



Pertumbuhan Kalus dari Daun Belimbing Merah (*Baccaurea angulata*) dengan Penambahan 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) dan Kinetin

Murni¹, Zulfa Zakiah^{1*}, Masnur Turnip¹

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Tanjungpura, Kota Pontianak

*e-mail korespondensi: zulfazakiah@gmail.com

ABSTRACT

*Red starfruit (*Baccaurea angulata*) is a fruit endemic to Kalimantan which is used as a food source and natural medicinal ingredient. The fruit produced is often found without seeds, which is one of the obstacles in generative propagation. Tissue culture is an alternative for propagating red starfruit to obtain seedling or secondary metabolites through callus culture. The objective of the research was to determine the effect of 2,4-D and kinetin on the callus growth and to obtain the best concentration to induce callus. Experimental research using factorial Completely Randomized Design (CRD), namely 2,4-D (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 ppm) and kinetin (0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 ppm). Observation parameters included the time of callus emergence (days after planting), the wet and dry weight of the callus (g), color and texture of the callus. The results showed that the combination of 2,4-D and kinetin had a significant effect on the time of callus emergence, but didn't on the wet and dry weight of the callus. The fastest callus emergence time was obtained of 2.5 ppm 2,4-D and 0.5 ppm kinetin, 1.5 ppm 2,4-D, and 2.5 ppm kinetin namely 6 DAP. The color of the callus produced is white, brown and brownish with a friable and compact callus texture. Another response that emerged was root growth.*

Keywords: *Baccaurea angulata*, callus, propagation

ABSTRAK

*Belimbing merah (*Baccaurea angulata*) merupakan buah endemik Kalimantan yang dimanfaatkan sebagai sumber makanan dan bahan obat alami. Buah yang dihasilkan sering ditemukan dalam kondisi tanpa biji yang menjadi salah satu kendala dalam perbanyakan generatif. Kultur jaringan merupakan alternatif perbanyakan tanaman belimbing merah untuk memperoleh bibit atau metabolit sekunder melalui kultur kalus. Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh 2,4-D dan kinetin terhadap pertumbuhan kalus daun belimbing merah dan mendapatkan konsentrasi terbaik untuk menginduksi kalus. Penelitian eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial, terdiri atas dua faktor perlakuan yaitu konsentrasi 2,4-D (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 ppm) dan konsentrasi kinetin (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 ppm). Parameter pengamatan meliputi waktu muncul kalus (hari setelah tanam), bobot basah dan bobot kering kalus (g), warna dan tekstur kalus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi 2,4-D dan kinetin berpengaruh nyata terhadap waktu muncul kalus, namun tidak berpengaruh nyata terhadap bobot basah dan bobot kering kalus. Waktu muncul kalus tercepat diperoleh pada perlakuan kombinasi 2,5 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin, 1,5 ppm 2,4-D dan 2,5 ppm kinetin yaitu 6 hst. Warna kalus yang dihasilkan putih, kecokelatan, dan coklat dengan tekstur kalus remah dan kompak. Respon lain yang muncul adalah tumbuhnya akar.*

Kata kunci: *Baccaurea angulata*, perbanyakan, kalus



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

PENDAHULUAN

Belimbing merah (*Baccaurea angulata*) atau belimbing hutan, adalah tumbuhan tropis endemik Kalimantan yang menghasilkan buah. Tumbuhan ini termasuk dalam keluarga Phyllantaceae dan memiliki potensi besar sebagai sumber makanan dan obat alami. Buah belimbing merah berwarna merah dan memiliki bentuk yang mirip dengan belimbing. Bagian yang dapat dimakan dari buah ini adalah daging buah dan kulitnya. Masyarakat sering menggunakan daun, buah, dan kulit batang belimbing merah sebagai obat. Secara empiris tumbuhan ini memiliki banyak manfaat, seperti mengobati sembelit, bengkak pada mata, serta memperlancar haid dan buang air kecil. Buahnya juga digunakan sebagai pencegah aterosklerosis dan mengurangi stres oksidatif, sementara kulit batangnya digunakan sebagai obat reumatik dan bahan bangunan. Analisis fitokimia oleh Gunawan *et al.*(2018) menunjukkan bahwa di dalam buah belimbing merah terkandung karbohidrat, protein, mineral, serat, dan vitamin A, C, dan E, serta mengandung senyawa terpen, fenolik, dan alkaloid.

Beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan dapat menjelaskan manfaat belimbing merah. Buah belimbing merah juga memiliki efektivitas dalam melawan bakteri (Ibrahim *et al.*, 2013). Penelitian Mikail *et al.* (2015) memperoleh hasil bahwa kulit buah belimbing merah efektif mengatasi *hypercholesterolemic*, mencegah *arterosclerosis* dan mencegah penyakit jantung. Hasil penelitian (Momand *et al.* (2014) menjelaskan bahwa pertumbuhan bakteri patogen *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Pseudomonas aeruginosa* dihambat oleh senyawa antibakteri yang terkandung dalam buah. Hazali *et al.* (2015) menjelaskan bahwa jus kulit buah belimbing merah yang mengandung flavonoid berpotensi menurunkan dan menghambat aktivitas lipid peroksidase dan menginduksi aktivitas enzim antioksidan.

Banyaknya manfaat yang terkandung dalam belimbing merah menyebabkan eksploitasi terhadap tanaman ini semakin meningkat. Kendala yang dialami adalah tanaman belimbing merah yang tersebar belum merata. Masa reproduksi atau waktu berbuah tanaman belimbing merah terjadi sekali dalam setahun. Setiap musim buah, kendala lainnya ditemukan buah yang tidak berdaging dan tidak berbiji (Sudarmono, 2018). Perbanyak tanaman belimbing merah secara *in vitro* belum ada informasinya, sehingga perlu dilakukan perbanyak secara *in vitro* salah satunya dengan kultur kalus dari daun belimbing merah.

