

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

1.1 Pengaruh Pembentukan Kalus Pada Media MS Kombinasi ZPT BAP dan 2,4-D.

Selama masa inkubasi, kalus mulai terlihat tumbuh pada minggu ke-5.

Data hari tumbuhnya kalus seluruh kombinasi BAP dan 2,4-D tersaji pada tabel 4.1 di bawah ini.

4.1 Pengaruh konsentrasi BAP dan 2,4-D pada pembentukan kalus (hari).

Perlakuan	BAP	0	1	1,5	0	1	1,5	0	1	1,5	0	1	1,5
(mg/L)	2,4-D	0	0	0	1	1	1	2	2	2	4	4	4
Hari ke		36	-	-	36	34	33	32	29	42	35	48	44

Keterangan: (-) : belum muncul kalus

Tabel di atas menunjukkan bahwa dari seluruh perlakuan kombinasi terdapat sepuluh perlakuan kombinasi telah berhasil menumbuhkan kalus dimasa inkubasi. Pertumbuhan kalus ini diawali dengan membengkaknya eksplan dan diikuti dengan munculnya kalus yang nampak keputihan.

Kalus mulai tumbuh pada kombinasi 1mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D yang mana kalus tumbuh pada hari ke-29 setelah tanam. Kombinasi ini merupakan kombinasi yang mampu menumbuhkan kalus paling cepat. Hal ini dapat disebabkan keseimbangan kerja dari BAP sebagai hormon sitokinin dan 2,4-D sebagai hormon auksin sebagai hormon pertumbuhan terpenuhi.

Pembentukan kalus *Acacia mangium* paling lambat pada kombinasi 1mg/l BAP + 4mg/l 2,4-D. Pada kombinasi ini kalus baru tumbuh pada hari ke-48

setelah tanam. Penyebab lambatnya pertumbuhan kalus dapat diakibatkan keseimbangan kerja hormon BAP dan 2,4-D terganggu.

Sedangkan untuk konsentrasi 1mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D belum dapat membentuk kalus dalam waktu 56 hari (8 minggu) inkubasi. Hal ini dapat disebabkan komposisi kombinasi BAP dan 2,4-D tidak seimbang, karena hormon pertumbuhan yang bekerja pada suatu tanaman tidak hanya berasal dari lingkungan (hormon eksogen) saja namun juga berasal dari dalam tubuh tanaman itu sendiri (hormon endogen).

Hasil tersebut juga tersirat dalam AL-Qur'an. Salah satunya adalah surat Al-Mulk / 67 : 3:

هَلْ أَلْبَصَرَ فَأَرَجِعَ تَفَنُّوتٍ مِنَ الرَّحْمَنِ خَلْقٍ تَرَى مَا طَبَقًا سَمَوَاتٍ سَبْعَ خَلْقٍ الَّذِي فُطُورٍ مِنْ تَرَى

Artinya: *yang telah menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. Kamu sekali-kali tidak melihat pada ciptaan Tuhan yang Maha Pemurah sesuatu yang tidak seimbang. Maka lihatlah berulang-ulang, Adakah kamu Lihat sesuatu yang tidak seimbang?* (QS. Al-Mulk/ 67 : 3)

Ayat di atas menjelaskan kepada kita bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatunya dengan seimbang, tak terkecuali dengan fungsi dari masing-masing ZPT atau hormon pertumbuhan pada tanaman. Sama halnya dengan ZPT yang digunakan pada penelitian ini, BAP dan 2,4-D. Menurut Suhartati dan Nursyamsi (2007) BAP adalah hormon yang berfungsi sebagai hormon pemicu pembelahan sel, sehingga digolongkan sebagai jenis hormon sitokinin. Sedangkan menurut Salisbury dan Cleon (1995) 2,4-D adalah hormon yang berfungsi mirip IAA sebagai hormon pemicu pemanjangan sel, sehingga digolongkan sebagai

jenis hormon auksin. Dilihat dari fungsinya tersebut kita juga harus menggunakan dengan seimbang, dengan konsentrasi yang seimbang dapat menumbuhkan kalus secara optimal.

Perimbangan konsentrasi hormon pertumbuhan juga dijelaskan oleh Karjadi dan Buchory (2007), ada 2 golongan ZPT penting, yaitu sitokinin dan auksin. Zat pengatur tumbuh ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan, dan atau kultur organ. Perimbangan konsentrasi dan interaksi antar ZPT yang diberikan dalam media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen akan menentukan arah perkembangan suatu kultur.



Gambar 4.1: Waktu munculnya kalus tiap-tiap perlakuan pada waktu inkubasi selama 56 hari (B1: 0mg/l BAP, B2: 1mg/l BAP, B3: 1,5mg/l BAP, D1: 0mg/l 2,4-D, D2: 1mg/l 2,4-D, D3: 2mg/l 2,4-D, D4: 4mg/l 2,4-D).

Diagram menunjukkan lambat dan cepat hari munculnya kalus, dimana tumbuhnya kalus dipengaruhi oleh kerja hormon endogen dan eksogen. Pada perlakuan kontrol (0mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D) diketahui kerja hormon sitokinin dan auksin endogen dapat menumbuhkan kalus. Hal ini menunjukkan bahwa sudah

terdapat keseimbangan hormon endogen antara sitokinin dan auksin. Kalus mampu tumbuh pada hari ke-36.

Hal lain terlihat belum tumbuhnya kalus pada media yang mengandung sitokinin tinggi dibanding media yang mengandung auksin. Seperti yang terjadi pada perlakuan 1mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D dan 1,5mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D. Belum tumbuhnya kalus tersebut dapat terjadi karena tingginya kadar sitokinin endogen dan eksogen yang tidak diseimbangi oleh kerja hormon auksin dengan proses pemanjangan.

Asumsi di atas, bahwa terdapat hormon sitokinin endogen di dalam eksplan diperkuat pada perlakuan 0mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D. Pada perlakuan tersebut masih dapat menumbuhkan kalus pada hari ke-36 walau tanpa penambahan sitokinin eksogen yaitu BAP. Pada perlakuan ini kerja hormon sitokinin endogen yang telah ada di dalam eksplan diseimbangkan dengan ditambahkan hormon auksin eksogen, sehingga mampu menumbuhkan kalus.

Hal tersebut juga diperkuat Kurnianingsih (2009), bahwa perlakuan tanpa BAP eksplan yang ditanam menghasilkan auksin endogen dengan konsentrasi yang cukup tinggi sehingga menyebabkan terjadinya proses pemanjangan sel, sedangkan pada perlakuan dengan BAP, aktifitas dari auksin endogen terhambat karena adanya sitokinin eksogen (dalam hal ini BAP).

