

PENGARUH HORMON 2.4-D (2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID) TERHADAP KULTUR KALUS DAUN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum* L)

Welsiliana^{1*}, Meri Helsiana Mata²

¹Program Studi Biologi, Fakultas Pertanian, Sains dan Kesehatan, Universitas Timor

²Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Sains dan Kesehatan, Universitas Timor

*Email korespondensi: welsiliana@unimor.ac.id

DOI: [10.32938/jsb/vol5i1pp39-44](https://doi.org/10.32938/jsb/vol5i1pp39-44)

Submit: 22 Mei 2024 | Diterima: 26 Juli 2024 | Diterbitkan: 30 Juli 2024

ABSTRAK

Budidaya tanaman melalui teknik kultur jaringan selalu mengalami perkembangan dalam menghasilkan bibit unggul. Keberhasilan kultur jaringan sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang meliputi media dan penggunaan zat pengatur tumbuh. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh zat pengatur tumbuh (hormon) dalam menginisiasi kalus pada tanaman tembakau. Metode penelitian diawali dengan pembuatan larutan stok dan pembuatan media Murashige dan Skoog (MS) serta dilanjutkan dengan kultur eksplan daun tembakau. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian hormon 2.4-D (2 ppm) pada eksplan daun tembakau dapat merangsang terbentuknya kalus hingga menghasilkan diameter 0.6 cm di minggu ke-4.

Kata kunci: hormon 2.4-D, kalus, tembakau

ABSTRACT

Cultivation of plants using tissue culture techniques is always progressing in producing superior seeds. The success of tissue culture is greatly influenced by environmental factors which include media and the use of growth regulators. This research aims to examine the effect of growth regulators (hormones) in initiating callus on tobacco plants. The research method begins with making a stock solution and making Murashige and Skoog (MS) media and continues with culturing tobacco leaf explants. The results showed that administering the hormone 2.4-D (2 ppm) to tobacco leaf explants could stimulate callus formation to produce a diameter of 0.6 cm in the 4th week.

Keywords: 2.4-D hormone, callus, tobacco

A. LATAR BELAKANG

Kultur jaringan merupakan salah satu teknik perbanyakan tanaman secara vegetatif. Salah satu keuntungan dari kultur jaringan yaitu dapat menghasilkan tanaman secara massal. Proses perbanyakan kultur jaringan dapat dilakukan melalui dua cara yaitu organogenesis dan embriogenesis somatik (Lestari, 2011). Pada proses kedua cara diatas dapat terjadi secara langsung yaitu membentuk organ dan embrio sedangkan proses yang tidak langsung akan terbentuk kalus.

Kalus adalah kumpulan sel-sel yang aktif membelah (tidak terorganisir). Kalus dapat diperoleh dengan memberikan pelukaan pada eksplan atau dengan

menggunakan hormon auksin dan sitokinin pada konsentrasi seimbang (Purwaningrum, 2013). Induksi terbentuknya kalus merupakan langkah yang penting karena setelah terbentuk kalus akan dilanjutkan pemberian rangsangan yang mempercepat diferensiasi akar atau tunas. Produksi kalus yang mempunyai struktur embriogenik dan mampu diregenerasikan merupakan faktor penting dalam kultur jaringan, khususnya dalam transformasi, induksi keragaman somaklonal dan seleksi in vitro (Meneses *et al.*, 2005).

