

Respon Temu Putih dan Temu Mangga dengan Pemberian BA dan 2,4-D secara *In Vitro*

Muhammad Isra' Aulia¹ Rustikawati^{2*} dan Entang Inoriah³

¹Agrotea Bukit Daun, Indonesia

aulia.isra46@gmail.com

²Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Bengkulu, Indonesia

*corresponding author rustikawati@unib.ac.id

³Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Bengkulu, Indonesia

entanginoriah@unib.ac.id

Abstract

*Calus and shoot induction of curcuma sp requires the balance amount of auxin and cytokinins which are suitable for the plant species. This study was aimed at evaluating the response of 'temu putih' (*Curcuma zedoaria* Rosc.) and 'temu mangga' (*Curcuma mangga* Val.) to the supplementation of 5 ppm BA and several levels of 2,4-D on the MS medium of in vitro culture. The study was conducted in the Laboratory of Agronomy, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, the University of Bengkulu, from December 2018 to February 2019. The plant material was explants isolated from the buds of curcuma tubers. The experiment was conducted in a completely randomized design arranged in factorial with 2 factors. The first factor was the kinds of curcuma i.e. *C. zedoaria* and *C. mangga*. The second factor was the concentration of 2,4-D i.e. 0 ppm, 1 ppm and 2 ppm. The base culture medium was MS with 5 ppm BA. The experimental unit consisted of three bottle each of which containing of 1 explant. The treatment was repeated three times amounting to 54 experimental units. The results indicated that both curcuma had different growth response to in vitro culture. Addition of 2,4-D to the MS medium containing 5 ppm BA produced callus. Callus induction was formed in in vitro culture of *Curcuma zedoaria* supplemented with 1 ppm 2,4-D. Up to 2 ppm of 2,4-D, callus production of *Curcuma mangga* still increasing. Addition of 5 ppm of BA 5 to MS medium induced shoot formation in *Curcuma zedoaria* but not in *Curcuma mangga*.*

Keywords : *Curcuma mangga, Curcuma zedoaria, in vitro, shoot.*

1. Pendahuluan

Temu putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) dan temu mangga (*Curcuma mangga* Val.) merupakan jenis temu-temuan yang dimanfaatkan rimpangnya sebagai bahan baku rempah dan obat-obatan. Rimpang temu putih memiliki kandungan kimia yang bermanfaat sebagai minyak atsiri yang terdiri dari senyawa flavonoid dan seskuitterpen. Kedua senyawa tersebut memiliki fungsi sebagai hepatoprotektor, antioksidan, antiinflamasi dan antikanker (Widono dan Parfati, 2002). Rimpang temu mangga mengandung tiga senyawa yaitu kurkuminoid, flavonoid dan polifenol yang dikenal dengan senyawa antioksidan alami. Khasiat dari temu mangga ialah sebagai antioksidan, penurun panas (antipiretik), penangkal racun (antitoksik) dan pencahar. Konsumsi temu mangga secara umum digunakan sebagai penambah nafsu makan, pengobatan nyeri lambung, diare dan mengatasi gatal. Temu mangga juga dapat menghambat perkembangbiakan sel kanker (Hariana, 2006).

Dewasa ini kesadaran masyarakat akan dampak negatif dari obat-obatan kimia semakin tinggi. Kecenderungan kuat untuk kembali kepada cara-cara pengobatan dengan konsep "back to nature" menyebabkan tanaman temu putih dan temu mangga mempunyai prospek untuk dikembangkan secara besar-besaran. Permasalahan dalam pengembangan tanaman yang berbiak dengan rimpang adalah membutuhkan waktu yang cukup lama untuk mendapatkan turunannya.

Temu putih yang dikembangkan secara konvensional membutuhkan waktu sekurangnya 9 bulan dengan produksi total 16-17 kali lipat dari berat awal penanaman (Syukur, 2003). Selain waktu yang lama, perbanyakan konvensional juga sulit untuk mendapatkan bibit dengan kualitas yang seragam.

Teknologi kultur *in vitro* dapat digunakan sebagai alternatif solusi untuk pemenuhan kebutuhan bibit temu putih dan temu mangga. Beberapa hasil penelitian telah membuktikan bahwa perbanyakan rimpang dapat dilakukan dengan hasil yang bermutu baik, seragam, bebas penyakit dan dalam jumlah yang besar. Dalam metode perbanyakan melalui kultur *in vitro* pertumbuhan dan perkembangan eksplan sangat dipengaruhi oleh jenis media dasar dan zat pengatur tumbuh. Media Murashige and Skoog (MS) merupakan media dasar yang umumnya digunakan untuk perbanyakan sejumlah besar spesies tanaman. Media dasar tersebut kaya akan mineral yang merangsang terjadinya organogenesis. Media MS memberikan hasil pertumbuhan yang baik untuk perbanyakan berbagai tanaman rimpang seperti temu mangga (Raihana *et al.*, 2011); temulawak (Waryastuti *et al.*, 2017); temu hitam (Singh *et al.*, 2015); kunyit (Antoniazzi *et al.*, 2016).

Untuk meningkatkan multiplikasi eksplan, pada umumnya dalam media tumbuh diberikan zat pengatur tumbuh baik golongan auksin maupun sitokinin. Penambahan zat pengatur tumbuh tersebut akan merangsang proses pertumbuhan dan perkembangan jaringan tanaman. Pada temu mangga, pemberian BA 5 mg/l dan NAA 0,1 mg/l membentuk planlet terbaik. Sedangkan pemberian 2,4-D 1 mg/l pada media MS dapat menghasilkan kalus sebesar 78,2% dari eksplan rimpang jahe (Jala, 2013).