Percepatan hari munculnya kalus meningkat pada perlakuan 1mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D; 1,5mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D; 0mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D dan 1mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D, yaitu pada hari-hari di minggu ke-5. Hasil ini menunjukkan kecenderungan keseimbangan konsentrasi hormon sitokinin dan auksin endogen

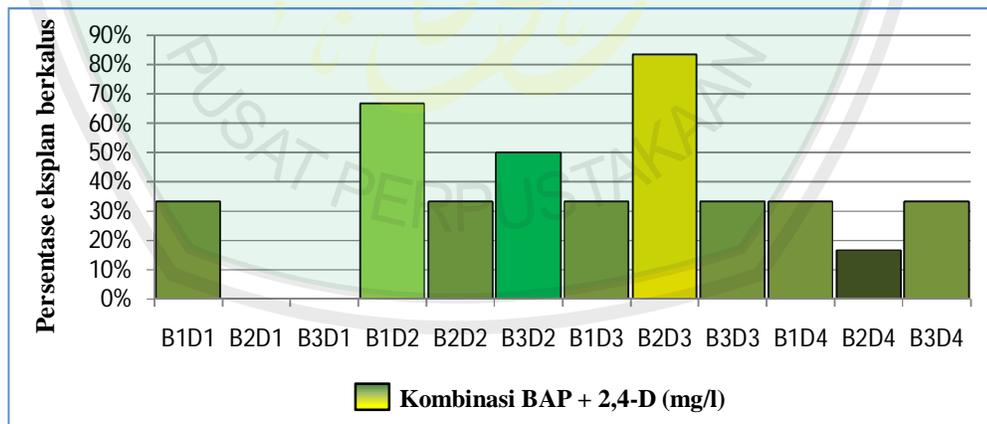
dengan menambahkan BAP dan 2,4-D. Ketika keseimbangan antara sitokinin dan auksin terjadi, maka pembelahan sel oleh kerja sitokinin dan pemanjangan sel oleh kerja auksin akan maksimal. Wareing dan Phillips (1970) dalam Karjadi dan Buchory (2007), juga mengemukakan bahwa sitokinin merangsang pembelahan sel tanaman dan berinteraksi dengan auksin dalam menentukan arah diferensiasi sel.

Keseimbangan hormon sitokinin dan auksin terganggu dalam menghasilkan kalus dengan cepat atau mengalami perlambatan, terlihat pada perlakuan dengan penambahan 2mg/l 2,4-D ditambah BAP sebesar 1,5mg/l. Perlambatan ini terus meningkat dengan penambahan 2,4-D sebesar 4mg/l, baik itu dengan kombinasi BAP 0mg/l, 1mg/l ataupun 1,5mg/l. Tingginya konsentrasi auksin ini dapat menghambat kerja pemanjangan sel itu sendiri, karena auksin yang tinggi memicu meningkatnya konsentrasi etilen.

Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Ayabe dan Sumi (1998) dalam Karjadi dan Buchory (2007), semakin tinggi konsentrasi auksin, konsentrasi etilen yang dihasilkan akan semakin tinggi, hal ini akan menyebabkan terhambatnya aktivitas auksin dalam perpanjangan sel, tetapi akan meningkatkan pelebaran sel.

Pembentukan kalus tersebut sudah dapat dikatakan optimal. Hal tersebut dikarenakan tidak terdapat kontaminasi baik itu kontaminasi bakteri ataupun jamur pada seluruh perlakuan dan ulangan. Apabila terdapat kontaminasi pertumbuhan kalus dapat terhambat. Hal tersebut akibat kontaminan juga menggunakan nutrisi dalam media untuk pertumbuhannya, dengan kata lain terjadi kompetisi antara eksplan *Acacia mangium* dengan kontaminan.

Konsentrasi BAP dan 2,4-D yang bervariasi pada media MS di tiap perlakuan tidak hanya mempengaruhi kecepatan munculnya kalus, namun juga mempengaruhi persentase tumbuhnya kalus. Hal ini dapat dilihat dari persentase kalus pada tiap perlakuan yang diuji. Kombinasi 1mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D menghasilkan persentase eksplan berkalus tertinggi, yaitu 83,3%. Selanjutnya kombinasi 0mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D menghasilkan persentase eksplan berkalus sebesar 66,6% dan untuk perlakuan 1,5mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D persentasenya sebesar 50%. Kemudian perlakuan lainnya menghasilkan persentase sebesar 33,3%, diantaranya perlakuan 0mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D; 1mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D; 0mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D; 1,5mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D; 0mg/l BAP + 4mg/l 2,4-D dan 1,5mg/l BAP + 4mg/l 2,4-D. Selain itu untuk perlakuan 1mg/l BAP + 4mg/l 2,4-D persentase eksplan berkalus sebesar 16,6% dan 0% pada perlakuan 1mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D serta 1,5mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D.



Gambar 4.2: Diagram persentase eksplan berkalus setiap perlakuan kombinasi BAP + 2,4-D (B1: 0mg/l BAP, B2: 1mg/l BAP, B3: 1,5mg/l BAP, D1: 0mg/l 2,4-D, D2: 1mg/l 2,4-D, D3: 2mg/l 2,4-D, D4: 4mg/l 2,4-D).

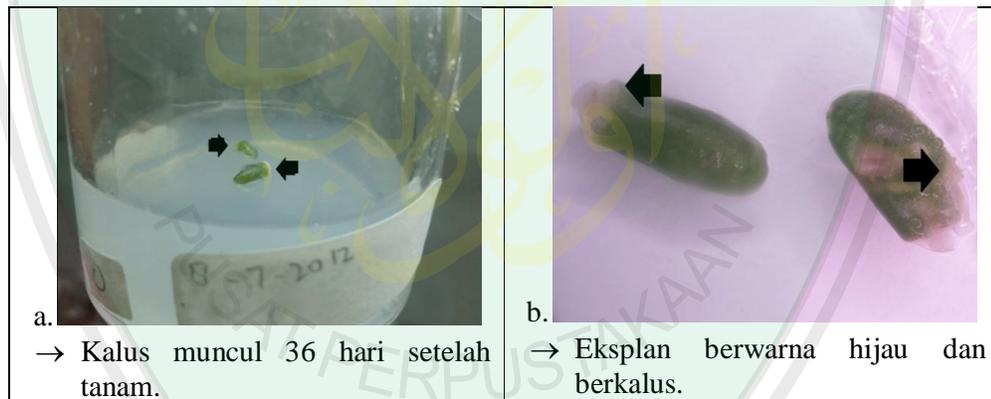
Diagram di atas menunjukkan media dengan penambahan BAP tanpa diimbangi dengan penambahan 2,4-D, mengakibatkan seluruh eksplan belum tumbuh kalus. Hal tersebut dapat dilihat pada kombinasi 1 mg/l BAP + 0 mg/l 2,4-D dan 1,5 mg/l BAP + 0 mg/l 2,4-D. Sedangkan media yang hanya ditambahkan 2,4-D 1 mg/l; 2 mg/l atau 4 mg/l tanpa penambahan BAP masih mampu menumbuhkan kalus, misalkan kombinasi 0 mg/l BAP + 1 mg/l 2,4-D.