Eksplan yang digunakan untuk pembentukan kalus dapat diambil dari berbagai sumber, misalnya eksplan yang digunakan pada penelitian ini adalah

daun tembakau yang merupakan hasil regenerasi kultur jaringan yang telah disubkulturkan (*plantlet*). Penggunaan tanaman tembakau sebagai sumber eksplan tidak lepas dari pemanfaatannya sebagai tanaman model dibidang molekuler (Edwards *et al.*, 2017). Keberhasilan dalam pembentukan kalus ini, tentu saja sangat dipengaruhi oleh media yang digunakan. Media yang digunakan umumnya mengandung nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Komponen utama media terdiri atas unsur esensial ion mineral/hara makro (N, P, K, Mg, Ca dan S), hara mikro (Fe, Mn, Cl, Zn, B, Cu dan Mo), sumber karbon, vitamin dan konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) (Shinde *et al.*, 2021). Zat pengatur tumbuh umumnya berperan penting pada pembentukan kalus. Penelitian ini digunakan salah satu golongan hormon auksin sintetik yaitu 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*). Hesami & Daneshvar (2018) juga menyatakan bahwa penggunaan zat pengatur tumbuh 2,4-D berperan sebagai induksi pembelahan sel dan pembentukan kalus. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh hormon 2,4-D terhadap pembentukan kalus tanaman tembakau.

B. METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah *plantlet* tembakau, media padat Murashige dan Skoog (MS + 2,4-D 2 dan 4 ppm), alkohol 70%, akuades steril dan kertas label. Alat yang digunakan adalah cawan petri, botol kultur, pinset, alat pemotong (*scapel*), bunsen dan *Laminar air flow cabinet* (LAFC).

Pembuatan Larutan Baku

Pembuatan larutan baku diawali dengan persiapan unsur-unsur hara (makro dan mikro), vitamin dan zat pengatur tumbuh. Garam anorganik (unsur hara makro) yang digunakan dibuat dengan konsentrasi 100x dalam media sedangkan unsur hara mikro dibuat

dengan 1000x konsentrasi dalam media. Begitupula dengan vitamin dibuat larutan bakunya pada konsentrasi 100-200x dalam media, zat pengatur tumbuh (auksin dan sitokinin sintetik) masing-masing dibuat larutan bakunya dengan konsentrasi 100-1000x dalam media. Untuk menjaga agar tidak terjadi perubahan yang ada dalam bahan larutan baku, maka larutan-larutan tersebut disimpan dalam kulkas (suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$).

Pembuatan Media Murashige dan Skoog (MS)

Pembuatan media MS berdasarkan (Murashige & Skoog, 1965): Larutan baku yang telah dibuat kemudian dicampurkan ke dalam gelas kimia kemudian ditambahkan gula sebanyak 30 gram. Ditambahkan akuades secukupnya sampai volume total mencapai 1 liter, lalu diaduk hingga gula menjadi larut. Larutan campuran dibagi menjadi dua bagian yaitu A dan B (masing-masing 500 mL tiap gelas kimia). Pada larutan A ditambahkan hormon auksin 2,4-D 2 ppm dan larutan B 2,4-D 4 ppm. Dilakukan pengukuran pH pada kedua larutan (pH 5.6-5.8) (Muharyati *et al.*, 2015). Tiap larutan A dan B ditambahkan agar 7 gram. Larutan diaduk sampai merata lalu dipanaskan hingga mendidih. Media kemudian dituang ke dalam botol kultur (kira-kira seperlima dari kapasitas tabung), lalu mulut botol ditutup rapat dengan plastik kemudian diikat dengan karet gelang. Media yang telah berada dalam botol kultur selanjutnya diautoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (Putri *et al.*, 2021). Setelah media diautoklaf selanjutnya didinginkan pada suhu ruang.

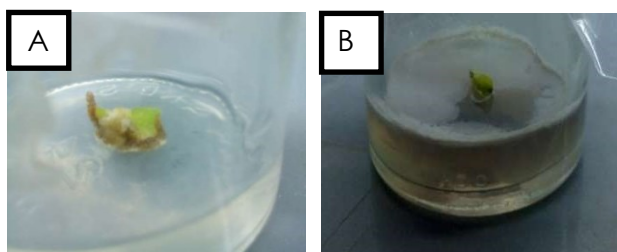
Kultur Tembakau

Kultur tanaman tembakau yang telah menjadi *plantlet*, diambil daunnya lalu diletakkan pada cawan petri. Daun

tersebut dipotong menjadi dua bagian di dalam cawan petri. Potongan daun pertama ditanam pada media MS + 2.4-D 2 ppm sedangkan potongan daun yang kedua ditanam ke dalam media MS + 2.4-D 4 ppm. Dilakukan pengamatan selama empat minggu untuk melihat pembentukan kalus, bagian-bagian kultur yang telah memiliki kalus dan diameter kalus.