Kultur kalus dapat dilakukan untuk berbagai tujuan diantaranya untuk perbanyak bibit ataupun untuk memperoleh metabolit sekunder. Kultur daun *Pimpinella alpina* pada media MS berhasil menginduksi kalus untuk tujuan perbanyak (Faramayuda *et al.*, 2022). Penelitian Hemmati *et al.*(2020) berhasil menginduksi kalus dari daun, petiol dan meristem apikal dari *Salvia tebesana* Bunge untuk tujuan mendapatkan senyawa fenolik yang berfungsi sebagai antioksidan. Menurut Bhojwani & Dantu, (2013), kalus umumnya terbentuk pada jaringan yang terluka dan merupakan massa sel yang belum terdiferensiasi. Kalus dapat diinduksi dari jaringan meristematik dan jaringan dewasa atau jaringan yang telah mengalami diferensiasi. Namun jaringan meristematik lebih mudah untuk diinduksi membentuk

kalus karena sel-selnya memiliki aktivitas pembelahan sel yang tinggi. Astuti *et al.* (2020) menjelaskan bahwa keberhasilan kultur untuk menginduksi kalus sangat tergantung pada sumber eksplan, tipe zpt dan kombinasi konsentrasi zpt. Eksplan potongan daun dari perkecambahan *in vitro* biji dapat digunakan untuk pembentukan kalus.

Trigiano & Gray (2005) menjelaskan bahwa dalam kultur jaringan auksin merupakan zpt yang paling sering digunakan untuk induksi kalus dan pertumbuhan sel, sedangkan sitokinin digunakan untuk merangsang pembelahan sel. 2,4-D dan kinetin merupakan zpt jenis auksin dan sitokinin sintetik yang umum digunakan untuk kultur kalus. Dwiyani (2015) menjelaskan bahwa rasio zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang berimbang di dalam media akan mendorong terbentuknya kalus pada eksplan yang ditanam. Menurut Koelling (2017) pemilihan zpt 2,4-D dilakukan karena jumlah kandungan gugus karboksil 2,4-D yang memiliki karbon dan oksigen sehingga aktivitasnya yang lebih stabil, zpt ini mampu untuk memacu proses diferensiasi sel, menekan organogenesis. Pemilihan kinetin digunakan untuk mengatur diferensiasi kalus menjadi jaringan-jaringan khusus seperti akar dan tunas. Sitokinin jenis kinetin bersifat tahan terhadap degradasi.

Penggunaan zpt pada kultur kalus untuk mempercepat pertumbuhan kalus telah dibuktikan dalam beberapa penelitian. Penelitian yang dilakukan Musthofa (2018) menunjukkan bahwa waktu muncul kalus pada kultur daun nilam Aceh (*Pogostemon cablin* Benth.) dengan pemberian konsentrasi 1,3 mg/L - 1,4 mg/L 2,4-D dan 0,75 mg/L - 1 mg/L kinetin lebih baik dibandingkan perlakuan kontrol. Hasil penelitian Rahayu *et al.* (2003) didapatkan penambahan 0,5 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin pada media MS (*Murashige Skoog*) dapat mempercepat waktu muncul kalus pada eksplan daun *Acalypha indica*. Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian mengenai pertumbuhan kalus dari daun tanaman belimbing merah (*Baccaurea angulata*) secara *in vitro* dengan penambahan zpt 2,4-D dan kinetin.

METODE

Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, UPT Laboratorium Terpadu dan Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Tanjungpura, Pontianak dari bulan April 2022 hingga Januari 2023.

Bahan dan alat

Autoklaf untuk sterilisasi, alat-alat gelas, hot plate, kompor, Laminar Air Flow Cabinet (L AFC), kertas saring, magnetic stirrer, indikator pH, pinset, pisau skalpel, pipet ukur dan timbangan analitik digunakan sebagai penunjang penelitian. Agar, air destilasi, etanol 70%, buah belimbing merah (*Baccaurea angulata*), 2,4-D (*Dichlorophenoxyacetic Acid*), kinetin (*6-furfuryl amino purine*), kloroks, deterjen, gula, larutan stok, media Murashige dan Skoog (MS), asam klorida (HCl), natrium hidroksida (NaOH), dan spiritus adalah bahan penelitian yang digunakan.

Pelaksanaan penelitian

Penelitian ini disusun berdasarkan rancangan acak lengkap faktorial yang terdiri dari 2 faktor. Faktor pertama: enam taraf konsentrasi 2,4-D (0 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 1,5 ppm; 2 ppm; 2,5 ppm) dan Faktor kedua : enam taraf konsentrasi kinetin (0 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 1,5 ppm; 2 ppm; 2,5 ppm). Kombinasi perlakuan adalah 36 kombinasi, masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 108 unit percobaan.

Sterilisasi Alat

Semua alat gelas dan alat tanam seperti pinset, tangkai skalpel sebelum digunakan dicuci dengan sabun cair dan dibilas dengan air mengalir hingga bersih dan dikeringanginkan. Selanjutnya alat-alat dibungkus dengan plastik mika dan dimasukkan ke dalam alat untuk sterilisasi (autoklaf). Alat sterilisasi diatur pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 30 menit.

Pembuatan dan Sterilisasi Media

Media yang digunakan terdiri atas media perkecambahan dan media kultur (media agar). Pembuatan media perkecambahan dilakukan dengan cara membasahkan kapas dengan akuades steril selanjutnya dimasukkan pada botol kultur. Botol ditutup, kemudian disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 30 menit. Media kultur dibuat dengan cara menimbang gula pasir (30 g/L) yang dilarutkan dengan akuades di dalam gelas beaker menggunakan alat pengaduk *magnetic stirrer* . Larutan stok hara MS dalam bentuk stok A, B, C, D, E, F, G dan H dipipet dengan volume sesuai tingkat kepekatan larutan dan volume media yang akan dibuat. Agar dilarutkan dengan akuades dan dipanaskan sampai mendidih. Larutan hara dan gula dicampur dengan larutan agar dan dicukupkan volumenya sesuai jumlah kombinasi yang akan dibuat dengan menambahkan akudes.

Langkah berikutnya, media dibagi ke dalam wadah yang berbeda. Media ditambah 2,4 D dan kinetin sesuai perlakuan, selanjutnya masing-masing media perlakuan ditepatkan sesuai volume yang akan dibuat dengan penambahan akuades, setelah itu diukur pH larutan hingga pH 5-6. Penaturan pH menggunakan NaOH dan HCl. Sterilisasi media diatur pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 30 menit menggunakan autoklaf.

