tahun 2005 hanya mencapai 3.062.300 ha atau 19% dari luas hutan mangrove di dunia dan yang terbesar di dunia melebihi Australia (10%) [2].

Salah satu jenis tumbuhan mangrove yaitu nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.). Tanaman nyamplung mempunyai sebaran yang cukup luas di Indonesia [3]. Nyamplung (*C. inophyllum* Linn.) adalah tanaman yang tumbuh di daerah bertanah pasir dan daerah pesisir pantai berudara panas [4]. Nyamplung juga dapat tumbuh baik pada ketinggian 0-800 mdpl seperti di hutan, pegunungan, dan rawa-rawa. Nyamplung dapat diperbanyak secara generatif dan vegetatif. Namun untuk perbanyakan tanaman umumnya diperoleh dari biji, karena buah nyamplung mudah diperoleh dan berbuah sepanjang tahun [5].

Nyamplung (*C. inophyllum* Linn.) merupakan tanaman serba guna, mulai dari manfaat pohonnya sebagai tanaman konservasi dan penghijauan sampai pada produk yang dihasilkan yaitu kayu dan hasil hutan bukan kayu (HHBK) berupa biji yang dimanfaatkan sebagai penghasil minyak nabati [3]. Tanaman nyamplung mengandung banyak komponen kimia yang mengandung bahan bioaktif yang berkhasiat obat yaitu mengahsilkan metabolit sekunder dari golongan *Non-nucleoside reverse tramscriptase inhibitor* (NNRTI). NNRTI yaitu merupakan kelompok senyawa yang menghambat aktivitas enzim *reverse transcriptase* dari HIV-1 [6]. Spesies yang paling melimpah pada genus ini adalah *C. inophyllum* Linn. yang tersebar di wilayah tropis Afrika, Amerika, dan Asia. Pohon ini juga meluas di Polinesia Perancis yang digunakan untuk pengobatan. Beberapa pyranocoumarin terisolasi dari genus Calophyllum yang menunjukkan aktivitas anti HIV-1 yang termasuk dalam NNRTI. Senyawa pyranocoumarin ini termasuk ke dalam golongan turunan senyawa fenol. Senyawa yang menunjukkan aktivitas anti HIV-1 pada *C. inophyllum* Linn. yaitu inophyllum B dan P [7].

Penggunaan bahan obat yang berasal dari tanaman dapat dilakukan dengan cara mengekstrak tanaman langsung dari alam, sintesis dari senyawa lain yang berstruktur hampir sama dengan senyawa obat, dan dengan teknik kultur jaringan secara *in vitro* [8]. Melihat kondisi mangrove di Indonesia dari tahun ke tahun yang mengalami penurunan, dikhawatirkan bahwa sumberdaya hayati ini akan musnah disebabkan karena

adanya pengambilan bahan obat dari alam. Sehingga pada penelitian ini sampel tanaman yang akan digunakan bukan berasal dari tanaman langsung, akan tetapi akan dilakukan kultur tanaman *C. inophyllum* Linn. secara *in vitro*. Sebagian besar komponen kimia yang berasal dari tanaman yang digunakan sebagai obat atau bahan obat merupakan metabolit sekunder yang dapat dihasilkan dengan teknik kultur jaringan. Senyawa metabolit sekunder melalui kultur jaringan dapat diisolasi dari kalus atau sel. Menurut [9] ada 4 keuntungan dalam pemanfaatan teknik kultur jaringan untuk produksi senyawa metabolit sekunder yaitu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang lebih konsisten dan dalam waktu lebih singkat, faktor lingkungan dapat diatur dan dikendalikan, mutu dari senyawa metabolit sekunder yang diproduksi lebih baik, dan dapat manipulasi pemakaian zat pengatur tumbuh. Oleh karena itu akan dilakukan penelitian untuk mendapatkan kalus dari tanaman *C. inophyllum* Linn.

Keberhasilan kultur *in vitro* ditentukan oleh media dan macam tanaman. Media mempunyai 2 fungsi utama, yaitu untuk menyuplai nutrisi dan untuk mengarahkan pertumbuhan melalui zat pengatur tumbuh [10]. Media yang digunakan pada penelitian ini adalah Media *Woody Plant Medium* (WPM). Media WPM merupakan media dengan konsentrasi ion yang rendah dibandingkan dengan media MS. Media ini konsisten dengan media untuk tanaman berkayu [11].

Kombinasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam medium merupakan faktor utama penentu keberhasilan kultur *in vitro*. Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus adalah auksin. Diatara golongan auksin yang umum digunakan pada media kultur jaringan adalah 2,4-D dan IAA. Dibanding dengan golongan auksin IAA, 2,4-D memiliki sifat lebih stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel tanaman ataupun oleh pemanasan pada proses sterilisasi [12]. Pemberian sitokinin dalam kultur kalus berperan penting dalam memicu pembelahan dan pemanjangan sel sehingga dapat mempercepat perkembangan dan pertumbuhan kalus. Salah satu golongan sitokinin yang sering digunakan dalam metode kultur jaringan adalah BAP, hal ini dikarenakan sifat BAP yang stabil, mudah diperoleh dan lebih efektif dibandingkan kinetin [13]. Pemberian ZPT tersebut pada sel maupun kalus dapat mempengaruhi produksi senyawa metabolit sekunder tertentu. [14]. Tujuan pada penelitian ini adalah mengetahui kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP yang paling optimal menginduksi kalus dari eksplan daun *C. inophyllum* Linn.

II. METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober sampai Desember 2012 di laboratorium Botani Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

B. Cara Kerja

Penelitian ini terdiri dari 3 kegiatan, yaitu (1) sterilisasi, (2) pembuatan stok ZPT dan media, dan (3) inokulasi eksplan

Sterilisasi

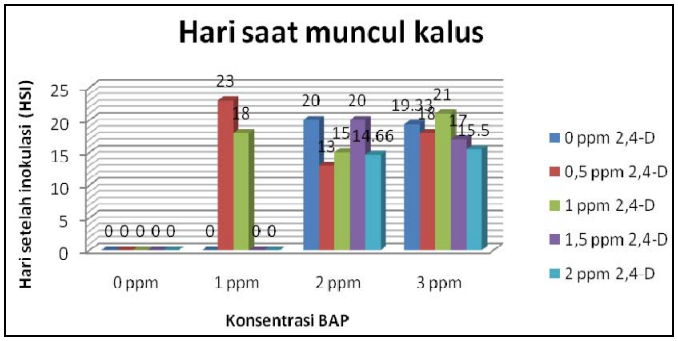
Tahap sterilisasi meliputi sterilisasi alat, ruang kerja, dan eksplan. Alat-alat inokulasi, alat gelas dan logam disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit [15]. Semua peralatan selain bahan tanam disterilisasi dengan cara disemprot menggunakan alkohol 70%, kemudian disinari dengan UV selama 1 jam [16]. Ketika siap digunakan, UV dimatikan kemudian lampu neon dan blower dinyalakan [17]. Sterilisasi eksplan daun terdiri dari 2 tahap sterilisasi yaitu Sterilisasi tahap I: Daun *C. inophyllum* Linn. dicuci di bawah air kran yang mengalir, kemudian dibersihkan dengan deterjen sambil digosok menggunakan spon lalu dicuci lagi dengan air kran. Setelah itu daun dibilas lagi dengan air steril satu kali. [18]. Sedangkan sterilisasi tahap II eksplan dimasukkan dalam *laminar air flow* dan eksplan direndam dalam larutan alkohol 70% selama 25 detik, kemudian dibilas dengan aquades steril selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya disterilisasi dengan 1% *sodium hypochlorite* (Bayclin ™ 5,25%) selama ± 10 menit. Kemudian dibilas dengan aquades steril selama 5 menit sebanyak 3 kali dan direndam pada larutan betadine. Selanjutnya eksplan diambil dengan pinset dan ditiriskan pada cawan petri yang berisi kertas saring [19].

Pembuatan Stok ZPT dan Media

Pembuatan larutan stok 2,4-D 100 ppm dilakukan dengan penimbangan bahan sebanyak 10 mg lalu ditambahkan 50 ml aquades steril ke dalam erlenmeyer 100 ml. Sambil diaduk, diteteskan larutan KOH 1 N sampai larut [12]. Larutan ditambahkan aquades hingga volumenya mencapai 100 ml [18].