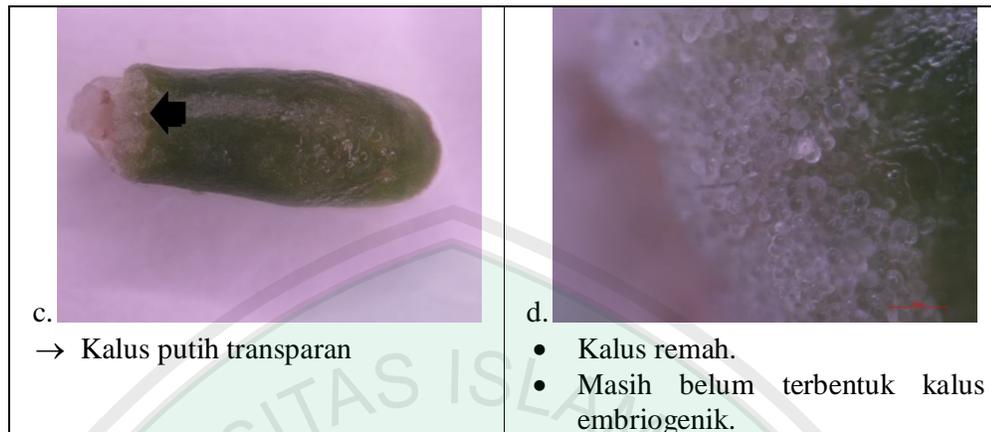
Penurunan persentase eksplan berkalus, terlihat ketika media ditambahkan 2,4-D sebesar 4 mg/l. Pada media tersebut tidak hanya mengalami perlambatan pertumbuhan yang terlihat pada gambar 4.1 sebelumnya, tetapi juga terjadi penurunan persentase eksplan berkalus. Persentase eksplan berkalus dengan penambahan 4 mg/l 2,4-D berkisar 16,6% dan 33,3%, persentase ini lebih rendah dibanding dengan media dengan penambahan 1 mg/l atau 2 mg/l 2,4-D yang memiliki persentase eksplan berkalus berkisar 33,3% sampai 83,3%.

Penurunan persentase eksplan berkalus atau bahkan menghasilkan pertumbuhan kalus 0% dikarenakan oleh kerja hormon endogen dan eksogen tidak seimbang. Konsentrasi auksin yang tinggi atau konsentrasi sitokinin yang tinggi dapat menghambat pemanjangan sel itu sendiri. Di mana pembentukan kalus tidak hanya melalui tahap perbanyakan atau pembelahan saja, namun pemanjangan yang merupakan proses pendewasaan atau diferensiasi juga harus dilalui. Yuwono (2008), juga menyatakan bahwa kultur kalus terbentuk melalui tiga tahapan, yaitu induksi, pembelahan sel dan diferensiasi.

4.2 Morfologi Kalus (Warna dan Tekstur Kalus) dan Terbentuknya Kalus Embriogenik Pada Media MS kombinasi ZPT BAP dan 2,4-D.

Pembentukan kalus yang terjadi pada eksplan kotiledon *Acacia mangium* memiliki morfologi beragam, di mana kalus sudah ada yang terbentuk pada hari-hari ke-29. Pengamatan munculnya kalus pada eksplan dilakukan menggunakan kaca pembesar yang dilakukan tiap hari. Sedangkan untuk pengamatan morfologi kalus dan munculnya kalus embriogenik dilakukan menggunakan mikroskop makroskop pada pengamatan terakhir (hari ke-56). Untuk menunjukkan dan menjelaskan morfologi kalus dan terbentuknya kalus embriogenik *Acacia mangium* dengan penambahan BAP dan 2,4-D disajikan pada gambar 4.3 hingga gambar 4.14.

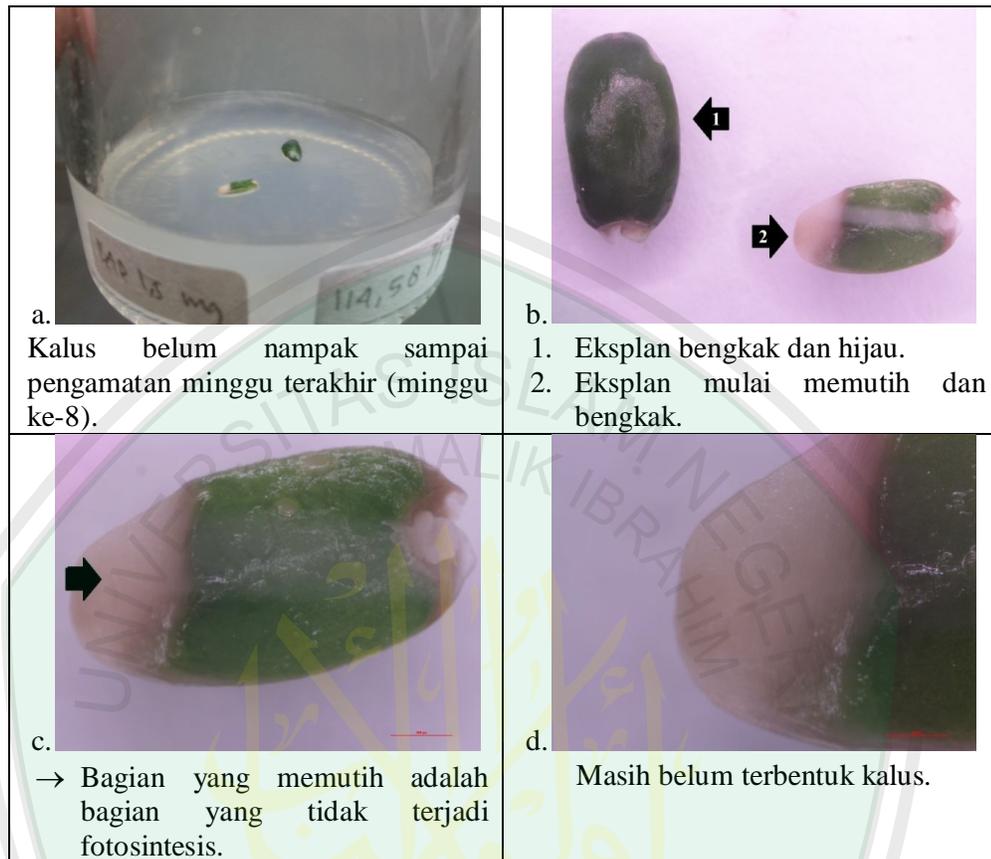




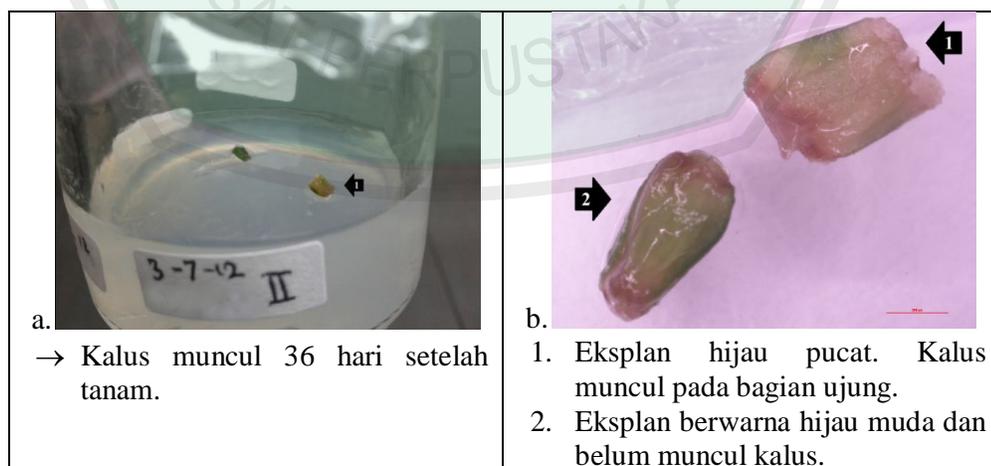
Gambar 4.3: Kombinasi 0mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik.