Jenis temu temuan lain seperti temulawak dapat membentuk kalus yang baik, banyak, inisiasi yang cepat dan efisien (optimal) dengan pemberian 2,4-D 2 ppm tanpa sitokinin (Waryastuti *et al.*, 2017). Tanaman rimpang lain seperti jahe dapat dirangsang pembentukan tunasnya pada media dengan MS penambahan 0,1 ppm NAA dan 5 ppm BAP (Jala, 2013). Kombinasi yang tepat dari kedua ZPT tersebut terbukti dapat meningkatkan jumlah tunas tanaman yang berasal dari eksplan rimpang. Untuk menentukan kombinasi ZPT terbaik yang dapat menginisiasi pertumbuhan tunas temu putih dan temu mangga yang diisolasi dari tanaman spesifik Bengkulu secara *in vitro* diperlukan serangkaian penelitian optimalisasi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan media dengan kombinasi ZPT yang tepat untuk pertumbuhan tunas temu putih dan temu mangga secara *in vitro*.

Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi respon temu putih dan temu mangga yang dikultur secara *in vitro* pada media dasar MS + BA 5 ppm dengan penambahan beberapa taraf 2,4-D

2. Bahan dan Metode

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2018 sampai Februari 2019 di Laboratorium Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Bengkulu. Rancangan lingkungan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah jenis temu yaitu temu putih dan temu mangga. Faktor kedua adalah konsentrasi 2,4-D terdiri dari 3 taraf yaitu 2,4-D 0 ppm, 2,4-D 1 ppm dan 2,4-D 2 ppm. Setiap unit percobaan terdiri atas 3 sampel dan diulang tiga kali sehingga terdapat 54 unit percobaan. Unit percobaan adalah botol yang ditanami dengan satu eksplan. Media dasar adalah MS + BA 5 ppm.

Eksplan berupa mata tunas dari rimpang yang sehat dengan ukuran $\pm 1\text{cm}^2$. Eksplan dicuci dengan air mengalir dan dimasukkan ke dalam gelas piala berisi larutan bakterisida dan fungisida. Eksplan direndam selama 30 menit dan dicuci bersih kembali dengan aquades.

Eksplan kemudian disterilkan dengan cara perendaman dalam larutan hipoklorit 3 kali, masing-masing 20% hipoklorit selama 7 menit, 20% hipoklorit selama 10 menit dan 20% hipoklorit selama 15 menit. Proses sterilisasi dilakukan di dalam LAC. Sebelum ditanam, bagian terluar yang rusak pada pencucian dengan hipoklorit dibuang dengan pisau scalpel. Kemudian eksplan dicuci dengan aquades steril tiga kali. Tahap akhir sterilisasi adalah merendam eksplan dalam larutan betadin selama 3 menit.

Alat yang digunakan disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C, tekanan 15 psi, selama 30 menit. Laminar Air Flow Cabinet (LAC) disemprot dengan alcohol 70 % kemudian dilanjutkan dengan menghidupkan lampu UV selama ± 40 menit. Setelah itu lampu UV dimatikan dan menghidupkan blower selama ± 30 menit sebelum LAC digunakan.

Pembuatan media diawali dengan membuat larutan stok pada masing-masing bahan kimia. Larutan stok nutrisi MS dan stok ZPT dibuat dengan tujuan untuk memudahkan penimbangan karena kemampuan alat penimbangan yang terbatas. pH media ditetapkan sebesar 8.8. Jika pH media lebih dari 5,8 ditambahkan HCl 0,1 N dan jika pH media kurang dari 5,8 ditambahkan NaOH 0,1 N sambil diaduk dengan magnetic stirrer. Setelah pH stabil, media dicampurkan agar dan dimasak hingga mendidih dan langsung dituang ke dalam botol steril dengan volume 20 ml/botol. Kemudian botol kultur ditutup rapat dengan penutup plastik dan disterilkan menggunakan autoclave pada suhu 121°C pada tekanan 15 psi selama 15 menit.

Penanaman eksplan dimulai dengan cara mengambil mata tunas rimpang yang telah disterilkan dan diletakkan diatas petridis kemudian ditutup. Mata tunas kemudian ditanam satu persatu pada media perlakuan.

Variabel yang diamati meliputi persentase eksplan yang hidup, persentase eksplan berkalus, hari pertama muncul kalus, panjang kalus, warna kalus, bobot kalus, tinggi tunas, jumlah tunas, jumlah akar dan panjang akar. Pengamatan persentase eksplan yang hidup dan eksplan berkalus dilakukan pada akhir penelitian dengan menghitung eksplan yang masih hidup dibandingkan dengan jumlah eksplan saat ditanam, dengan rumus:

$$\text{Persentase eksplan} = \frac{\text{jumlah eksplan yang hidup (berkalus)}}{\text{jumlah eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

Hari pertama muncul kalus dihitung mulai dari waktu tanam sampai hari munculnya kalus yang ditandai dengan pembengkakan pada tepi-tepi irisan eksplan atau pada permukaan perlukaan eksplan. Pengamatan panjang kalus dilakukan dengan cara mengukur panjang kalus terpanjang dengan menggunakan kertas milimeter blok diletakkan di bawah botol. Warna Kalus diamati setiap minggu. Warna meliputi perubahan secara umum kalus dari awal hingga akhir pertumbuhan meliputi putih, putih kekuningan, putih kehijauan dan putih kecoklatan. (Kherasani *et al.*, 2017). Pengamatan bobot kalus dilakukan pada akhir penelitian menggunakan timbangan digital.