Pembuatan larutan stok BAP 100 ppm dilakukan dengan penimbangan bahan sebanyak 10 mg dan ditambahkan 50 ml aquades steril ke dalam erlenmeyer 100 ml. Larutan HCl 1 N diteteskan sampai larut. Larutan ditambahkan aquades steril sampai 100 ml. Stok zat pengatur tumbuh disimpan dalam erlenmeyer 100 ml dan ditutup dengan alumunium foil serta diberi label. Semua larutan stok ZPT disimpan dalam lemari pendingin [18].

Pembuatan media dimulai dengan pembuatan larutan stok yaitu berupa mikronutrien media WPM, vitamin, dan ZPT. ZPT ditambahkan sesuai dengan kombinasi dan taraf konsentrasi perlakuan. Kertas pH meter digunakan untuk mengukur tingkat keasaman media. Pengaturan tingkat keasaman media dilakukan dengan penambahan HCl atau NaOH sehingga pH media mencapai 5,6-5,8. Kemudian ditambahkan agar-agar sebanyak 7 gr/l dan media tersebut diaduk sampai mendidih. Selanjutnya media dituangkan ke dalam botol kultur sebanyak 20 ml/botol. Selanjutnya botol berisi media ditutup rapat dan di autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit [9]. Tahap akhir media disimpan dalam ruang penyimpanan media.



Gambar 1. Grafik rerata hari saat muncul kalus 45 HSI pada eksplan daun *Calophyllum inophyllum* Linn. Keterangan : 0) = tidak muncul kalus

Inokulasi Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah bagian daun muda *C. inophyllum* Linn. Penanaman eksplan dilakukan dengan cara mengambil eksplan daun yang sudah disterilisasi dengan pinset steril lalu diletakkan pada cawan Petri, kemudian eksplan daun dipotong di atas cawan Petri dengan ukuran ± 1 cm^2 dengan menggunakan scalpel. Lalu eksplan daun ditanam dalam media dengan bagian abaksial yang kontak dengan media. Bagian mulut botol dipanaskan terlebih dahulu dengan api bunsen untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Kemudian eksplan ditanam pada media perlakuan dengan pinset steril. Sebelum ditutup, mulut botol dipanaskan kembali. Setelah itu botol ditutup dengan plastik PP. Botol diberi label sesuai perlakuan dan tanggal penanamnya.

C. Analisis Data

Data warna, tekstur kalus, serta saat muncul kalus dianalisis secara deskriptif. Sedangkan data berat segar kalus dianalisis menggunakan ANOVA two-way. Apabila terdapat perbedaan nyata, maka dapat dilanjutkan menggunakan uji Tukey dengan taraf kepercayaan 95%.

III. HASIL DAN DISKUSI

A. Induksi Kalus

Kalus merupakan proliferasi massa sel yang belum terdiferensiasi dan terdiri dari sel yang tidak teratur. Kultur kalus merupakan kultur sekumpulan sel yang tidak terorganisir yang berasal dari berbagai jaringan tumbuhan [20]. Kultur kalus digunakan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali. Pembentukan kalus adalah menginduksi dari bagian tanaman tertentu dengan memberikan zat pengatur tumbuh [21]. ZPT yang banyak digunakan untuk induksi kalus adalah kombinasi auksin dan sitokinin. Pemberian ZPT ini berperan dalam mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman [17].