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada kultur daun tembakau (Gambar 1) terlihat bahwa media A mengalami pertumbuhan kalus tetapi pertumbuhan kalus hingga minggu terakhir tidak menghasilkan perbedaan yang nyata karena kalus mengalami penambahan diameter sekitar 0,2 cm tiap minggunya. Selain itu, tidak dapat dilakukan perbandingan kalus yang ada pada media A dan media B dikarenakan media B mengalami kontaminasi. Adanya kontaminasi yang terjadi merupakan salah satu faktor penghambat dalam kultur jaringan. Sesuai dengan penampakan Gambar 1B menunjukkan kultur terkontaminasi oleh jamur dengan penampakan miselium berwarna putih diatas permukaan media. Wati *et al.*, (2020) juga menyatakan bahwa kontaminasi yang terjadi pada kultur jaringan umumnya didominasi oleh jamur dibandingkan dengan mikroba lainnya.



Gambar 1. Kultur daun tembakau pada minggu keempat, A. kultur daun tembakau pada media (MS + 2.4-D 2 ppm); B. kultur daun tembakau pada media (MS + 2.4-D 4 ppm).

Munculnya kalus terjadi diminggu ke-2, hal ini ditandai dengan gumpalan sel berwarna putih dan muncul di daerah yang terluka (irisasi eksplan). Kalus muncul

di bagian sayatan eksplan yang secara visual berwarna putih, kemudian berkembang menjadi bercak-bercak kecil dan agregat kalus (Erawati *et al.*, 2023). Pada perkembangan kalus diminggu ke-3 (Tabel 1) telah terbentuk nodul-nodul yang pada akhirnya akan membentuk kalus remah di minggu ke-4. Warna kalus yang terbentuk dari eksplan daun tembakau yaitu berwarna putih (Gambar 1A). Kalus yang berwarna putih terjadi karena jaringan parenkim mengandung butiran pati yang merupakan polisakarida simpanan tanaman (Desriatin, 2010). Ukuran diameter kalus yang diperoleh di minggu ke -1 yaitu 0.1 cm dan mengalami kenaikan 0.4 cm (minggu pengamatan ke-3) dan menjadi 0.6 cm di pengamatan minggu terakhir. Adanya penambahan ukuran ini menunjukkan hormon 2.4-D berpengaruh terhadap penambahan diameter kalus. Menurut Mahadi *et al.*, (2016) pembelahan sel yang optimal akan mempengaruhi pertumbuhan kalus yang optimal. Artinya sel-sel yang ada pada eksplan akan semakin cepat memanfaatkan hormon yang ada pada media sehingga menyebabkan terjadinya penambahan luas kalus (diameter).

Tabel 1. Petumbuhan kultur daun tembakau pada pengamatan minggu pertama hingga pengamatan minggu terakhir

| Minggu ke- | Diameter kalus (cm) | | Keterangan |
|------------|---------------------|-------------|--|
| | 2.4-D 2 ppm | 2.4-D 4 ppm | |
| 1 | 0 | - | Belum terbentuk kalus |
| 2 | 0.1 | - | Kalus terbentuk pada daerah yang terluka |
| 3 | 0.4 | - | Kalus mengumpal (berbentuk globular) dan terbentuk nodul-nodul |
| 4 | 0.6 | - | Terbentuk kalus remah |