Gambar 4.4: Kombinasi 1mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik.



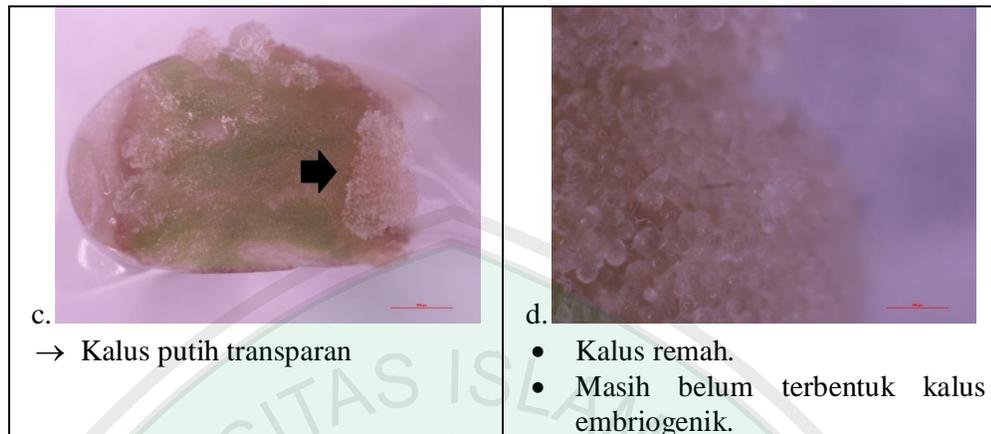
Gambar 4.5: Kombinasi 1,5mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik..



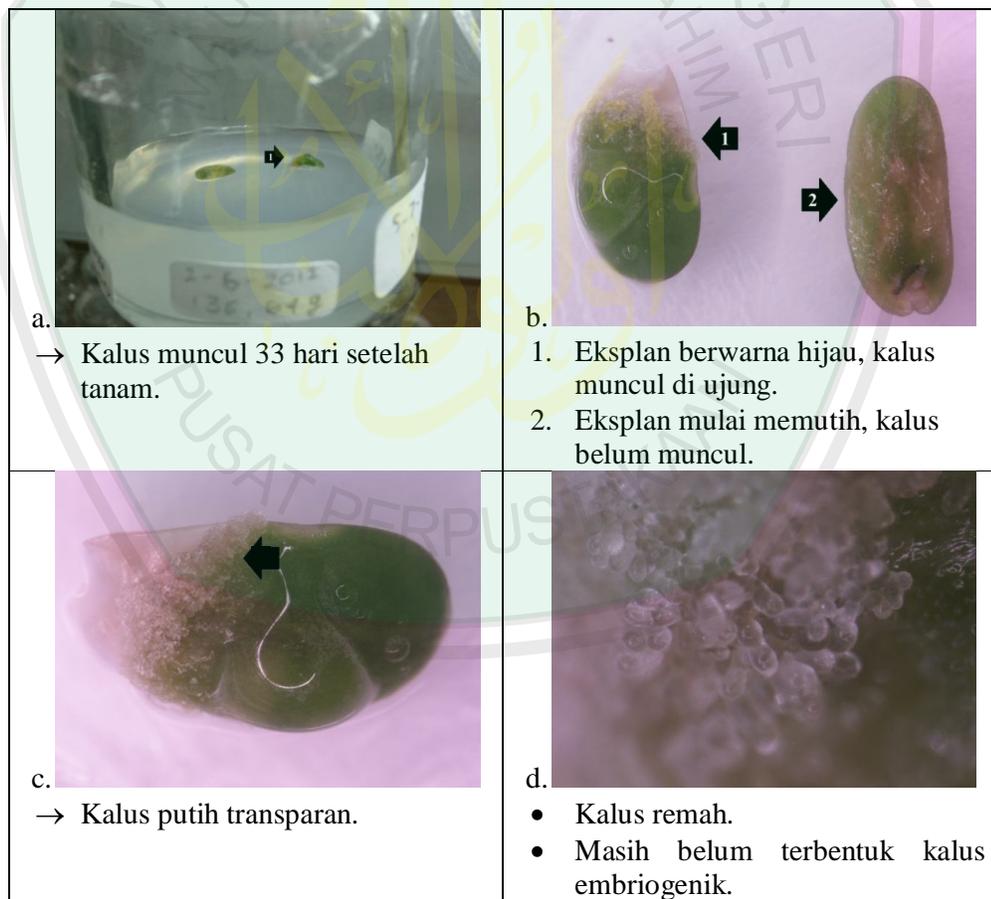


Gambar 4.6: Kombinasi 0mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik.