Pengukuran tinggi tunas dilakukan dengan penggaris setiap minggu mulai dari eksplan tunas muncul hingga akhir penelitian. Pengukuran dilakukan di luar botol kultur. Jumlah tunas, dan jumlah akar dihitung jumlah tunas pada akhir penelitian. Untuk panjang akar hanya diukur akar terpanjang menggunakan penggaris setiap minggu dari akar muncul sampai akhir penelitian

Data hasil pengamatan dianalisis keragamannya menggunakan uji F pada taraf 5%. Jika terdapat perbedaan yang nyata dilakukan uji lanjut DMRT. Untuk data yang tidak memenuhi syarat dianalisis secara statistik dilakukan analisis deskriptif.

3. Hasil dan Pembahasan

Secara umum penelitian berjalan dengan kondisi lingkungan yang terkendali sehingga kontaminasi eksplan bisa dikendalikan kurang dari 15%. Beberapa eksplan mengalami browning dan kemudian mati walau dalam kondisi steril. Jumlah eksplan browning bervariasi antara 10% hingga 40%. Diduga hal tersebut terjadi akibat terdapat senyawa fenolik yang dikeluarkan eksplan ketika sel dilukai. Sementara itu ukuran eksplan awal yang ditanam yang hanya ± 10 mm² diduga terlalu kecil untuk keberlangsungan hidup eksplan. Hal ini dapat menurunkan regenerasi atau pembentukan kalus. Pengamatan kultur diakhiri pada minggu ke 12.

Dari enam perlakuan yang diuji, hanya satu perlakuan yang mampu membentuk tunas sedangkan perlakuan lain membentuk kalus dengan berbagai ukuran. Keseimbangan konsentrasi auksin dan sitokin yang ditambahkan dalam media mampu merangsang proses fisiologis dalam eksplan sehingga memacu organogenesis baik langsung ataupun tidak langsung melalui pembentukan kalus. Pada penelitian ini, tujuh eksplan mengalami stagnansi dimana eksplan tidak mati dan namun tidak tumbuh. Eksplan yang mengalami stagnansi tidak mengalami perubahan baik terhadap warna maupun ukuran. Hal tersebut diduga eksplan tidak mempunyai cukup nutrisi untuk berkembang pada media yang disiapkan. Selain itu pada tanaman yang berbiak dengan rimpang terdapat pengaruh dormansi apikal pada mata tunas samping jika mata tunas pucuk tidak dihilangkan. Dormansi merupakan suatu keadaan berhenti tumbuh yang dialami organisme hidup atau bagiannya sebagai tanggapan atas suatu keadaan yang tidak mendukung pertumbuhan normal yang dapat dipicu oleh suatu reaksi baik kimia, biologis maupun fisik dengan tujuan mempertahankan diri. Menurut Trisnawan *et al.* (2017), dormansi mata tunas merupakan mekanisme adaptasi tanaman terhadap perubahan kondisi lingkungan dan merupakan ritme pertumbuhan sebagai manifestasi dari hormon endogen.

Dari data yang diperoleh ternyata tidak semua memenuhi syarat untuk dianalisis secara statistik. Hanya variabel persen eksplan hidup, persen eksplan berkalus dan bobot kalus yang dilakukan uji anava. Hasil uji anava juga menunjukkan beberapa variabel memiliki nilai koefisien keragaman (KK) yang cukup tinggi sehingga dilakukan transformasi data (Tabel1).

Tabel 1

Rangkuman nilai F-hitung inisiasi tunas temu putih dan temu mangga dengan penambahan zat pengatur tumbuh secara *in vitro*

Variabel Pengamatan	F-hitung 5%				KK (%)
	Jenis Temu	Konsentrasi 2,4-D	Interaksi		
Persentase eksplan hidup ¹⁾	0,199 ns	0,600 ^{ns}	1,400 ns		5,870
Persentase eksplan berkalus ¹⁾	0,000 ns	6,700 *	0,605 ns		6,680
Bobot Kalus ¹⁾	2,377 ns	3,945 *	2,265 ns		7,780

Ket: * =berpengaruh nyata, ¹⁾ = data ditransformasi dengan $\text{sqrt}(x+1)$, KK =koefisien keragaman

Kemampuan eksplan hidup dan membentuk kalus

Respon jenis temu pada media dasar (MS + 5 ppm BA) ditambah 2,4-D hingga 2 ppm pada variabel persentase eksplan hidup dan persentase eksplan berkalus adalah sama. Dengan kata lain tidak ada interaksi antara jenis temu dengan konsentrasi 2,4-D untuk kedua variabel tersebut. kemampuan eksplan yang hidup antara 44,44% hingga 77,77% (Tabel 2). Penambahan 2,4-D hingga 2 ppm justru cenderung menurunkan persentase eksplan temu putih hidup. Sedangkan pada temu mangga, penambahan BAP 5 ppm dan 2,4-D 1 ppm pada media MS memberikan respon eksplan hidup paling banyak. 2,4-D merupakan auksin kuat yang sering dipakai untuk merangsang pembentukan kalus. Pada konsentrasi tertentu senyawa tersebut merupakan penghambat pertumbuhan tanaman. Namun setiap tanaman memiliki respon yang berbeda sehingga perlu dicari konsentrasi yang tepat pada setiap tanaman untuk memanfaatkannya. Selain itu pertumbuhan awal eksplan juga dipengaruhi oleh jumlah cadangan makanan endogen dan hormon endogen yang telah dibawa eksplan. Ukuran eksplan berpengaruh pada jumlah cadangan

makanan. Cahyati *et al.* (2016) menyatakan bahwa persentase hidup eksplan juga dipengaruhi oleh adanya cadangan makanan yang dibutuhkan.

Tidak semua eksplan yang diperlakukan membentuk kalus. Perlakuan temu putih dengan penambahan BA 5 ppm + 2,4-D 2 ppm paling banyak membentuk kalus yaitu 44,44% (Tabel 2). Hal ini dapat diduga baik eksplan maupun media dengan kombinasi ZPT yang diberikan belum mendapatkan keadaan yang optimal untuk pertumbuhan kalus. 2,4-D merupakan auksin sintetik kuat yang berfungsi memacu pembentukan kalus, sehingga penggunaan dengan taraf yang sedikit dapat menghambat pembentukan tunas dan terjadi pembentukan kalus (Waryastuti *et al.*, 2017).

Tabel 2

Interaksi jenis temu konsentrasi 2,4-D terhadap persentase eksplan hidup dan persentase eksplan berkalus

Perlakuan	Eksplan Hidup (%)	Eksplan Berkalus (%)
Temu Putih dengan 2,4-D 0 ppm	55,55	0,00
Temu Putih dengan 2,4-D 1 ppm	44,44	33,33
Temu Putih dengan 2,4-D 2 ppm	44,44	44,44
Temu Mangga dengan 2,4-D 0 ppm	44,44	11,11
Temu Mangga dengan 2,4-D 1 ppm	77,77	33,33
Temu Mangga dengan 2,4-D 2 ppm	44,44	33,33

Jenis temu berpengaruh tidak nyata terhadap persentase eksplan hidup. Persentase eksplan hidup pada temu mangga lebih besar dibandingkan dengan temu putih (Tabel 3). Varietas berperanan juga dalam menentukan kecocokan pada media secara *in vitro*. Ukuran eksplan yang digunakan yaitu $\pm 1\text{cm}$ mempengaruhi cadangan makanan yang ada pada tanaman untuk hidup.

Persentase eksplan berkalus sama untuk kedua jenis temu yaitu sebesar 25,92% (Tabel 3). Pembentukan kalus pada eksplan sangat ditentukan oleh zat pengatur tumbuh terutama jenis auksin yang ditambahkan pada media. Pelukaan sering dilakukan untuk merangsang tumbuhnya kalus. Pada penelitian ini pelukaan dilakukan pada keempat sisi eksplan. Eksplan yang digunakan berupa mata tunas juga merupakan eksplan dengan jaringan bersifat juvenil dan aktiv membelah. Diduga konsentrasi auksin yang belum tepat sehingga belum dapat merangsang pembentukan kalus secara eksploratif.

Tabel 3

Persentase eksplan hidup dan persentase eksplan berkalus pada temu putih dan temu mangga

Jenis Temu	Eksplan Hidup (%)	Eksplan Berkalus (%)
Temu Putih	51,85	25,92
Temu Mangga	53,70	25,92

Konsentrasi 2,4-D berpengaruh tidak nyata terhadap persentase eksplan hidup. terdapat kecenderungan penambahan BA 5 ppm + 2,4-D 1 ppm pada media MS lebih baik dibandingkan dengan tanpa 2,4-D atau 2,4-D 2 ppm (Tabel 4). Hal ini diduga pada konsentrasi 2 ppm, 2,4-D telah meracuni sel sehingga menurunkan potensi eksplan tumbuh. Sementara itu pada media tanpa penambahan 2,4-D telah tercukupi nutrisi untuk pertumbuhan eksplan sehingga memiliki jumlah eksplan hidup lebih banyak dibandingkan penambahan 2,4-D 2 ppm. Media MS mengandung unsur hara makro, mikro dan vitamin yang cukup untuk pertumbuhan eksplan (Inkiriwang *et al.*, 2016).

Persentase eksplan berkalus dipengaruhi oleh konsentrasi 2,4-D. Penambahan BA 5 ppm + 2,4-D 2 ppm pada media menghasilkan eksplan berkalus paling tinggi walaupun tidak berbeda nyata dengan penambahan BA 5 ppm + 2,4-D 1 ppm (Tabel 4). Terjadi kenaikan persentase eksplan berkalus secara nyata dengan penambahan konsentrasi 2,4-D. Penambahan 1 ppm dan 2 ppm 2,4-D tidak menghasilkan perbedaan persentase eksplan berkalus yang nyata. Auksin 2,4-D

memiliki peranan dalam merangsang pembelahan dan perbesaran sel sehingga terbentuk kalus. Hasil ini sejalan dengan penelitian Jala (2013) yang mendapatkan bahwa pemberian 2,4-D 1 ppm menghasilkan persentase eksplan Curcuma berkalus paling tinggi. Penelitian yang dilakukan Waryastuti *et al.* (2017) pada kultur temulawak, pemberian 2,4-D 2 ppm mampu menghasilkan kalus yang baik, banyak, inisiasi yang cepat dan efisien (optimal).

Tabel 4

Persen eksplan hidup dan persen eksplan berkalus pada tiga kombinasi zat pengatur tumbuh

Konsentrasi 2,4-D	Eksplan Hidup (%)	Eksplan Berkalus (%)
2,4-D 0 ppm	50,00	5,55 b
2,4-D 1 ppm	61,11	33,33 a
2,4-D 2 ppm	44,44	38,88 a

Kalus merupakan gumpalan sel-sel yang belum terdefernsiasi. Sel-sel tersebut terbentuk pada bagian eksplan yang dilukai. Hal ini diduga karena terjadi pembentukan jaringan penutup luka yang dirangsang dengan penambahan auksin. Ulfa (2011) menyatakan bahwa mekanisme kerja 2,4-D dalam pembentukan kalus diawali dengan difusi senyawa ke dalam jaringan tanaman melalui luka. 2,4-D yang diberikan kemudian akan merangsang jaringan eksplan untuk menstimulasi pembelahan sel terutama sel-sel yang berada disekitar daerah luka. Diperlukan perimbangan auksin dan sitokinin agar kalus dapat berkembang dengan cepat. Menurut Wahyuningtyas *et al.*, (2014), ZPT tunggal tidak dapat mengimbangi atau bahkan dapat menghambat hormon endogen dalam eksplan untuk membentuk kalus. Pemberian auksin efektif untuk pembentukan kalus, namun sitokinin sangat dibutuhkan untuk poliferasi kalus. Kombinasi dari auksin dan sitokinin yang tepat dapat memacu pertumbuhan kalus.

Munculnya kalus ditandai adanya pembengkakan permukaan eksplan pada bekas luka. Pembengkakan yang terjadi merupakan suatu proses awal penyerapan nutrisi dan ZPT dari media. Tahap selanjutnya terjadi perbanyak dan perkembangan sel yang berlebihan yang berfungsi untuk menutup luka. Temu putih yang tidak diberi perlakuan 2,4-D tidak muncul kalus. Dengan penambahan 2,4-D 1 ppm kalus muncul pada 11,33 hari. Peningkatan konsentrasi 2,4-D memperlambat munculnya kalus. Performa yang berbeda ditemukan pada temu mangga. Penambahan 2,4-D pada media justru mempercepat munculnya kalus. Kalus tercepat muncul pada 16,33 hari pada perlakuan dengan penambahan 2,4-D 2 ppm (Tabel 5).

Tabel 5

Jumlah hari munculnya kalus pada temu putih dan temu mangga yang diberi perlakuan 2,4-D

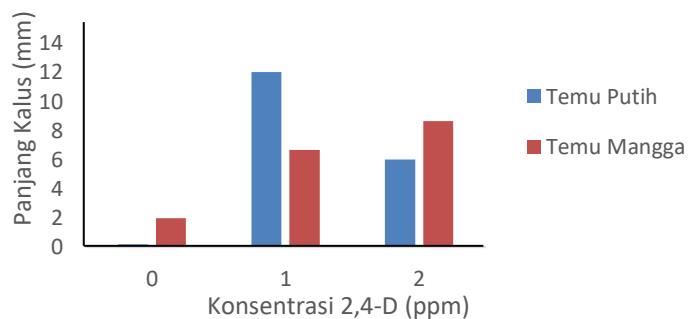
Perlakuan	Jumlah hari muncul kalus (hari)
Temu Putih dengan 2,4-D 0 ppm	0,00
Temu Putih dengan 2,4-D 1 ppm	11,33
Temu Putih dengan 2,4-D 2 ppm	20,66
Temu Mangga dengan 2,4-D 0 ppm	49,00
Temu Mangga dengan 2,4-D 1 ppm	22,00
Temu Mangga dengan 2,4-D 2 ppm	16,33

Ket : 0 = Eksplan hidup tetapi tidak tumbuh

Waryasruti *et al.* (2017) memperoleh hal yang sama pada temu lawak. Perlakuan 2,4-D 2 ppm mampu menginisiasi pembentukan kalus lebih cepat. Permadi *et al.* (2014) menyatakan bahwa

waktu terbentuk kalus lebih cepat ketika konsentrasi auksin meningkat. Semakin tinggi konsentrasi auksin akan semakin mempercepat pembelahan dan pembesaran sel. Cepat lambat munculnya kalus dipengaruhi juga oleh kerja hormon auksin dan sitokinin endogen. Seperti yang diungkapkan Indah dan Ermavitalini (2013) bahwa penambahan auksin dan sitokinin eksogen akan mengubah konsentrasi hormon endogen yang ada pada eksplan. Efektifitas zat pengatur tumbuh auksin maupun sitokinin eksogen bergantung pada konsentrasi hormon endogen dalam jaringan tanaman. Tanaman yang berbeda merespon ZPT dalam berbagai konsentrasi secara berbeda.

Selain waktu munculnya kalus, performa panjang kalus juga berbeda antara kedua temu. Panjang kalus temu putih meningkat dan tertinggi pada perlakuan 2,4-D 1 ppm (12 mm) dibandingkan tanpa 2,4-D. Sedangkan pada temu mangga, panjang kalus meningkat seiring penambahan konsentrasi 2,4 D. Perlakuan temu mangga dengan penambahan 2,4-D 2 ppm menghasilkan kalus sepanjang 8,66 mm (Gambar 1).