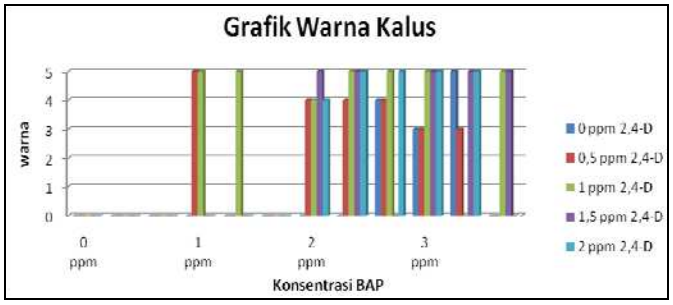
Pemilihan ZPT merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan pembentukan kalus tanaman yang dikulturkan. 2,4-D merupakan ZPT yang paling sering digunakan pada kultur kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan oragonogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus. Apabila dibandingkan dengan auksin lainnya seperti IAA, 2,4-D menunjukan aktivitas yang lebih kuat. Aktivitas 2-4-D yang kuat dan optimal ini disebabkan karena gugus karboksil yang dipisahkan oleh karbon atau karbon dan oksigen [19]. Selanjutnya sitokinin BAP umum digunakan dalam proses regenerasi kultur *in vitro* karena zat pengatur tumbuh ini berfungsi dalam pembelahan sel dan diferensiasi tunas adventif dari kalus [22]. Pertumbuhan dan morfogenesis *in vitro* dipengaruhi oleh adanya interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media dan hormon pertumbuhan yang diproduksi oleh sel tanaman secara endogen oleh sel-sel yang dikultur [23]. Penambahan auksin dan sitokinin eksogen ini mengubah konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen sel [20]. Efektifitas zat pengatur tumbuh auksin maupun sitoknin eksogen bergantung pada konsentrasi hormon endogen dalam jaringan tanaman. Kebanyakan hormon endogen di tanaman berada pada jaringan meristem yaitu jaringan yang aktif tumbuh seperti ujung-ujung tunas dan akar [22].

B. Hari Mulai Muncul Kalus

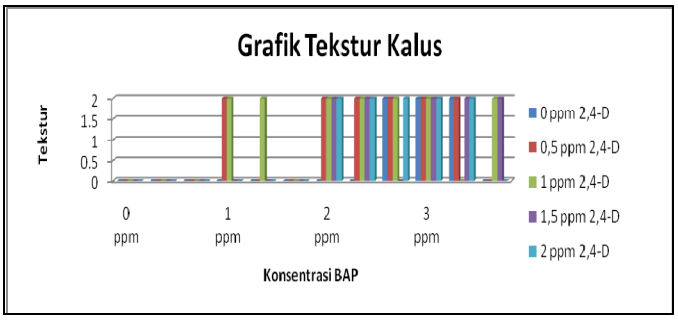
Salah satu indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro* adalah munculnya kalus pada eksplan. Pada penelitian ini, kalus pertama kali terbentuk pada sayatan eksplan yang kontak dengan media. Diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian sayatan eksplan bergelombang (*swelling*). Kalus yang dihasilkan melalui kultur secara *in vitro* terbentuk karena adanya perlukaan pada jaringan dan respon terhadap hormon (ZPT). Munculnya kalus pada bagian yang terluka diduga karena adanya rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi lukanya. Hal ini sesuai pendapat dari [23], mengemukakan bahwa pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi dari adanya respon terhadap luka dan suplai hormon alamiah atau buatan dari luar ke dalam eksplan.

Pada Gambar 1. menunjukkan bahwa kalus terinduksi pada beberapa perlakuan. Beberapa dari perlakuan tidak dapat menghasilkan kalus. Kalus yang tidak muncul ini dimungkinkan karena kombinasi ZPT pada media belum mampu menginduksi 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.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan BAP 2 ppm + 2,4-D 0,5 ppm mampu menginduksi kalus tercepat yaitu pada 13 HSI. Penambahan auksin pada konsentrasi rendah akan memacu pembentukan kalus. Sementara induksi kalus terlama diperoleh pada perlakuan BAP 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm yaitu pada 23 HSI. Hal ini diduga karena kombinasi konsentrasi ZPT yang diberikan pada eksplan tidak tepat dalam menginduksi kalus, sehingga menghambat pertumbuhan kalus pada eksplan. Terhambatnya pembentukan kalus dikarenakan hormon endogen dan eksogen yang terdapat pada eksplan tidak dapat merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat.



Gambar 2. Grafik warna kalus *Calophyllum inophyllum* Linn. Keterangan : 1 = putih, 2 = putih kekuningan, 3 = kuning, 4 = coklat muda (kuning kecoklatan), 5 = coklat tua



Gambar 3. Grafik tekstur kalus *Calophyllum inophyllum* Linn. Keterangan : 1 = remah dan 2 = kompak

Kehabisan hara dan air juga dapat terjadi karena selain terhisap untuk pertumbuhan juga karena media menguapkan air dari masa ke masa. Selain kehabisan unsur hara, kalus juga mengeluarkan persenyawaan-persenyawaan hasil metabolisme yang akhirnya akan menghambat pertumbuhan kalus itu sendiri [24].