Penampilan kalus secara visual menunjukkan bahwa formulasi media MS yang terbaik menghasilkan kalus yang remah (*friable*) dan terbentuk nodul-nodul. Hal ini terlihat pada pembentukan kalus daun tembakau pada minggu ke-3 membentuk globular dan di minggu ke-4 terbentuk kalus yang remah. Pembentukan struktur kalus akan berbeda-beda setiap jenis tanaman dan formulasi media yang digunakan. Struktur kalus yang terbentuk mengindikasikan kemampuan regenerasinya yang akan membentuk tunas dan akar. Oleh karenanya, media yang digunakan sangat menentukan regenerasi kalus. Purnamaningsih (2006) menyatakan bahwa media yang memiliki keseimbangan nutrisi sangat mempengaruhi pertumbuhan kalus maupun diferensiasinya dalam membentuk tunas.

Konsentrasi hormon yang digunakan pada media akan mempengaruhi terbentuknya kalus (Lang *et al.*, 2020). Penelitian ini sejalan dengan Restanto *et al.*, (2021) yang menggunakan hormon 2,4-D dengan konsentrasi 2 ppm dapat menginduksi dan menghasilkan kalus lebih cepat pada tanaman Sorgum.

Hormon 2.4-D merupakan golongan auksin sintetik yang memiliki pengaruh terhadap kadar auksin endogen dan mengubah level hormon endogen tanaman, sehingga menyebabkan terjadinya pertumbuhan (Wattimena, 2001). Peran lain dari 2.4-D yaitu menyebabkan pelonggaran dinding sel dengan melepaskan ikatan hidrogen yang ada pada dinding sel (Lestari *et al.*, 2013). Selanjutnya dinding sel akan mengalami pembentangan dan terjadi penyerapan air, akibatnya sel akan mengalami pembengkakan dan memicu sel tersebut untuk membelah sehingga akan terbentuk kalus (Sitorus, 2011). Mata (2021) juga menyatakan bahwa penggunaan hormon 2.4-D pada media mampu menginduksi sel dalam menghasilkan enzim pektinase yang akan mengdegradasi lamela tengah jaringan sehingga hasil akhir terbentuk massa sel yang terpisah antara satu sama lain (sel remah).

D. KESIMPULAN

Pemberian hormon 2.4-D dengan konsentrasi 2 ppm memberikan pengaruh terhadap pembentukan kalus tanaman tembakau dan menghasilkan kalus remah dengan diameter kalus 0.6 cm di minggu ke-4.

DAFTAR PUSTAKA

- Edwards, K.D., Fernandez-Pozo, N., Drake-Stowe, K., Humphry, M., Evans, A. D., Bombarely, A., Allen, F., Hurst, R., White, B., Kernodle, S.P., Bromley, J.R., Sanchez-Tamburrino, J.P., Lewis, R.S., & Mueller, L.A. 2017. A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BMC Genomics*, 18: 448. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3791-6>
- Erawati, D. N., Taufika, R., & Adiwinata, D.A. 2023. Pengaruh Pemberian Sitokinin Terhadap Kalus Tembakau Varietas Na-Oogst (*Nicotiana tabacum* L.) Melalui Kultur In Vitro. *AGROPROSS: National Conference Proceedings of Agriculture*, 288-295. <https://doi.org/10.25047/agropross.2023.40>
- Desriatin, N. L. 2010. Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh IAA dan Kinetin terhadap Morfogenesis pada Kultur In Vitro Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum* L. var. *Prancak-95*). Kultur Jaringan Tembakau. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh November.
- Hesami, M., & Daneshvar, M. H. 2018. In vitro adventitious shoot regeneration through direct and indirect organogenesis from seedling-derived hypocotyl segments of *Ficus religiosa* L.: an important medicinal plant. *HortScience*, 53(1): 55-61.