Sterilisasi Buah

Buah belimbing merah dicuci dengan sabun cair dan dibilas dengan air. Sterilisasi permukaan dilanjutkan di bawah air mengalir selama 30 menit. Buah yang telah dicuci kemudian disterilkan menggunakan kloroks bertingkat yaitu 5%, 10%, 15%, alkohol 70%. Setelah itu, buah dibilas 3 kali dengan akuades steril masing-masing selama 1 menit. Prosedur sterilisasi buah yang dilakukan menurut prosedur Gultom *et al.* (2012) yang dimodifikasi.

Perkecambahan Biji

Perkecambahan biji diawali dengan penanaman biji pada media perkecambahan yang dilakukan di *Laminar Air Flow Cabinet*. Buah yang telah steril kemudian dibelah untuk mengambil bijinya. Bagian kulit ari biji dibuang, selanjutnya biji ditanam pada media perkecambahan. Setiap botol ditanam sebanyak

2-3 biji. Botol ditutup dengan plastik mika dan diikat lalu diberi label tanggal penanaman, di inkubasi selama 28 hari dan disimpan pada rak kultur.

Penanaman Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah daun dari kecambah belimbing merah. Proses penanaman diawali dengan mengeluarkan kecambah dari media kapas. Selanjutnya kecambah diletakkan di cawan petri dan dilakukan pemotongan eksplan daun. Ukuran eksplan daun yang digunakan $\pm 1 \times 1$ cm. Eksplan daun kemudian ditanam pada media sesuai perlakuan yang sudah ditentukan. Satu botol ditanam 2-3 eksplan daun. Eksplan yang sudah ditanam pada media diberi label tanggal penanaman.

Analisis data

Waktu muncul kalus, bobot basah dan bobot kering kalus yang merupakan data kuantitatif dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) menggunakan aplikasi SPSS 26. Warna dan tekstur kalus yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Perlakuan yang berpengaruh nyata, diuji lanjut menggunakan Duncan's Multiple Range Test (DNMRT) pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

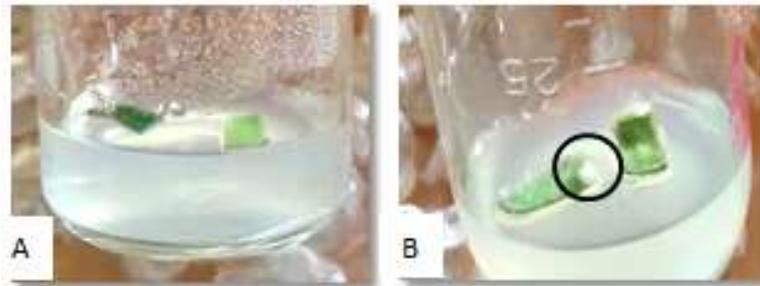
Waktu muncul kalus

Berdasarkan analisis statistik faktor tunggal 2,4-D, faktor tunggal kinetin dan faktor interaksi 2,4-D dan kinetin memperlihatkan pengaruh yang signifikan terhadap rerata waktu muncul kalus (Tabel 1, Gambar 1). Perlakuan yang menunjukkan rerata waktu muncul kalus tercepat adalah perlakuan D0K0,5 ppm; D2,5K0,5 ppm dan D1,5K2,5 ppm dengan rerata waktu muncul kalus 6 hst. Sedangkan rerata waktu muncul kalus terlama adalah 14 hst ditunjukkan oleh perlakuan kombinasi D1K1,5; D2,5K2; dan D0,5K2,5 ppm yang juga berbeda nyata terhadap kontrol dan beberapa perlakuan lainnya.

Tabel 1. Rerata waktu muncul kalus pada kultur daun *B. angulata* umur 28 hst dengan penambahan 2,4-D dan kinetin

Rerata Waktu Muncul Kalus (hst)							
2,4-D (ppm)	Kinetin (ppm)						Rerata
	0	0,5	1	1,5	2	2,5	
0	7,67 \pm 0,58 ^{cde}	6,00\pm0,00^a	12,33 \pm 0,58 ^{ijk}	11,67 \pm 1,16 ^{ij}	12,67 \pm 0,58 ^{jk}	9,33 \pm 0,58 ^{fgh}	9,94 B
0,5	7,67 \pm 0,58 ^{cde}	8,67 \pm 0,58 ^{efg}	13,33 \pm 0,58 ^{kl}	11,67 \pm 0,58 ^{ij}	6,67\pm0,58^{ab}	14,00 \pm 0,00 ^l	10,33 C
1	7,00 \pm 0,00 ^{bc}	12,33 \pm 0,58 ^{ijk}	7,33 \pm 0,58 ^{bcd}	14,00 \pm 0,00 ^l	11,67 \pm 0,58 ^{ij}	12,67 \pm 0,58 ^{jk}	10,83 D
1,5	10,00 \pm 1,00 ^h	6,67\pm0,58^{ab}	11,33 \pm 0,58 ⁱ	10,00 \pm 0,00 ^h	13,33 \pm 0,58 ^{kl}	6,00\pm0,00^a	9,56 B
2	7,00 \pm 0,00 ^{bc}	9,67 \pm 0,58 ^{gh}	8,33 \pm 0,58 ^{def}	12,33 \pm 1,16 ^{ijk}	7,67 \pm 0,58 ^{cde}	9,33 \pm 0,58 ^{fgh}	9,06 A
2,5	11,33 \pm 0,58 ⁱ	6,00\pm0,00^a	10,00 \pm 0,00 ^h	9,33 \pm 0,58 ^{fgh}	14,00 \pm 0,00 ^l	8,67 \pm 0,58 ^{efg}	9,89 B
Rerata	8,44 A	8,22 A	10,44 C	11,50 E	11,00 D	10,00 B	

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf besar dan huruf kecil yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata pada taraf 5% berdasarkan uji lanjut Duncan.



Gambar 1. Waktu muncul kalus kultur daun *B. angulata* pada perlakuan $D_{1,5}K_{2,5}$ ppm. A. eksplan daun setelah tanam; B. eksplan daun berkalus (Keterangan dilingkari=kalus).