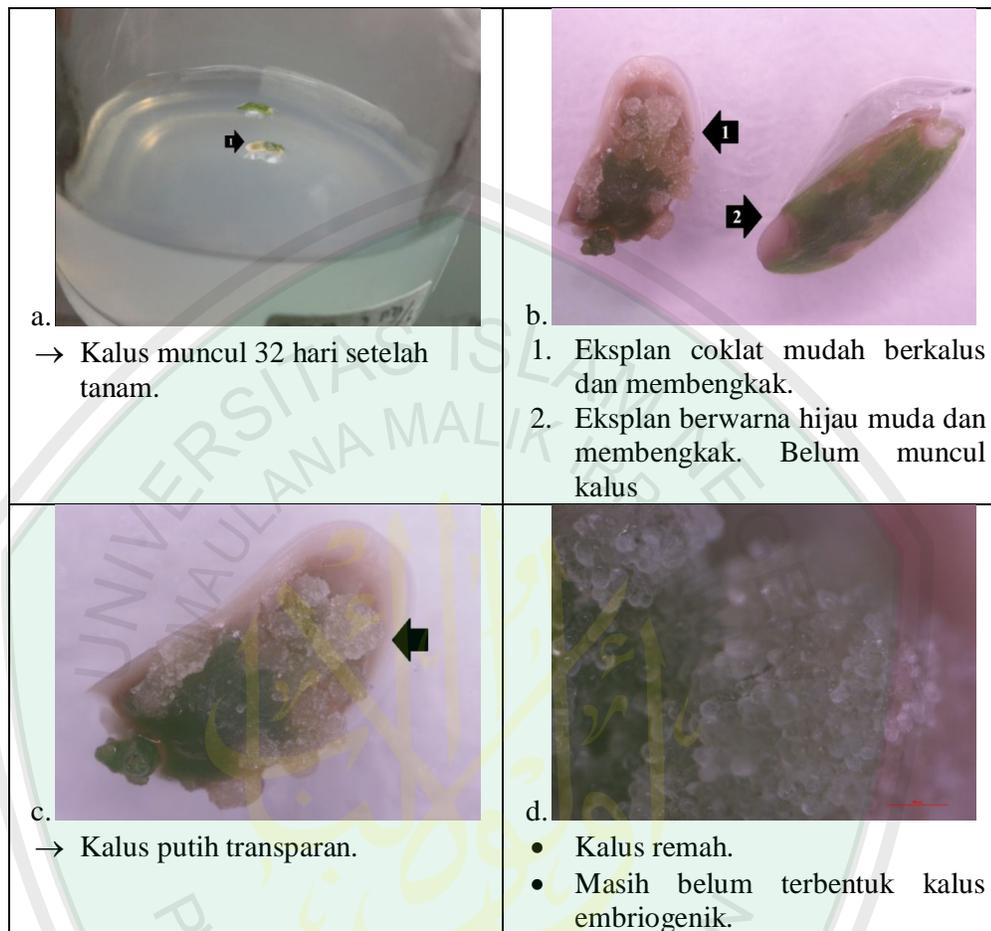




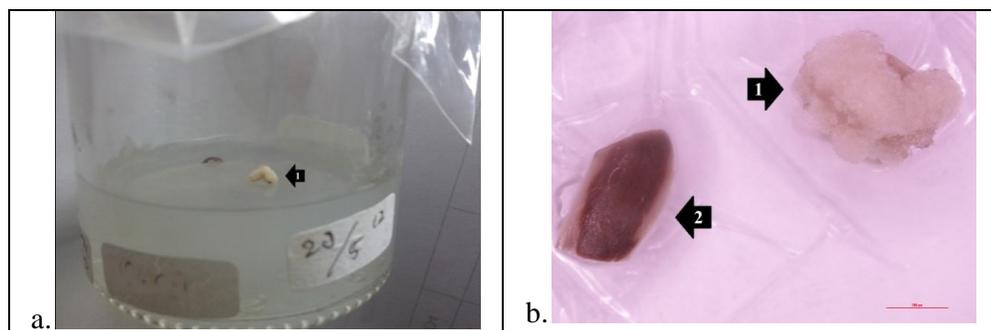
Gambar 4.7: Kombinasi 1mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik..

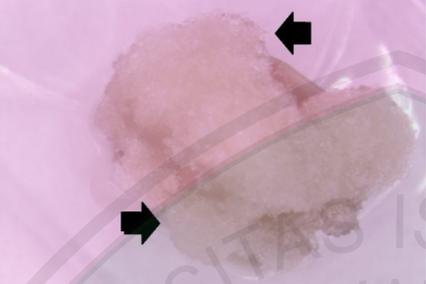


Gambar 4.8: Kombinasi 1,5mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik.

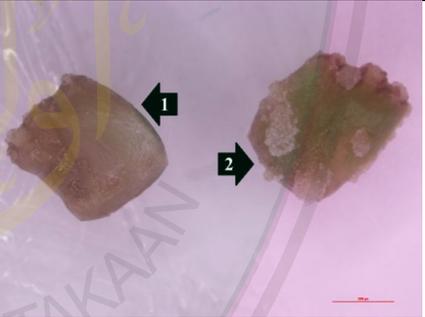
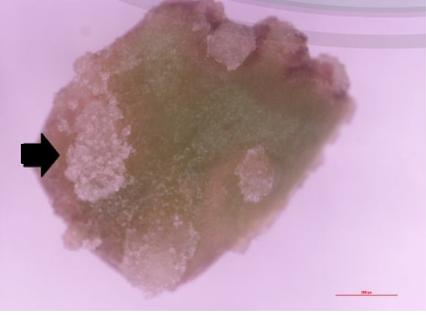
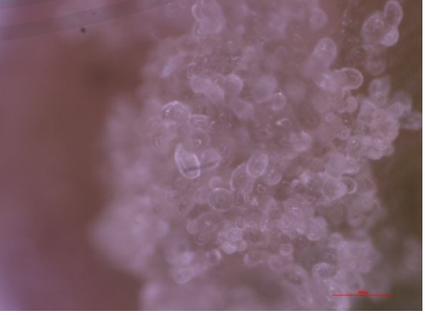


Gambar 4.9: Kombinasi 0mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik..

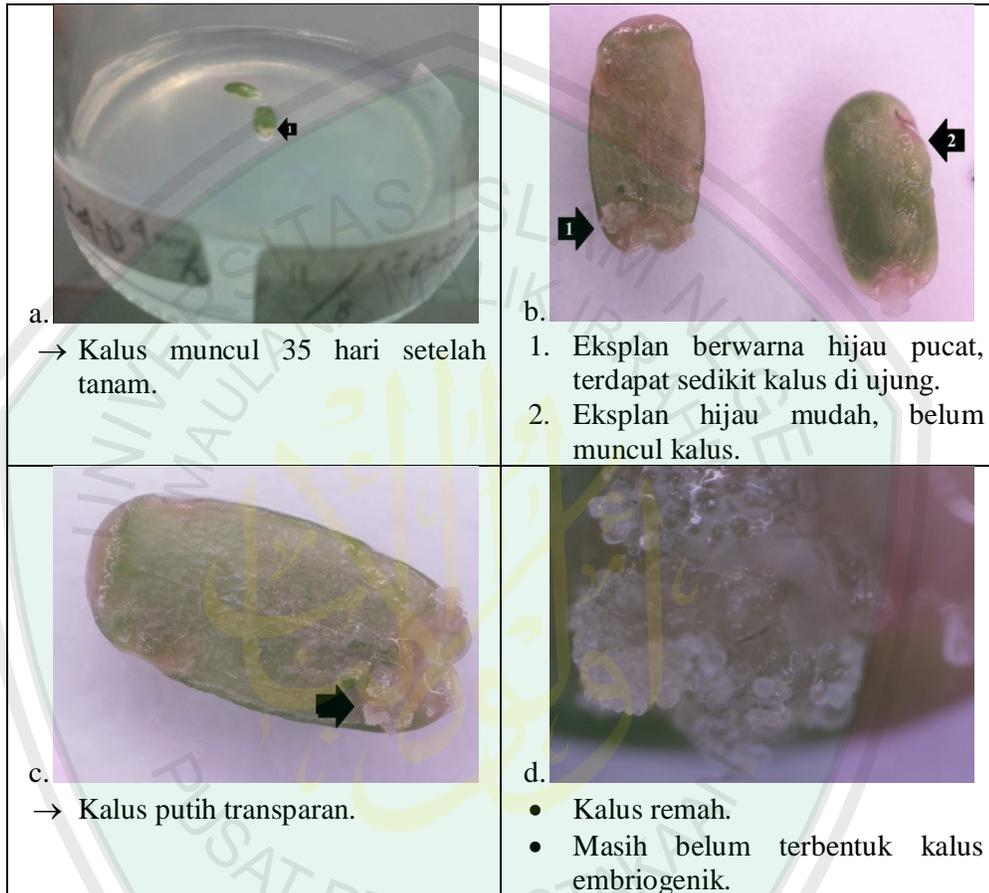


<p>→ Kalus muncul 29 hari setelah tanam.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Eksplan tertutup kalus dan membengkak. 2. Eksplan berwarna coklat tua dan mati.
<p>c.</p> <p>→ Kalus putih transparan.</p> 	<p>d.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kalus remah. • Masih belum terbentuk kalus embriogenik. 