Gambar 1. Grafik panjang kalus temu putih dan temu mangga pada perlakuan penambahan 2,4 D

Ukuran kalus sangat tergantung pada kecepatan sel membelah yang dipengaruhi oleh pemberian ZPT. Semakin cepat sel membelah akan semakin cepat kalus terbentuk. Pada penelitian ini, temu putih dengan penambahan 2,4-D 1 ppm memiliki waktu tercepat membentuk kalus. hal tersebut berdampak juga pada ukuran kalus yang juga paling panjang. Sejalan dengan penelitian Sugiarto dan Paramita (2014) rataan kalus terpanjang didapat pada media 2,4-D 1 ppm dan menurun dengan peningkatan konsentrasi 2,4-D pada eksplan daun binahong. Perilaku pada temu mangga yang berbeda dengan temu putih menunjukkan bahwa setiap tanaman memiliki respon yang berbeda terhadap pemberian 2,4-D. Temu mangga lebih toleran pada 2,4-D sehingga konsentrasi yang tinggi justru merangsang pembentukan kalus lebih cepat dan menekan morfogenesis. perimbangan BA 5 ppm dengan 2,4-D 2 ppm sesuai untuk perkembangan kalus temu mangga. Hal tersebut sejalan dengan Wahyuningtiyas *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa sitokinin yang semakin tinggi akan semakin mempercepat induksi kalus sehingga mempengaruhi ukuran kalus yang terbentuk.

Warna kalus merupakan pannampilan visual kalus yang dapat menunjukkan tingkat perkembangan dan kematangan kalus. Dari warna kalus dapat diketahui kalus masih memiliki sel yang aktif membelah atau mati. Kherasani *et al.* (2017) menyatakan bahwa warna kalus pada jahe umumnya adalah putih kekuningan, putih dan putih kehijauan. Jala (2013) mendapatkan kalus jahe berwarna putih kekuningan yang kemudian berkembang menjadi kalus embriogenik dengan tekstur remah. Hasil analisis deskriptif secara makroskopis warna kalus yang dihasilkan pada eksplan mata tunas temu putih dan temu mangga bervariasi mulai dari putih, putih kehijauan, putih kekuningan hingga putih kecoklatan (Tabel 6). Kalus yang berwarna putih dan putih kehijauan mengindikasikan bahwa kalus tersebut sel-selnya masih aktif membelah. Warna putih kehijauan diduga merupakan calon kalus embriogenik yang mulai terbentuk calon pucuk. Kalus putih

kehijauan terbentuk pada kultur temu putih dengan penambahan 2,4-D 1 ppm. Penambahan 2,4-D sebanyak 2 ppm menghasilkan kalus yang berwarna putih kekuningan. Kalus yang berwarna kekuningan merupakan kalus yang masih dapat tumbuh dan berkembang dengan baik, sesuai dengan pendapat Rusdianto dan Indrianto (2012) yang menyatakan bahwa kalus yang berwarna putih bening atau kekuningan merupakan kalus yang dapat mengikuti pola embriogenik. Warna kalus kekuningan diduga disebabkan dari adanya senyawa fenol dari eksplan namun belum teroksidasi.

Pada temu mangga, kalus yang terbentuk lebih banyak berwarna putih. Warna putih pada kalus diakibatkan dari kalus yang belum memiliki kloroplas tetapi memiliki butir pati yang banyak. Fatmawati (2008), menjelaskan bahwa kalus yang berwarna putih atau terang mengidikasikan bahwa pertumbuhan kalus dalam keadaan cukup baik. Pada perlakuan tanpa penambahan 2,4-D bahkan kalus berwarna kecoklatan. Kalus yang berwarna kecoklatan diduga diakibatkan adanya senyawa fenol yang teroksidasi. Sterilisasi juga dapat menyebabkan fenol terangsang, hal ini sesuai dengan pendapat Sugiarto dan Paramita (2014) menyatakan bahwa senyawa fenol pada eksplan yang bersifat toksik yang sering terangsang akibat proses sterilisasi menyebabkan penurunan pertumbuhan pada sel-sel kalus.

Pada akhir penelitian kalus yang terbentuk ditimbang bobot segarnya. Bobot kalus merupakan akumulasi dari bahan kering akibat pembelahan sel yang terjadi secara terus menerus. Berdasarkan analisis statistik tidak terdapat perbedaan respon jenis temu terhadap penambahan 2,4-D. Namun terdapat kecenderungan pola yang berbeda antara temu putih dan temu mangga. Temu putih mampu membentuk kalus lebih baik pada penambahan 2,4-D 1 ppm, sedangkan temu mangga lebih berat pada penambahan 2,4-D 2 ppm (Tabel 6). Jenis temu tidak berpengaruh nyata terhadap bobot kalus. Temu putih memiliki rataan bobot kalus 0,27 gram sedangkan temu mangga 0,14 gram.