C. Tekstur dan Warna Kalus

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.

Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai pertumbuhan suatu kalus. 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.

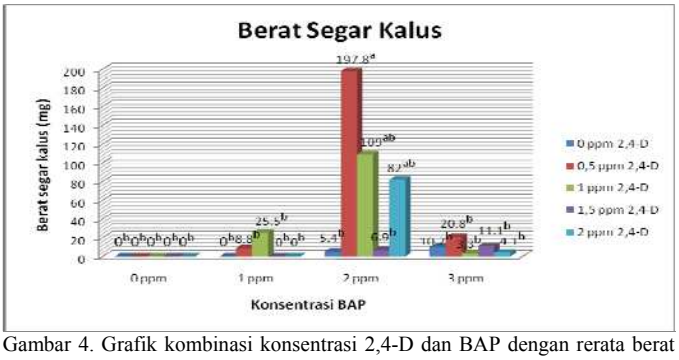
Warna kalus kecoklatan terdapat pada hampir semua perlakuan yang terbentuk kalus. Warna kecoklatan pada kalus (*browning*) ini akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat berlebihan, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan [24]. Peristiwa pencoklatan tersebut sesungguhnya merupakan suatu peristiwa alamiah dan proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik seperti pengupasan, dan pemotongan. Gejala pencoklatan merupakan tanda-tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan [21]. Namun dari hasil pengamatan eksplan daun *C. inophyllum* Linn memiliki daya tahan terhadap *browning* yang tinggi, dapat terlihat dari kalus yang terus berkembang walaupun eksplan berwarna coklat. Hal ini dikarenakan kalus dari daun *C. inophyllum* Linn. mempunyai kandungan metabolit sekunder berupa senyawa *pyranocoumarin*. Senyawa ini terisolasi dari genus Calophyllum yang termasuk ke dalam golongan turunan senyawa fenol [7].

Hasil pada Gambar 3. menunjukkan bahwa semua perlakuan yang terbentuk kalus dominan membentuk kalus bertekstur kompak. Terbentuknya kalus yang bertekstur kompak menurut [24] 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 [14].

D. Berat Segar Kalus

Pertumbuhan adalah peningkatan permanen ukuran organisme atau bagian dari tumbuhan yang merupakan hasil dari peningkatan jumlah dan ukuran sel. Pertumbuhan dicirikan dengan bertambahnya berat yang *irreversible,* sehingga pengukuran berat segar kalus dapat mewakili variabel pertumbuhan kalus yang berasal dari eksplan daun *C. inophyllum* Linn. Rujukan [25], berat segar secara fisiologis terdiri dari dua kandungan yaitu air dan karbohidrat. Berat segar kalus yang besar ini disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus [24].

Berdasarkan uji ANOVA hasil kombinasi konsentrasi BAP dan 2,4-D berpengaruh terhadap berat segar kalus daun *C. inophyllum* Linn. karena ($P \leq 0,05$). Selanjutnya pada uji lanjutan menggunakan uji Tukey, menerangkan bahwa perlakuan dengan kombinasi konsentrasi BAP 2 ppm + 2,4-D 0,5 ppm memberikan pengaruh yang berbeda nyata apabila dibandingkan dengan kombinasi konsentrasi lainnya. Hal ini sesuai dengan penelitian [6], kultur kalus *C. inophyllum* Linn. dengan penambahan ZPT *6-Benzylaminopurine* (BAP) 2 ppm merupakan hasil yang terbaik dalam menginduksi kalus. Penambahan 2,4-D dilakukan karena 2,4-D berperan untuk mendorong proses morfogenesis kalus, induksi kalus dan dapat mepengaruhi kestabilan genetik sel tanaman. Berat segar kalus yang paling banyak yaitu sebesar 197,8 mg.



Gambar 4. Grafik kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP dengan rerata berat segar kalus. Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji ANOVA yang dilanjutkan dengan Uji Tukey (α = 95.0 %).

membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus [24].