Waktu muncul kalus diamati setelah satu hari penanaman (Gambar 1A). Awal munculnya kalus ditandai dengan eksplan yang mengalami pembengkakan. Hal tersebut terjadi karena eksplan menyerap zpt dan unsur hara yang ada pada media. Kombinasi zpt yang ditambahkan pada media menyebabkan air dapat masuk secara difusi ke dalam sel karena permeabilitas dinding sel yang berubah. Masuknya air akan menyebabkan terjadinya pembesaran pada sel daun. Perkembangan selanjutnya, kalus mulai terbentuk pada eksplan di bagian tepi bekas sayatan daun ditandai dengan adanya pertumbuhan sel berwarna putih yang tumbuh di tepi eksplan yang terluka (Gambar 1B). Pembengkakan dan munculnya kalus putih tersebut diduga bahwa eksplan sudah merespon media yang diberikan yang selanjutnya akan melakukan pembelahan sel (proliferasi). Sel-sel eksplan yang berkontak langsung dengan media secara aktif akan membelah membentuk kalus yang merupakan jaringan penutup luka. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Indah & Ermavitalini (2013) bahwa pada bagian eksplan yang dilukai akan menunjukkan respon berupa munculnya sel putih atau bening yang akan terus membelah dan tumbuh membentuk kalus.

Berdasarkan Tabel 1, Perlakuan kombinasi $D_{2,5}K_{0,5}$; $D_0K_{0,5}$; $D_{1,5}K_{2,5}$; $D_{1,5}K_{0,5}$; dan $D_{0,5}K_2$ ppm merupakan konsentrasi yang menginduksi kalus paling cepat. Perlakuan tersebut menunjukkan bahwa 2,4-D dan kinetin berfungsi untuk menginduksi kalus pada eksplan. Pemberian 2,4-D dan kinetin pada media sudah efektif dan seimbang untuk pembentukan kalus. Penelitian Novitasari & Isnaini (2021), memperoleh hasil bahwa penggunaan 2,4-D 2 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L mampu menghasilkan waktu tercepat induksi kalus daun *Nepenthes gracilis*, karena saat zpt eksogen yang diberikan dan zpt endogen dalam keadaan setimbang dan tepat sehingga mampu merangsang pembelahan sel dalam jaringan tanaman dengan cepat. Berdasarkan perlakuan tunggal 2,4-D waktu muncul tercepat ditunjukkan pada konsentrasi 2 ppm dengan rerata waktu muncul kalus yaitu 9,06 hst, sedangkan perlakuan tunggal kinetin waktu muncul tercepat ditunjukkan pada konsentrasi 0,5 ppm dengan rerata waktu muncul kalus yaitu 8,22 hst. Sehingga untuk mempercepat waktu tumbuh kalus dibutuhkan kombinasi yang tepat antara 2,4-D dan kinetin. Menurut Lestari (2011) penggunaan zpt dalam kultur jaringan memiliki peran mengatur kecepatan pertumbuhan kalus.

Perlakuan yang menunjukkan respon tumbuh kalus paling lama adalah $D_{2,5}K_2$; $D_{0,5}K_{2,5}$ dan $D_1K_{1,5}$ ppm, diduga karena zpt yang diberikan belum tepat dan sesuai. Hasil ini menunjukkan bahwa kombinasi

zpt yang diberikan tidak menghasilkan perimbangan rasio auksin dan sitokinin endogen jaringan, sehingga pertumbuhan dan perkembangan kalus terhambat dan menjadi lebih lama dibanding perlakuan $D_{2,5}K_{0,5}$; $D_0K_{0,5}$; $D_{1,5}K_{2,5}$; $D_{1,5}K_{0,5}$; dan $D_{0,5}K_2$ ppm. Hasil penelitian Karimian *et al.* (2014) menjelaskan bahwa ada batasan konsentrasi 2,4-D dan kinetin yang dapat menyebabkan peningkatan pertumbuhan pada kalus *Taxus brevifolia* Nutt. Dijelaskan bahwa 2,4-D pada konsentrasi lebih tinggi 1 mg/L masih memberikan pengaruh meningkatkan bobot basah kalus, namun pada konsentrasi 1,5 mg/L menyebabkan pertumbuhan kalus yang melambat. Sementara itu, kinetin pada konsentrasi di atas 0,5 mg/L mempunyai efek menghambat pertumbuhan kalus. Menurut Asra *et al.* (2020) pertumbuhan dan perkembangan jaringan tanaman dapat ditingkatkan, dihambat ataupun diubah oleh zpt yang aktif bekerja pada konsentrasi rendah.

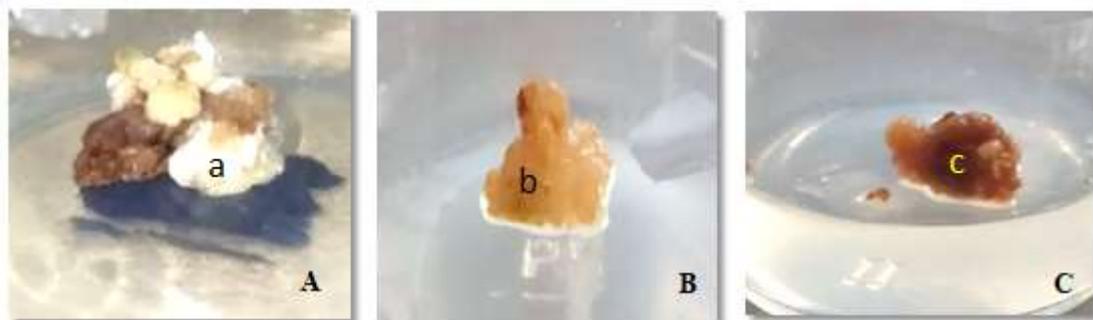
Tekstur dan Warna Kalus

Tekstur kalus yang terbentuk pada penelitian ini yaitu kalus kompak dan remah. Warna kalus yang dihasilkan bervariasi yakni warna putih, kecokelatan dan coklat (Tabel 2, Gambar 2, Gambar 3 dan Gambar 4).

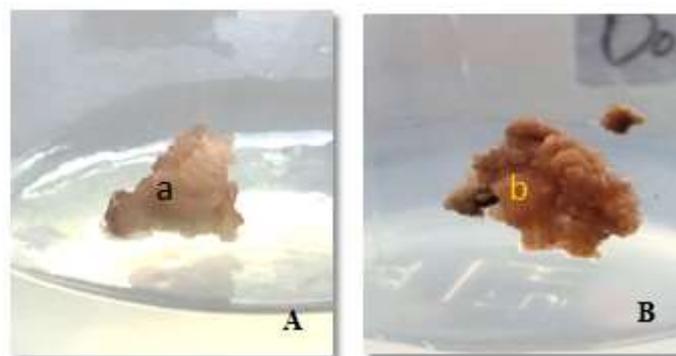
Tabel 2. Tekstur kalus dan warna kalus kultur daun *B. angulata* pada media MS dengan penambahan 2,4-D dan kinetin umur 84 hst

konsentrasi ZPT (ppm)		warna kalus	tekstur kalus	Respon lain
2,4-D	Kinetin			
0	0	putih, coklat	kompak	-
	0,5	kecokelatan, coklat	kompak	-
	1,0	kecokelatan	remah	-
	1,5	putih, kecokelatan	kompak	-
	2,0	cokelat	kompak	-
	2,5	kecokelatan	remah	-
0,5	0	cokelat	kompak	-
	0,5	cokelat	kompak	-
	1,0	kecokelatan	kompak	-
	1,5	putih, coklat	kompak	-
	2,0	putih, kecokelatan	kompak	-
	2,5	putih, kecokelatan	kompak	akar
1,0	0	putih, kecokelatan, coklat	remah	-
	0,5	cokelat	kompak	-
	1,0	cokelat	kompak	-
	1,5	kecokelatan, coklat	kompak	akar
	2,0	cokelat	kompak	-
	2,5	putih, kecokelatan	kompak	-
1,5	0	putih, kecokelatan	kompak	-
	0,5	cokelat, kecokelatan	kompak	-

	1,0	Cokelat	kompak	-
	1,5	Cokelat	kompak	-
	2,0	putih, kecokelatan	kompak	-
	2,5	Cokelat	remah	-
	0	putih, kecokelatan	kompak	-
	0,5	putih, coklat	remah	-
2,0	1,0	putih, kecokelatan	remah	akar
	1,5	Cokelat	remah	-
	2,0	Cokelat	remah	-
	2,5	putih, coklat	kompak	-
	0	putih, kecokelatan	remah	-
	0,5	putih, coklat	remah	-
2,5	1,0	putih, kecokelatan	kompak	-
	1,5	kecokelatan	kompak	akar
	2,0	Cokelat	kompak	-
	2,5	putih, kecokelatan	kompak	-

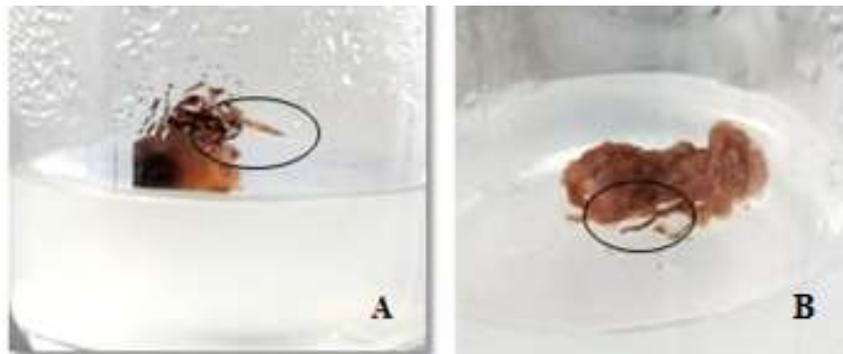


Gambar 2. Warna kalus pada kultur daun *B. angulata* umur 84 hst dengan penambahan 2,4-D dan kinetin. A. Perlakuan D_{2,5}K_{0,5} ppm. B. Perlakuan D₀K₁ ppm. C. Perlakuan D₂K_{1,5} ppm. (a. Putih; b. kecokelatan; c.cokelat).



Gambar 3. Tekstur kalus pada kultur daun *B. angulata* umur 84 hst dengan penambahan 2,4-D dan kinetin. A. Perlakuan D₁K_{2,5} ppm. B. Perlakuan D₀K_{2,5} ppm (a. kalus kompak; b. kalus remah).

Respon lain yang diperoleh selain kalus, warna kalus dan tekstur kalus adalah adanya pertumbuhan akar pada beberapa perlakuan (Gambar 4).



Gambar 4. Akar dari kalus daun *B. angulata* pada perlakuan A. D₁ K_{1,5}; B. D_{2,5}K_{1,5} (lingkaran=akar).

Warna kalus diperoleh dengan pengamatan secara visual. Secara umum pada semua perlakuan warna kalus yang terbentuk di akhir pengamatan berwarna putih, kecokelatan hingga cokelat. Ariewari et al. (2018); Martinez et al. (2021), menjelaskan bahwa keadaan warna kalus pada akhir pengamatan dapat bervariasi ditentukan oleh beberapa faktor seperti adanya pigmentasi, cahaya dan eksplan. Perubahan warna kalus terjadi karena adanya perubahan tahapan pertumbuhan sel. Pada tahap awal sel-sel muda berwarna putih menunjukkan karakter sel yang aktif membelah. Tahap pertumbuhan sel selanjutnya kalus akan memperlihatkan warna putih-kekuningan hingga kecokelatan dan cokelat. Hasil yang diperoleh di akhir pengamatan pada Tabel 2 warna kalus yang terbentuk adalah putih, cokelat dan kecokelatan. Warna kalus yang terbentuk berwarna putih dan setelah itu menjadi putih kehijauan, putih kekuningan hingga kecokelatan. Menurut Ariati *et al.* (2012) kalus yang berwarna putih umumnya tersusun atas sel embrionik dengan kandungan butir pati yang tinggi. Hal ini sesuai dengan Rasud & Bustaman (2020), bahwa kalus yang karakteristiknya berwarna putih merupakan sel-sel yang sedang aktif membelah. Kalus yang berwarna kecokelatan disebabkan oleh kondisi eksplan yang diduga secara internal mempunyai kandungan fenol tinggi, penyebab lainnya adalah penambahan zpt auksin sehingga dapat menyebabkan kalus berwarna lebih gelap atau cokelat. Hasil penelitian Setiawati *et al.* (2019) menjelaskan bahwa warna kalus yang berubah menjadi cokelat menunjukkan kondisi kalus yang memasuki fase stasioner (penuaan), selain itu karena kandungan fenol yang ada dalam kalus. Selanjutnya Dar *et al.* (2021) menjelaskan bahwa kalus yang berwarna hijau, kuning, cokelat hingga kecokelatan dapat mengandung senyawa seperti tannin, sehingga baik untuk menghasilkan metabolit sekunder.

Tekstur kalus yang diperoleh berdasarkan pengamatan secara visual menunjukkan hasil kalus yang bertekstur kompak dan bertekstur remah (Tabel 2). Kalus yang memiliki tekstur remah dihasilkan dari perlakuan pemberian 1,5 ppm, 2 ppm dan 2,5 ppm 2,4-D yang dikombinasikan dengan berbagai konsentrasi kinetin. Perbedaan tekstur tersebut diduga karena adanya perbedaan konsentrasi zpt yang diberikan pada media. Pemberian konsentrasi 2,4-D yang lebih tinggi memungkinkan terbentuknya kalus remah yang semakin besar. Hasil yang sama diperoleh dari penelitian Khalida *et al.* (2019) yang menyatakan bahwa kalus bertekstur remah yang dihasilkan pada kultur anggrek lilin (*Aerides odorata*

Lour.) dengan penambahan konsentrasi 2,4-D yang semakin tinggi. Auksin 2,4-D yang diberikan dalam konsentrasi tinggi, dapat merangsang pembelahan sel yang tidak terkendali dan mengarah pada pembentukan sejumlah besar sel yang belum matang dan tidak memiliki fungsi yang spesifik. Sel-sel kalus tidak mengalami diferensiasi normal, sehingga kalus yang terbentuk menjadi lebih remah atau tidak terstruktur. Kalus bertekstur kompak karena pertumbuhan sel dalam kalus terjadi dengan lebih teratur dan terkendali. sel-sel cenderung mengalami diferensiasi lebih lanjut menjadi jaringan yang lebih mirip dengan jaringan tanaman normal seperti terbentuknya akar, tunas dan lainnya. Kalus yang memiliki tekstur kompak diduga karena adanya kemampuan yang berbeda pada jaringan tanaman dalam menyerap unsur hara dan zpt yang diberikan dalam media. Selain itu pada kalus kompak terjadi proses lignifikasi yaitu terbentuknya lignin pada dinding sel. Menurut Anniasari *et al.* (2016) bahwa kalus yang keras, kompak dan padat terbentuk saat sel kalus yang tumbuh mengalami lignifikasi.

Selain warna, tekstur, bobot basah, dan bobot kering pada kalus, respon lain yang muncul adalah adanya pertumbuhan akar pada beberapa perlakuan yakni D₂K₁; D₁K_{1,5}; D_{2,5}K_{1,5}; dan D_{0,5}K_{2,5} ppm. Pertumbuhan akar tersebut mulai terlihat pada subkultur kedua. Sel-sel kalus cenderung mengalami diferensiasi lebih lanjut menjadi jaringan yang lebih mirip dengan jaringan tanaman normal seperti terbentuknya akar, tunas dan lainnya. Hal ini diduga auksin eksogen dan auksin endogen sudah tepat dan sesuai sehingga pada perlakuan tersebut eksplan merespon dengan pembentukan akar adventif pada kalus. Bhojwani & Razdan (1996) menjelaskan bahwa eksplan yang tumbuh dan berdiferensiasi serta beregenerasi membentuk organ sangat ditentukan oleh perbandingan auksin dan sitokinin di dalam jaringan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Setiawati *et al.* (2019) yang menyatakan bahwa apabila auksin yang ditambah sudah tepat dan sesuai maka akan memacu pembentukan akar adventif pada kalus.

Bobot Basah dan Bobot Kering Kalus

Berdasarkan analisis statistik faktor tunggal 2,4-D (F_{5,72}) = 1,65, p = 0,157; ANOVA), faktor tunggal kinetin (F_{5,72}) = 2,29, p = 0,054; ANOVA) dan faktor interaksi antara 2,4-D dan kinetin (F_{25,72}) = 0,74, p = 0,793; ANOVA) tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap rerata bobot basah kalus (Tabel 3).

Tabel 3. Rerata bobot basah kalus pada kultur daun *B. angulata* umur 84 hst dengan penambahan 2,4-D dan kinetin

2,4-D (ppm)	Rerata Bobot Basah Kalus (g)						Rerata
	Kinetin (ppm)						
	0	0,5	1	1,5	2	2,5	
0	0,400±0,10	0,433±0,15	0,400±0,17	0,433±0,06	0,467±0,06	0,500±0,26	0,439
0,5	0,267±0,06	0,600±0,26	0,367±0,11	0,267±0,06	0,400±0,20	0,367±0,06	0,378
1	0,267±0,06	0,667±0,23	0,333±0,15	0,400±0,17	0,433±0,15	0,300±0,10	0,400
1,5	0,367±0,15	0,433±0,15	0,400±0,20	0,333±0,23	0,300±0,17	0,400±0,17	0,372
2	0,567±0,06	0,500±0,26	0,367±0,06	0,300±0,10	0,400±0,00	0,300±0,00	0,406
2,5	0,367±0,21	0,433±0,25	0,467±0,21	0,533±0,21	0,433±0,15	0,467±0,15	0,450
Rerata	0,372	0,511	0,389	0,378	0,406	0,389	

Berdasarkan analisis statistik faktor tunggal 2,4-D ($F_{5,72} = 1,65$, $p = 0,157$; ANOVA), faktor tunggal kinetin ($F_{5,72} = 2,29$, $p = 0,054$; ANOVA) dan faktor interaksi antara 2,4-D dan kinetin ($F_{25,72} = 0,74$, $p = 0,793$; ANOVA) tidak menunjukkan pengaruh nyata terhadap rerata bobot kering kalus (Tabel 4).