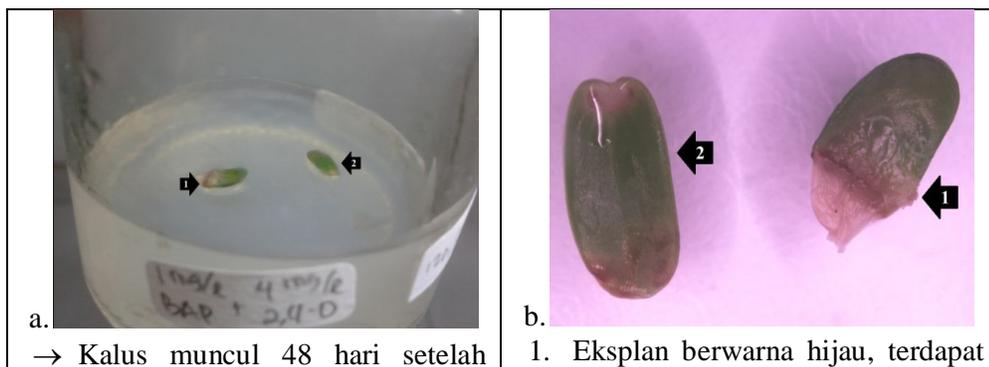
Gambar 4.10: Kombinasi 1mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik.

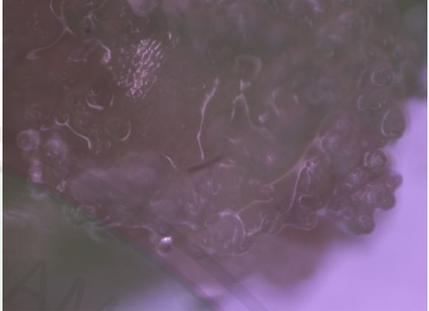
<p>a.</p> <p>→ Kalus muncul 42 hari setelah tanam.</p> 	<p>b.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Eksplan berwarna coklat muda, terdapat kalus kompak. 2. Eksplan kehijauan dan berkalus. 
<p>c.</p> <p>→ Kalus putih transparan.</p> 	<p>d.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kalus remah. • Masih belum terbentuk kalus embriogenik. 

Gambar 4.11: Kombinasi 1,5mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik.

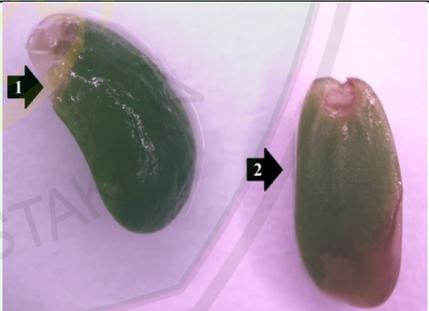


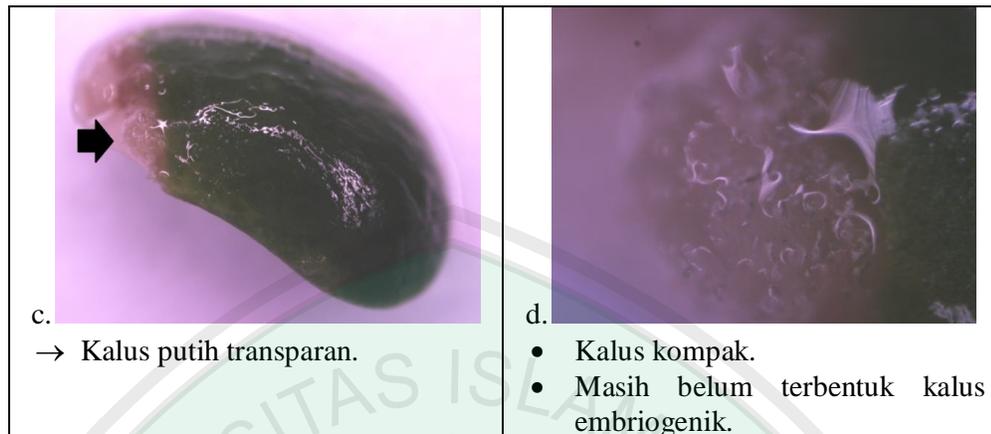
Gambar 4.12: Kombinasi 0mg/l BAP + 4mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik.



tanam.	sedikit kalus di ujung. 2. Eksplan berwarna hijau, belum muncul kalus.
 <p>c. → Kalus putih transparan.</p>	 <p>d.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kalus kompak. • Masih belum terbentuk kalus embriogenik.

Gambar 4.13: Kombinasi 1mg/l BAP + 4mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik.

 <p>a. → Kalus muncul 44 hari setelah tanam.</p>	 <p>b.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Eksplan berwarna hijau, terdapat sedikit kalus di ujung. 2. Eksplan berwarna hijau dan belum muncul kalus.
---	---



Gambar 4.14: Kombinasi 1,5mg/l BAP + 4mg/l 2,4-D (a) pengamatan pembentukan kalus, (b) pengamatan eksplan berkalus, (c) pengamatan warna kalus dan (d) pengamatan struktur dan kalus embriogenik.

Gambar 4.3 sampai 4.14 di atas menunjukkan morfologi kalus pada tiap perlakuan, terdapat kalus yang remah dan kalus kompak dengan warna putih transparan ataupun kecoklatan. Pada hasil pengambilan gambar juga diketahui bahwa belum terbentuk kalus embriogenik di seluruh perlakuan dengan waktu inkubasi selama 56 hari (8 minggu).

Menurut Fitriani (2008) dalam Andaryani (2010) Secara visual, kalus remah (*friable*) yang terbentuk pada eksplan *J. curcas* ikatan antar selnya tampak renggang, mudah dipisahkan dan jika diambil dengan pinset, kalus mudah pecah dan ada yang menempel pada pinset. Kalus yang kompak (*non friable*) mempunyai tekstur yang sulit untuk dipisahkan dan terlihat padat.

Struktur kalus remah salah satunya dapat dilihat pada gambar 4.3, terlihat bahwa sel-sel kalus tersebut saling terpisah atau renggang. Sedangkan kalus dengan struktur kompak salah satunya dapat dilihat pada gambar 4.14. Gambar 4.14 memperlihatkan ciri kalus kompak yang ikatan antar selnya menyatu dan cenderung berair.