Berdasarkan uji ANOVA hasil kombinasi konsentrasi BAP dan 2,4-D berpengaruh terhadap berat segar kalus daun *C. inophyllum* Linn. karena ($P \leq 0,05$). Selanjutnya pada uji lanjutan menggunakan uji Tukey, menerangkan bahwa perlakuan dengan kombinasi konsentrasi BAP 2 ppm + 2,4-D 0,5 ppm memberikan pengaruh yang berbeda nyata apabila dibandingkan dengan kombinasi konsentrasi lainnya. Hal ini sesuai dengan penelitian [6], kultur kalus *C. inophyllum* Linn. dengan penambahan ZPT *6-Benzylaminopurine* (BAP) 2 ppm merupakan hasil yang terbaik dalam menginduksi kalus. Penambahan 2,4-D dilakukan karena 2,4-D berperan untuk mendorong proses morfogenesis kalus, induksi kalus dan dapat mepengaruhi kestabilan genetik sel tanaman. Berat segar kalus yang paling banyak yaitu sebesar 197,8 mg. Kalus yang terbentuk pada perlakuan ini, dipengaruhi oleh adanya auksin dan sitokinin baik endogen maupun eksogen. Penggunaan auksin dan sitokinin dengan perbandingan yang tepat dan sesuai akan mendukung pertumbuhan kalus secara *in vitro*.

IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa kombinasi konsentrasi 2,4-D 0,5 ppm + BAP 2 ppm merupakan kombinasi konsentrasi ZPT yang paling optimal untuk kandungan berat segar kalus yaitu 197,8 mg dan untuk hari mulai muncul kalus yaitu 13 HSI. Sedangkan kombinasi konsentrasi ZPT yang paling optimal untuk warna dan tekstur kalus yaitu warna coklat tua dan kompak antara lain kombinasi konsentrasi BAP 1 ppm + 2,4-D 0,5 ppm; BAP 1 ppm + 2,4-D 1 ppm; BAP 2 ppm + 2,4-D 1 ppm; BAP 2 ppm + 2,4-D 1,5 ppm; BAP 2 ppm + 2,4-D 2 ppm; BAP 3 ppm + 2,4-D 0 ppm; BAP 3 ppm + 2,4-D 1 ppm; BAP 3 ppm + 2,4-D 1,5 ppm; BAP 3 ppm + 2,4-D 2 ppm

DAFTAR PUSTAKA

[1] K. Anwar, "Alternatif Pembuatan Biodiesel dari Dedak Padi dan Biji Buah Mangrove dengan Proses In Situ Esterifikasi," Tugas Akhir, Jurusan Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya (2010).

[2] C. Anwar dan H. Gunawan, "Peranan Ekologis dan Sosial Ekonomis Hutan Mangrove dalam Mendukung Pembangunan Wilayah Pesisir," Pusat Litbang Hutan dan Konservasi Alam Bogor, Bogor (2007).

[3] S. Wibowo dan D. Hendra, "Manfaat Tanaman Nyamplung dan Prospek Pengembangannya," Balai Penelitian Kehutanan, Sumatera (2011).

[4] T.Wahyuni, A. Umi, dan Z. Riza, "Pemanfaatan Hasil Samping Biji Nyamplung menjadi Biopelet sebagai Bahan Bakar Pengganti Minyak Tanah di Kawasan Pesisir," Pusat Pengkajian dan Perekayasaan Teknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta (2010).

[5] L.N. Baity, A. Azhar, dan O.K. Eko, "Hutan Tanaman Industri (HTI) Berbasis Nyamplung (Calophyllum inophyllum L.) sebagai Stok Energi Terbarukan dengan Sistem Zero Cutting," Tugas Akhir, Institut Pertanian Bogor, Bogor (2011).

[6] K.D. Pawar, P.J. Swati, R.B. Sunil, dan R.T. Shubhada, "Pattern of Anti-HIV Dypyranocoumarin Expression in Callus Cultures of Calophyllum Inophyllum Linn," *Journal of Biotechnology,* Vol. 130 (2007) 346-353.