Tabel 4. Rerata bobot kering kalus pada kultur s daun *B. angulata* 84 hst dengan penambahan 2,4-D dan kinetin

Rerata Bobot Kering Kalus (g)							
2,4-D (ppm)	Kinetin (ppm)						Rerata
	0	0,5	1	1,5	2	2,5	
0	0,023±0,00	0,013±0,01	0,020±0,01	0,010±0,00	0,017±0,01	0,023±0,01	0,018
0,5	0,010±0,01	0,040±0,04	0,013±0,01	0,017±0,01	0,033±0,03	0,010±0,00	0,021
1	0,013±0,01	0,040±0,01	0,017±0,01	0,033±0,03	0,020±0,02	0,023±0,02	0,024
1,5	0,013±0,01	0,030±0,01	0,023±0,01	0,010±0,00	0,010±0,01	0,011±0,01	0,016
2	0,030±0,01	0,037±0,03	0,013±0,01	0,020±0,01	0,037±0,04	0,013±0,01	0,025
2,5	0,014±0,01	0,040±0,03	0,027±0,02	0,043±0,03	0,043±0,04	0,020±0,02	0,031
Rerata	0,017	0,033	0,019	0,022	0,027	0,017	

Pengamatan bobot basah dan bobot kering kalus dilakukan di akhir pengamatan pada hari ke-84 hst. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan 2,4-D dan kinetin yang diberikan tidak berpengaruh terhadap bobot basah dan bobot kering kalus. Hasil ini menunjukkan bahwa perlakuan 2,4-D dan kinetin baik secara tunggal ataupun kombinasi mampu menyebabkan perubahan rasio auksin dan sitokinin endogen jaringan menjadi berimbang. Perimbangan rasio auksin sitokinin endogen jaringan akan menyebabkan pembesaran sel kalus. Pembesaran sel disebabkan oleh peningkatan permeabilitas sel terhadap air akibat 2,4-D yang diberikan sehingga air dan nutrisi akan berdifusi masuk ke dalam sel dan menyebabkan pertambahan berat basah kalus. Penambahan kinetin berperan dalam pembelahan sel. Ulva *et al.* (2019) menjelaskan bahwa terjadinya pertambahan bobot basah kalus disebabkan karena bertambahnya jumlah sel dan masuknya air dari media ke dalam sel yang mengakibatkan pembesaran sel. Air dapat masuk ke dalam karena terjadinya peningkatan permeabilitas sel terhadap air diiringi menurunnya tekanan dinding sel yang dipengaruhi oleh auksin sehingga terjadi kenaikan volume sel. Pertumbuhan sel kalus terjadi karena meningkatkan pembelahan sel akibat pengaruh sitokinin.

Pertumbuhan kalus didasarkan pada bobot kering kalus. Hasil analisis Anova yang dilakukan (Tabel 4) diketahui bahwa pemberian zpt 2,4-D dan kinetin tidak berpengaruh nyata terhadap bobot kering kalus, namun menghasilkan rerata bobot kering yang berbeda pada setiap perlakuan. Secara fisiologis bobot basah kalus terdiri atas kandungan air dan karbohidrat. Karbohidrat digunakan dalam sintesis protein untuk produksi metabolit sekunder. Air yang ada pada kalus ketika di keringkan menguap, hilang dan mengurangi ukuran kalus, sehingga perlakuan kombinasi yang diberikan tidak berpengaruh nyata terhadap bobot kering kalus. Sanchez & Demain (2011) menjelaskan bahwa sebagian nutrisi di dalam media seperti sumber karbon, nitrogen dan energi digunakan oleh sel untuk membentuk senyawa

metabolit sekunder yang tidak berfungsi secara langsung terhadap pertumbuhan, namun berperan dalam mekanisme pertahanan terhadap cekaman lingkungan.

KESIMPULAN

Pemberian 2,4-D dan kinetin menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap waktu muncul kalus, dan tidak berpengaruh nyata terhadap bobot basah dan bobot kering kalus daun belimbing merah. Kalus yang dihasilkan bertekstur kompak dan remah dengan warna kalus putih, kecokelatan dan coklat. Respon lain yang muncul yaitu terbentuknya akar pada perlakuan D₁ K_{1,5}; D_{0,5} K_{2,5}; D_{2,5}K_{1,5} dan D₂ K₁ ppm.

Untuk perbanyak kalus daun belimbing merah dapat digunakan konsentrasi zpt 2,5 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm kinetin; 1,5 ppm 2,4-D dan 2,5 ppm kinetin. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jenis fitokimia yang terkandung dalam kalus daun belimbing merah. .

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada tim penelitian DIPA FMIPA Untan dengan nomor kontrak 2894/UN22.8/PT.00/2022 yang telah memayungi penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

- Anniasari TD, Putri RBA., & Muliawati ES. (2016). Penggunaan BA dan NAA untuk merangsang pembentukan tunas lengkung dataran rendah (*Dimocarpus longan*) secara in vitro. *Bioteknologi* 13 (2): 43-53. , DOI: 10.13057/biotek/c130201
- Ariati, SN., Muslimin, W., & Suwastika, I.N. (2012). Induksi kalus kakao (*Theobroma cacao* L.) pada media MS dengan penambahan 2,4-D, BAP dan air kelapa. *Jurnal natural science*. 1(1): 74-78.
- Arieswari NNN., Astarini IA., Astiti NPA., & Pramana J. (2018). In Vitro Callus Induction Of 'Shiraz' Grape (*Vitis vinifera* L.) Using Different Medium And Growth Regulator Combination. *International Journal Of Bioscience And Biotechnology*, 6(1): 25-33.
- Asra, R., Ririn, A.S., & Mariana, S. (2020). *Hormon Tumbuhan*. Jakarta. UKI Press
- Astuti RD., Harahap F., & Edi S. (2020). Callus Induction of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) In Vitro with Addition of Growth Regulators.. *The International Conference on Sciences and Technology Applications*. doi:10.1088/1742-6596/1485/1/012029
- Bhojwani SS., & Dantu PK. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer. India.
- Bhojwani SS., & Razdan MK. (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition*. Elsevier. Netherlands.
- Dar SA., Nawchoo IA., Tyub S., & Kamili AN. (2021). Effect of plant growth regulators on in vitro induction and maintenance of callus from leaf and root explants of *Atropa acuminata* Royal ex Lindl. *Biotechnology Reports*, 32: 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00688>
- Dwiyani, R. (2015). *Kultur Jaringan Tanaman*. Bali. Percetakan dan Penerbit Pelawa Sari

- Faramayuda F., Irwan M., & Syam AK. (2022). The Growth of *Pimpinella alpina* Host Callus at Various Treatments of Plant Growth Regulator Concentrations of NAA, 2,4-D and Its Combination with BAP. *AGRIC.Jurnal Ilmu Pertanian*, 34(2): 171-182.
- Gultom MS., Anna N., & Siregar EBM. (2012). Respon Eksplan Biji Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) terhadap Pemberian IAA secara In Vitro. *Peronema Forestry Science Journal*. <https://www.neliti.com/id/publications/156144/>
- Gunawan, Chikmawati T., Sobir, & Sulistiyorini. (2018). Distribution, Morphological Variation and New Variety Of *Baccaurea Angulata* Merr. (Phyllanthaceae). *Floribunda*. 6(1): 1-11. <https://doi.org/10.32556/floribunda.v6i1.2018.226>
- Hazali N., Mohd Ali MA., Ibrahim M., & Masri M. (2015). Determination of Phytochemical and Vitamin Content of Underutilized *Baccaurea angulata* Fruit. *Journal Pharmacognosy And Phytochemistry* 4(4): 192-196. <https://www.phytojournal.com/archives/2015/vol4issue4/PartC/4-3-81.1.pdf>
- Hemmati N., Cheniany M., & Ganjeali A. (2020). Affect of Plant Regulators and Explants on Callus Induction and Study of Antioxidant Potentials and Phenolic Metabolites in *Salvia tebesana* Bunge. *Botanica SERBICA*, 44(2): 163-173.
- Ibrahim D., Hazali N., Jauhari N., Nor Omar M., Yahya MNA, Ahmed IA., Mikail MA., & Ibrahim M. (2013). Physicochemical and Antioxidant Characteristic of *Baccaurea angulata* Fruit Juice Extract. *African journal of Biotechnology*. 12(34): 5333-5338
- Indah PN., & 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. https://ejournal.its.ac.id/index.php/sains_seni/article/view/2571
- Karimian R., Lahouti M., & Davarpanah SJ. (2014). Effects of Different Concentrations of 2, 4-D and Kinetin on Callogenesis of *Taxus Brevifolia* Nutt. *Journal of Applied Biotechnology Report*, 1(4): 167-170. https://www.biotechrep.ir/article_69158_81453a8132c66e99d0e8c6d6f96dd8cc.pdf
- Khalida, A., Suwirman dan Z. A. Noli. (2019). Induksi kalus anggrek lilin (*Aerides odorata* Lour.) dengan pemberian beberapa konsentrasi 2,4-D. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. 7(2): 109- 117.
- Koelling C. (2017) *New Frontiers in Plant In Vitro Culture*. Academic Pages. New York. USA.
- Lestari, E.G. (2011). Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyakan Tanaman Melalui Kultur Jaringan. *Jurnal Agro Biogen* 7(1): 63-68
- Martinez ME., Jorquera L., Poirrier P., Díaz K., & Chamy R. (2021). Effect of the Carbon Source and Plant Growth Regulators (PGRs) in the Induction and Maintenance of an In Vitro Callus Culture of *Taraxacum officinale* (L) Weber Ex F.H. Wigg. *Agronomy*, 11(1181): 1-17. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061181>
- Mikail, M.A., Ahmed, I.A., Ibrahim, M., Hazali, N., Rasad, RMSA., Ghani RA., Hashim, R., Wahab RA., Arief SJ., Md Isa, M.L., Draman, S., & Yahy MNA. (2015). *Baccaurea Angulata* Fruit Inhibits Lipid Peroxidation And Induces The Increase In Antioxidant Enzyme Activities. *European Journal of Nutrition*. DOI.10.1007/S00394-015-0961-7
- Momand, L., Zakaria, R., Ibrahim, M., Mikail, M., Jalal, T., & Wahab, R.A. (2014). Antimicrobial Effect of *Baccaurea angulata* Fruit Extracts Against Human Pathogenic Microorganisms. *Medical and Aromatic Plants*. 3(4): 1-5. DOI: 10.4172/2167-0412.1000172
- Musthofa A. (2018). Pengaruh Kombinasi 2,4-D (2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid) Dan Kinetin Terhadap Induksi Kalus Nilam Aceh Varietas Sidikalang (*Pogostemon Cablin* Benth.). [Skripsi]. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.

- Novitasari, Y., & Isnaini, Y. (2021). Propagation Of Pitcher Plants (*Nepenthes gracilis* KORTH. and *Nepenthes reinwardtiana* MIQ.) Through Callus Induction. *Agric, Jurnal Ilmu Pertanian*, 33(2), 81–92. <https://doi.org/10.24246/agric.2021.v33.i2.p81-92>.
- Rahayu, B., Solichatun, & Anggarwulan, E. (2003). Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) Terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi*. 1(1): 1-6. <https://core.ac.uk/download/pdf/12345765.pdf>
- Rasud Y., & Bustaman. (2020). Induksi Kalus secara In Vitro dari Daun Cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.) dalam Media dengan Berbagai Konsentrasi Auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*. 25(1): 67-72. <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>
- Sanchez, S., & Demain, A.L. (2011). Secondary Metabolites. *Comprehensive Biotechnology Journal*. pp. 131–143. doi: 10.1016/B978-0-444-64046-8.00012-4
- Setiawati, T., Alma, A., & Anandira, W. (2019). Induksi Kalus Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) dengan Penambahan Berbagai Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh. *Jurnal EduMatSains*, 3(2): 119-132. <https://doi.org/10.33541/edumatsains.v3i2.884>
- Sudarmono. (2018). Belimbing Darah (*Bacaurea angulata* Merr.), Buah Keluarga Menteng Endemik Kalimantan dan Kerabatnya. *Warta Kebun Raya* 16(1): 55-62.
- Trigiano RN., & Gray DJ. (2005). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. Washington D.C.
- Ulva M., Nurchayati Y., Prihastanti E., & Setiari N. (2019). Pertumbuhan Kalus Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Varietas Permata F1 dari Jenis Eksplan dan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda secara In Vitro. *Life Science* 8 (2): 160-169. <https://doi.org/10.15294/lifesci.v8i2.37103>