Warna kalus yang dihasilkan dapat dijadikan sebagai indikator kondisi kalus. Menurut Andaryani (2010), warna terang atau putih kalus dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik. Sedangkan warna kalus yang semakin gelap (menjadi cokelat) berarti pertumbuhan kalus semakin menurun.

Kalus dengan warna putih transparan salah satunya terdapat pada gambar 4.7. Sedangkan kalus dengan warna kecoklatan salah satunya terdapat pada gambar 4.11 pada gambar eksplan yang ditunjuk anak panah no. 1. Kalus yang berwarna kecoklatan (*browning*) ini menurut Andaryani (2010) dapat disebabkan kemunduran fisiologi kalus, penuaan atau bertambahnya umur sel dan dapat juga disebabkan metabolis senyawa fenol yang diakibatkan proses sterilisasi.

Secara keseluruhan morfologi kalus *Acacia mangium* pada perlakuan kombinasi ZPT BAP dan 2,4-D tersaji pada tabel di bawah ini:

4.3 Pengaruh konsentrasi ZPT BAP dan 2,4-D pada pembentukan morfologi kalus *Acacia mangium*.

No	Kombinasi Perlakuan	Tekstur Kalus		Warna Kalus		Jumlah kalus yang tumbuh
		R	K	P	C	
1	0mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D	2	-	2	-	2
2	1mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D	-	-	-	-	-
3	1,5mg/l BAP + 0mg/l 2,4-D	-	-	-	-	-
4	0mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D	2	2	4	-	4
5	1mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D	1	1	2	-	2
6	1,5mg/l BAP + 1mg/l 2,4-D	2	1	2	1	3
7	0mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D	1	1	2	-	2
8	1mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D	5	-	5	-	5
9	1,5mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D	1	1	1	1	2
10	0mg/l BAP + 4mg/l 2,4-D	1	1	1	1	2
11	1mg/l BAP + 4mg/l 2,4-D	-	1	1	-	1
12	1,5mg/l BAP + 4mg/l 2,4-D	-	2	2	-	2

Keterangan : R: Kalus remah, K: Kalus kompak
P: Kalus putih transparan, C: Kalus kecoklatan

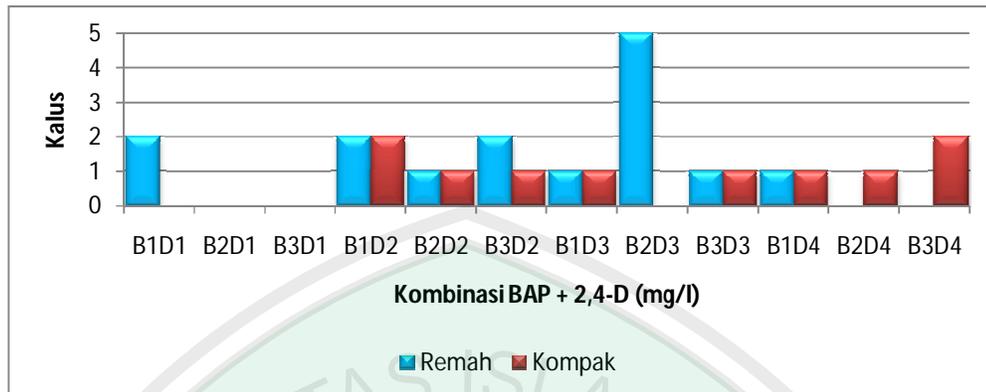
Tabel di atas terlihat bahwa terdapat keberagaman morfologi kalus yang dihasilkan pada satu perlakuan kombinasi ZPT BAP dan 2,4-D, salah satunya terdapat pada perlakuan ZPT 1,5mg/l BAP dan 1mg/l 2,4-D. Pada perlakuan tersebut terdapat struktur kalus remah pada 2 eksplan dan kalus kompak pada 1 eksplan, selain itu juga terdapat kalus yang berwarna putih transparan pada 2 eksplan dan kecoklatan pada 1 eksplan. Hal ini dapat terjadi karena sifat genetik setiap eksplan berbeda-beda. Perbedaan ini disebabkan eksplan yang digunakan

setiap ulangan pada setiap perlakuan tidak berasal dari satu individu yang sama, yang mana eksplan berasal dari kotiledon tanaman.

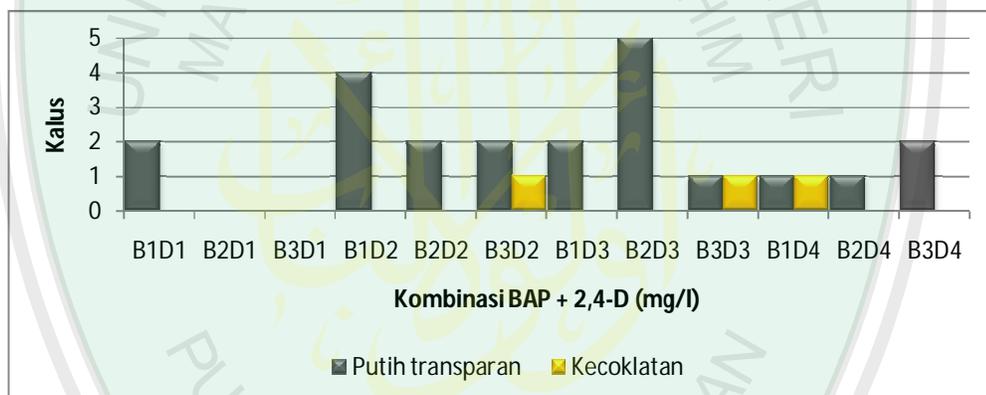
Keberagaman sifat pada tiap eksplan dapat diperkecil kemungkinannya dengan mengontrol ZPT pada media, dengan kombinasi ZPT yang tepat maka dapat mengoptimalkan sifat baik pada eksplan untuk menumbuhkan kalus. Contoh ini dapat dilihat pada perlakuan kombinasi ZPT 1mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D. Perlakuan ini seluruhnya mampu menghasilkan tekstur kalus remah dan putih transparan dengan persentase tertinggi yaitu 83,3%, walau dimungkinkan terdapat sifat yang beragam pada setiap eksplan.

Stern (1930) dalam Suryo (2010) juga berpendapat bahwa genotip (sifat dasar yang tak tampak dan tetap) dan lingkungan dapat menetapkan fenotip (sifat yang dapat dilihat, misal warna, bentuk dan ukuran) atau dapat dikatakan bahwa fenotip adalah resultante dari genotip dan lingkungan.

Ukuran eksplan juga dapat menjadi faktor keberagaman hasil yang diperoleh pada satu perlakuan. Ukuran eksplan yang kecil mengakibatkan tingginya tingkat kerusakan eksplan saat penanganan kultur, yang juga menyebabkan keberagaman kualitas eksplan saat ditanam. Zulkarnain (2009) menegaskan bahwa ukuran eksplan yang kecil maka laju kehidupannya akan rendah, kemungkinan kerusakan eksplan saat penanganan kultur juga semakin besar, namun tingkat kontaminasi eksplan kecil lebih rendah.



Gambar 4.15: Diagram struktur kalus pada seluruh eksplan berkalus pada kombinasi BAP + 2,4-D (B1: 0mg/l BAP, B2: 1mg/l BAP, B3: 1,5mg/l BAP, D1: 0mg/l 2,4-D, D2: 1mg/l 2,4-D, D3: 2mg/l 2,4-D, D4: 4mg/l 2,4-D).



Gambar 4.16: Diagram warna kalus pada seluruh eksplan berkalus pada kombinasi BAP + 2,4-D (B1: 0mg/l BAP, B2: 1mg/l BAP, B3: 1,5mg/l BAP, D1: 0mg/l 2,4-D, D2: 1mg/l 2,4-D, D3: 2mg/l 2,4-D, D4: 4mg/l 2,4-D).

Gambar 4.15 memperlihatkan bahwa struktur kalus yang terbentuk dari seluruh perlakuan lebih banyak berstruktur remah. Jumlah kalus remah dari seluruh perlakuan berjumlah 15 eksplan, sedangkan kalus kompak berjumlah 10 eksplan dari seluruh perlakuan. Sedangkan pada gambar 4.16 memperlihatkan bahwa warna kalus yang terbentuk dari seluruh perlakuan lebih banyak berwarna putih transparan. Jumlah kalus berwarna putih transparan dari seluruh perlakuan

berjumlah 22 eksplan dan jumlah kalus berwarna kecoklatan dari seluruh perlakuan berjumlah 3 eksplan.

Gambar struktur kalus di atas juga memperlihatkan bahwa morfologi kalus dengan komposisi hormon yang seimbang pada gambar 4.1 dan 4.2 cenderung memiliki struktur kalus remah, bahkan pada kombinasi 1mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D memiliki struktur kalus remah tertinggi. Kecenderungan ini dinilai lebih baik dibandingkan apabila terbentuk kalus kompak. Kalus remah mencirikan bahwa kalus tersebut lebih aktif membelah dari pada kalus kompak, disamping itu untuk membentuk kalus embriogenik membutuhkan kalus remah yang tinggi. Pernyataan tersebut sesuai dengan jumlah eksplan yang ditumbuhi kalus, juga akan lebih tinggi. Hal ini terlihat pada kombinasi dengan penambahan 1mg/l atau 2mg/l 2,4-D yang dibandingkan dengan media dengan penambahan 4mg/l 2,4-D. Media dengan penambahan 4mg/l 2,4-D sedikit memiliki kalus remah bahkan tidak dapat membentuk kalus remah, sehingga jumlah eksplan yang ditumbuhi kalus lebih rendah. Menurut Sitinjak *et al* (2006), perbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan melalui embriogenesis somatik dapat berhasil apabila diperoleh persentase kalus remah (kalus embriogenik) yang cukup tinggi dari eksplan yang dikulturkan ke dalam medium tertentu.

Warna kalus juga memiliki peranan dalam mengindikasikan pertumbuhan yang maksimal. Kombinasi media dengan penambahan 1mg/l atau 2mg/l juga memiliki kecenderungan memiliki kalus yang berwarna putih. Kalus berwarna putih ini merupakan kalus muda yang masih aktif membelah. Apabila kalus berwarna hijau berarti kalus memiliki pigmen warna hijau yang sudah mulai

melakukan fotosintesis dan kurang aktif membelah. Sedangkan apabila kalus berwarna coklat berarti kalus mulai tidak aktif atau akan mati.

Harjoko (1999) dalam Rahayu *et al* (2003) menambahkan bahwa dengan berlanjutnya pertumbuhan kalus maka akan diikuti dengan perubahan warna kalus. Kalus muda berwarna putih, kemudian warnanya akan berubah menjadi hijau dengan bertambahnya umur. Perbedaan warna kalus ini disebabkan adanya perubahan pigmentasi.

Penelitian ini masih belum mampu membentuk sampai kalus embriogenik, bahkan pada kombinasi 1mg/l BAP + 2mg/l 2,4-D yang merupakan kombinasi yang terbaik pada penelitian ini. Pada kombinasi ini dapat mencapai keberhasilan pertumbuhan kalus tinggi, yaitu 83,3% dan percepatan pertumbuhannya dapat terjadi pada hari ke-29. Disamping itu kalus yang dihasilkan 100% berstruktur remah dan berwarna putih.

Komposisi zat pengatur tumbuh BAP adalah golongan hormon sitokinin yang baik dalam memacu pembelahan sel atau sitokinesis. Sedangkan 2,4-D merupakan golongan auksin sintesis yang stabil atau tahan terhadap suhu tinggi dan pemicu pemanjangan sel. Sehingga setelah dilihat dari hasil dan fungsi dari ZPT yang digunakan, media dengan kombinasi ini baik untuk digunakan dalam memacu pertumbuhan kalus sampai kalus embriogenik.

Tahap pembentukan struktur globulardan hati sering digunakan zat pengatur tumbuh sitokinin seperti benzyladenin (BA) atau yang mempunyai peran fisiologis yang sama yaitu thidiazuron (Husni *et al*, 1997) dalam (Sukmadjaja,

2005) atau 2,4-D, dan NAA apabila embrio somatik melalui fase kalus (Hutami *et al.*, 2002) dalam (Sukmadjaja, 2005).

Kedua yang dilihat adalah asal eksplan. Eksplan yang digunakan adalah kotiledon dari perkecambahan biji *Acacia mangium* selama 4 hari. Dilihat dari usia tanaman dan organ yang digunakan, termasuk organ yang bersifat muda dan masih aktif tumbuh atau sel-selnya masih aktif membelah. Disamping itu eksplan kotiledon cocok digunakan sebagai eksplan untuk membentuk sampai kalus embriogenik. Pendapat ini didukung oleh Sukmadjaja (2005), bahwa sebagai eksplan umumnya digunakan jaringan atau organ yang bersifat embriogenik seperti embrio zigotik, kotiledon, mata tunas, dan hipokotil atau epikotil.

Kemungkinan yang menyebabkan belum sampai terbentuknya kalus embriogenik adalah waktu inkubasi yang kurang panjang. Hal ini mungkin saja terjadi karena melihat dari tumbuhnya kalus. Kalus tumbuh baru pada minggu ke-5. Pada penelitian Utami *et al* (2007), tentang Pengaruh α -Naphthaleneacetic Acid (NAA) terhadap embriogenesis somatik anggrek bulan *Phalaenopsis Amabilis* (L.) BI kalus terbentuk antara 1 minggu setelah dikultur dan kalus embriogenik terbentuk antara 4 minggu setelahnya. Penelitian tersebut dapat diambil kesimpulan bahwa kalus embriogenik tanaman anggrek bulan *Phalaenopsis Amabilis* (L.) baru tumbuh pada 3 minggu setelah kalus muncul, jadi untuk *Acacia mangium* dimungkinkan membutuhkan lebih dari 8 minggu waktu inkubasi.