[7] F. Laure, R. Phila, F.B. Jean, P.B. Jean, dan M.G. Emile, "Screening of Anti-HIV Inophyllums by HPLC-DAD of Calophyllum inophyllum Leaf Extracts from French Polynesia Islands," *Analytica Chimica Acta*, Vol. 624 (2008) 147-153.

[8] A.D. Setyawan dan K.D. Latifah, "Senyawa Biflavonoid pada Selaginella Pal. Beauv. dan Pemanfaatannya," *Biodiversitas*, Vol. 9 (2009) 64-81.

[9] R.A. Harahap, "Studi Kultur Kalus Tanaman Pegagan (Centella asiatica L.) untuk Menghasilkan Senyawa Asiatikosida," Tugas Akhir. Institut Pertanian Bogor, Bogor (2005).

[10] I.N. Elimasni dan S.M. Zaidun, "Inisiasi In Vitro Biji Muda Terong Belanda (Solanum Betaceum Cav.) Berastagi Sumatera Utara pada Komposisi Media dan Zat Tumbuh yang Berbeda," *Jurnal Biologi Sumatera*, Vol. 1, No.1 (Jan., 2006) 15-19.

[11] F. Helmi, "Pengaruh Umur Buah dan Jenis Media terhadap Induksi Embrio Somatik Biji Manggis (Garcinia mangostana L.) dalam Kultur In Vitro," Tugas Akhir. Institut Pertanian Bogor, Bogor (2009).

[12] D.P Hendaryono dan A. Wijayanti, *Teknik Kultur Jaringan: Pengenaan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman secara Vegetatif-Modern*, Yogyakarta: Kanisius (1994).

[13] E. Lestari, "Pengaruh Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) dan 6-Benzylaminopurine (BAP) terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji Anggrek Dendrobium laxyflorum J.J Smith secara In Vitro," Tugas Akhir Jurusan Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya (2012).

[14] 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.

[15] P.P. Widiatmanto, "Pengaruh Jenis Media dan Konsentrasi NAA (Naphthalene Acetic Acid) terhadap Pertumbuhan Biji Dendrobium capra J.J Smith secara In Vitro," Tugas Akhir Jurusan Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya (2012).

[16] I.N Lugrasa dan I.G. Tirta, "Studi Awal Penggunaan Beberapa Macam Media untuk Semai Biji Anggrek Alam Koleksi Kebun Raya Bali," Kebun Raya Eka Karya LIPI, Bali (2005).

[17] Zulkarnain, *Kultur Jaringan Tanaman: Solusi Perbanyakan Tanaman Budidaya*, Jakarta: Bumi Aksara(2009).

[18] I. Gunawan, "Perlakuan Sterilisasi Eksplan anggrek Kuping Gajah (Bulbophyllum beccarii Rchb.f) dalam Kultur In Vitro," Tugas Akhir, Institut Pertanian Bogor, Bogor (2007).

[19] G.A. Wattimena, "Zat Pengatur Tumbuh Tanaman," Tugas Akhir, Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB dan Lembaga Sumberdaya Informasi, IPB, Bogor (1988).

[20] R. Budiyati, "Pertumbuhan Kalus Ibu Tangkai Daun Purwoceng (Pimpinella alpine Kds) dalam Medium MS (Murashige dan Skoog) dengan Pemberian 2,4-D dan BAP," Skripsi. Universitas Diponegoro, Semarang (2002).

[21] S.N. Rohmah, "Penggunaan BAP dan 2,4-D dalam Kultur in vitro Iles-iles (Amorphophallus muelleri Blume.)," Tugas Akhir, Institut Pertanian Bogor, Bogor (2007).

[22] S.F. Syahid and N.K. Natalini, "Induksi dan Regenerasi Kalus Keladi Tikus (Typonium flagelliforme. Lodd.) secara In Vitro," *Jurnal Littri*, Vol. 13 (2007) 142-146.

[23] E.F. George and P.D. Sherrington, *Plant Propagation by Tissue Culture*, England: Exegetis Limited (1984).
[24] 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).
[25] F. Ruswaningsih, "Pengaruh Konsentrasi Ammonium Nitrat dan BAP terhadap Pertumbuhan Eksplan Pucuk Artemisia annua L. pada Kultur In Vitro," Skripsi, Fakultas Pertanian UNS, Surakarta (2007).