Tabel 6
Warna dan bobot kalus temu putih dan temu mangga yang diberi perlakuan 2,4-D

Perlakuan	Warna Kalus	Bobot Kalus (g)
Temu Putih dengan 2,4-D 0 ppm	-	0,00
Temu Putih dengan 2,4-D 1 ppm	Putih Kehijauan	0,52
Temu Putih dengan 2,4D 2 ppm	Putih Kekuningan	0,29
Temu Mangga dengan 2,4-D 0 ppm	Putih Kecoklatan	0,04
Temu Mangga dengan 2,4-D 1 ppm	Putih	0,16
Temu Mangga dengan 2,4-D 2 ppm	Putih	0,22

Ket : 0 = Eksplan hidup tetapi tidak tumbuh kalus

Pengaruh tunggal pemberian 2,4-D menghasilkan bobot kalus yang meningkat nyata dengan peningkatan konsentrasi hingga 2 ppm. Perlakuan penambahan 2,4-D 1 ppm menghasilkan bobot kalus tertinggi walaupun tidak berbeda dengan 2 ppm (Tabel 7).

Tabel 7
Rataan bobot kalus temu pada peningkatan konsentrasi 2,4-D

Konsentrasi 2,4-D	Bobot Kalus (g)
2,4-D 0 ppm	0,02 b
2,4-D 1 ppm	0,34 a
2,4-D 2 ppm	0,26 a

Ket: Angka-angka pada kolom yang sama diikuti huruf yang sama, berpengaruh nyata menurut uji lanjut DMRT pada tara 5%

Bobot kalus dipengaruhi oleh suplementasi zat pengatur tumbuh pada media. Pemberian auksin 2,4-D berdifusi kedalam jaringan tanaman dan meningkatkan tekanan osmosis yang

menyebabkan air masuk kedalam sel pada saat eksplan membentuk kalus dan menyebabkan bobot kalus meningkat. Zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin berperan dalam pembelahan dan pemanjangan sel sehingga aktivitas keduanya menyebabkan pertumbuhan sel kalus secara terus menerus. Semakin baik pertumbuhan kalus maka bobot yang dihasilkan semakin tinggi serta kalus yang semakin besar ditandai dengan gumpalan massa kalus yang semakin banyak.

Kemampuan eksplan membentuk tunas

Hasil kultur jaringan yang siap diaklimatisasi disebut planlet. Planlet merupakan tanaman berukuran kecil yang sudah lengkap memiliki organ pucuk dan akar. Seringkali pembentukan planlet diawali dengan pembentukan pucuk (tunas) kemudian diiringi dengan pembentukan akar. Pada penelitian ini, hanya satu perlakuan yang mampu membentuk tunas. Keseimbangan penggunaan ZPT pada media menentukan arah pertumbuhan eksplan, dimana penggunaan sitokinin dengan konsentrasi tinggi dapat membentuk tunas atau organogenesis secara langsung dan dapat dilihat pada perlakuan temu putih dengan ZPT BA 5 ppm dengan 2,4-D 0 ppm. Setiap eksplan pada perlakuan tersebut rata-rata membentuk 3 tunas dengan tinggi rata-rata 47,0 mm. Konsentrasi sitokinin yang tinggi menyebabkan tunas yang tumbuh membentuk tunas anakan dalam jumlah yang lebih banyak. Penggunaan eksplan yang berasal dari jaringan maristematik juga mempermudah pembentukan tunas.

Temu mangga yang memiliki karakteristik lebih toleran dengan penambahan 2,4-D hingga 2 ppm ternyata juga membentuk kalus pada konsentrasi 2,4-D 0 ppm dan tidak terbentuk tunas. Dengan kata lain temu mangga kurang sensitif dengan penambahan sitokinin. Pemanjangan tunas yang terjadi pada temu putih dikarenakan adanya proses pembelahan, pemanjangan dan pembesaran sel-sel baru yang terjadi pada meristem ujung yang diakibatkan dari rangsangan sitokinin BA. Pembentukan dan pertumbuhan tunas dipengaruhi oleh interaksi dan keseimbangan antara ZPT eksogen dan hormon endogen pada eksplan. Yulizar *et al.*, (2014) menyatakan bahwa aplikasi BAP 4,5 ppm dapat menginduksi tunas temu putih dalam 5 hari. Pada kedua jenis temu, penambahan 2,4-D pada media MS dengan BA 5 ppm tidak merangsang pertumbuhan tunas. Auksin 2,4-D merupakan jenis auksin sintetik kuat. Penggunaan dalam taraf yang sedikit sudah mempengaruhi arah pertumbuhan eksplan.

Tunas juga membentuk akar dengan panjang rata-rata 32,6 mm dan jumlah akar rata-rata 9,6. Akar yang muncul terjadi setelah terbentuk tunas. Hal ini didugadisebabkan adanya auksin endogen yang diproduksi dari bagian eksplan yang dikultur. Fathurrahman *et al.* (2012) menyatakan bahwa munculnya akar sering terjadi sesudah eksplan atau jaringan yang dikulturkan membentuk tunas. Tunas-tunas yang terbentuk akan merangsang pembentukan akar akibat adanya perimbangan auksin dan sitokinin yang tepat. Raihana *et al.* (2011) mendapatkan 2.2 tunas temu mangga dengan jumlah akar 10,7 pada media MS dengan zat pengatur tumbuh NAA 1 ppm dan BAP 3 ppm. Rasio auksin dan sitokinin tersebut menghasilkan kualitas kultur yang bervigor pada temu hitam Singh *et al.*, (2015) dan pada kunyit Antoniazzi *et al.*, 2016).

4. Kesimpulan

Temu putih dan temu mangga menunjukkan respon yang berbeda pada kultur *in vitro*. Penambahan 2,4-D pada media MS dengan BA 5 ppm menghasilkan kalus baik pada temu putih maupun temu mangga. Pada temu putih, konsentrasi 2,4-D 1 ppm lebih baik dalam merangsang pembentukan kalus. Sedangkan pada temu mangga konsentrasi 2,4-D hingga 2 ppm masih dapat meningkatkan ukuran kalus. Penambahan BA 5 ppm dalam media MS tanpa 2,4-D dapat menginisiasi pembentukan tunas pada temu putih namun tidak terjadi pada temu mangga.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada pengelola Laboratorium Agronomi yang telah memfasilitasi pelaksanaan penelitian ini.

Referensi

- Antoniazzi, D., de-Souza-Ferrari, M.P., Nascimento, A.B., Silveira, F.A., Pio, L.A.S., Pasqual, M., & Magalhães, H.M. (2016). Growth regulators, DNA content and anatomy in vitro-cultivated Curcuma longa seedlings. *African Journal of Biotechnology*, 15(32), 1711–1725.
- Cahyati, S., Isda, M.N. dan Lestari, W. (2016). Induksi tunas dari eksplan kotiledon dan epikotil in vitro jeruk siam (*Citrus nobilis lour.*) asal kampar pada media MS. *Jurnal Riau Biologia*, 1(5), 31-38.
- Fathurahman, Melisa and Sutriana, S., (2012). Pemberian Benzil Amino Purin (BAP) terhadap eksplan adenium (*Adenium obesum*) secara In Vitro. *Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Islam Riau. Riau*
- Fatmawati, A. (2008). Kajian konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap induksi kalus tanaman *Artemisia annua L.* secara in vitro. Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Negeri Surakarta. Surakarta.
- Hariana. (2006). Tumbuhan Obat dan Khasiatnya. Swadaya. Jakarta.
- Indah, P.N. dan Ermavitalini. D. (2013). Induksi kalus daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum Linn*) pada beberapa kombinasi konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 2(1), 1-6.
- Inkiriwang, A.E.B., Mandang, J. dan Runtunuwu, S. (2016). Substitusi media murashige dan skoog dengan air kelapa dan pupuk daun majemuk pada pertumbuhan anggrek *dendrobium* secara in vitro. *Jurnal Bioslogos*, 6 (1), 15-19.
- Jala, A. 2013. The effect of the 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid, benzyl adenine and paclobutrazol, on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis in turmeric (*Curcuma var. Chattip*). *Int. Trans. J. Eng. Manag. Sci. Tech*, 4(2), 105–110.
- Kherasani, I., Prihatani, E. dan Haryanti, S. (2017). Pertumbuhan kalus eksplan rimpang jahe merah (*Zingiber officinale Rosc.*) pada berbagai konsentrasi sukrosa secara in vitro. *Buletin Natomi dan Fisiologi*, 2 (1), 43-49.
- Permadi, A.B., Santoso dan Kamsinah. (2014). Upaya memacu pembentukan kalus dari eksplan kacang tanah (*Arachis hypogaea*) dengan 2,4-D dan kinetin. Skripsi. Unsoed. Purwokerto
- Raihana, R., Faridah, Q.Z., Julia, A.A., Abdelmageed, A.H.A., & Kadir, M.A. (2011). In vitro culture of Curcuma mangga from rhizome bud. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(28), 6418–6422.
- Rusdianto and 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.
- Singh, W.R., Singh, H.B., Devi, S.S., Singh, W.N., Singh, N.M., & Devi, Y.P. (2015). Conservation of *Curcuma caesia* by in vitro techniques. *Helix*, 2, 708–713
- Sugiarto, L dan Kuswandi, P.C. (2014). Induksi kalus daun binahong (*Anredera cordifolia L.*) dalam upaya pengembangan tanaman obat tradisional. *Jurnal Sains Dasar*, 3(1), 56-60.
- Syukur, C. (2003). Temu Putih Tanaman Obat Anti Kanker. Penerbit Swadaya. Jakarta.
- Trisnawan, A.S., Sugiyatno, A., Fajrini, S. dan Setyobudi, L. (2017). Pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh pada pematahan dormansi mata tunas tanaman jeruk (*Citrus sp.*) hasil okulasi. *Jurnal Produksi Tanaman*, 5(5), 742-747.
- Ulfa, M.B. (2011). Penggunaan 2,4-D untuk induksi kalus kacang tanah. *Media Litbang Sulteng*, 4(2), 137-147.
- Wahyuningtiyas, L., Resmisari R.S. dan Nashichuddin, A. (2014). Induksi kalus akasia (*Acacia mangium*) dengan penambahan kombinasi 2,4-D dan BAP pada media MS. Thesis. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Waryastuti, D.E., Setyobudi, L. dan Wardiyati, T. (2017). Pengaruh tingkat konsentrasi 2,4-D dan BAP pada media MS terhadap induksi kalus embriogenik temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*). *Jurnal Produksi Tanaman*, 5(1), 140 – 149.
- Widono, M.S dan Parfiani, N. (2002). *Curcuma zedoaria* Roch. Kajian Pustaka Kandungan Kimia dan Aktifitas Farmakologik. *Jurnal Artocarpus*, 2(1), 1 -10.
- Yulizar, D.R., Noli, Z.A. dan Idris, M. (2014). Induksi tunas kunyit putih (*Curcuma zedoaria Roscoe*) pada media MS dengan penambahan berbagai konsentrasi BAP dan sukrosa secara in vitro. *J. Bio. UA*, 3(4), 2303-2162.