- <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12637-17>
- Lang, J., Pankowski, J., Grabarz, P., Pluciński, B., & Jedynek, P. 2020. Comparing the effects of different exogenous hormone combinations on seed-derived callus induction in *Nicotiana tabacum*. *Biochimica Polonica*, 67(4): 449-452. <https://doi.org/10.18388/abp.2020.5456>
- Lestari, E. G. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyakan Tanaman melalui Kultur Jaringan. *Jurnal Agro Biogen*, 7(1): 63-68. <https://doi.org/10.21082/JBIO.V7N1.2011.P63-68>
- Lestari, E., Nurhidayati, T., & dan Nurfadilah, S. 2013. Pengaruh Konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium laxiflorum* J.J Smith secara In Vitro. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 2 (1): 43-47. <https://doi.org/10.12962/J23373520.V2I1.2748>
- Mahadi, I., Syafi'i, W., & Sari, Y. 2016. Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) Menggunakan Hormon. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*, (21)2: 84-89. <https://doi.org/10.18343/jipi.21.2.84>
- Mata, M. H. 2021. Akumulasi α -Tokoferol pada Organ Tanaman dan Kultur Suspensi Sel *Jatropha gossypifolia* Linn dari Nusa Tenggara Timur. *Jurnal Saintek Lahan Kering*, 4(1): 12-15. <https://doi.org/10.32938/slk.v4i1.1411>
- Meneses, A., Flores, D., Munoz, M., Arrieta, G., & Espinosa, A. M. 2005. Effect of 2,4-D, Hydric stress and light on indica rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Rev Biol Trop (Int J)*. 53(3-4): 361-368. <https://doi.org/10.15517/RBT.V53I3-4.14598>
- Muharyati, Y., Defiani, M.R., & Astiti, N.P.A. 2015. Pertumbuhan Anggrek *Vanda helvola* Pada Media Yang Diperkaya Jus Tomat. *Jurnal Metamorfosa*, 2(2): 66-71. <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2015.v02.i02.p03>
- Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol*, 15:473-497.
- Purnamaningsih, R. 2006. Induksi Kalus dan Optimasi Regenerasi Empat Varietas Padi melalui Kultur In Vitro. *Jurnal AgroBiogen*. 2(2):74-80. <https://doi.org/10.21082/jbio.v2n2.2006.p74-80>
- Purwaningrum, Y. 2013. Kultur Kalus Sebagai Penghasil Metabolit Sekunder Berupa Pigmen. *AGRILAND*, 2 (2): 117-127.
- Putri, A.B.S., Hajrah., Armita, D., & Tambunan, I.R. 2021. Teknik kultur jaringan untuk perbanyakan dan konservasi tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) secara in vitro. *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, 1(2): 69-76. <https://doi.org/10.24252/filogeni.v1i2.23801>
- Restanto, D.P., Wiranegara, A., Dewanti, P., Kristanto, B., & Avivi, S. 2021. Pengaruh hormon 2,4-dichlorophenoxyacetic acid Terhadap Induksi Kalus Tanaman Sorgum (*Sorghum bicolor* (L.). *Agrotrop: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian (Journal of Agricultural Science)*, 19(1): 12-18. <https://doi.org/10.32528/AGRITROP.V19I1.5463>
- Shinde, S.S., Sanap, S. B., Patil, A. M., Shinde, N. A., Daspute, A. A., & Sarode, D. K. 2021. In vitro regeneration of *Nicotiana tabacum* L. from callus culture. *The Pharma Innovation Journal*, 10(12): 904-908. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22131.30248>
- Sitorus, E. N., Hastuti, E. D., & Setiari, N. 2011. Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) Secara In Vitro Pada Media Murashige & Skoog Dengan Konsentrasi Sukrosa Yang Berbeda. *Bioma*. 13 (1):

1410-8801.

<https://doi.org/10.14710/bioma.13.1.1-7>

Wati, T., Astarini. I. A., Pharmawati, M., & Hendriyani, E. 2020. Propagation Of Begonia Bimaensis Undaharta & Ardaka Using Tissue Culture Technique. *Journal of Biological Sciences*, 7(1): 112-122. <https://doi.org/10.24843/metamorf.o.sa.2020.v07.i01.p15>

Wattimena, G.A. 2001. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor.