

Induksi kalus *Chrysanthemum indicum* untuk meningkatkan keragaman genetik dari sel somatik

Callus Induction of *Chrysanthemum indicum* for increasing genetic diversity from somatic cell

REZA RAMDAN RIVAI[✉], HENDRA HELMANTO

Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jl. Ir. H. Juanda No. 13, Bogor 16003, Jawa Barat, Indonesia.
Tel./Fax. +62-251-8322187, ✉email: rezaramdanrivai@gmail.com.

Manuskrip diterima: 15 Desember 2014. Revisi disetujui: 10 Januari 2015.

Abstrak. Rivai RR, Helmanto H. 2015. Induksi kalus *Chrysanthemum indicum* untuk meningkatkan keragaman genetik dari sel somatik. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (1): 167-170*. *Chrysanthemum indicum* L. merupakan salah satu bunga potong yang sudah diproduksi massal di Indonesia. Variasi somaklonal yang terjadi pada kultur *in vitro* dapat dimanfaatkan sebagai salah satu alternatif pemuliaan tanaman karena dapat meningkatkan keragaman genetik dari suatu tanaman. Zat pengatur tumbuh merupakan salah satu faktor yang dapat menginduksi terbentuknya kalus. Kalus dapat dihasilkan dari potongan organ seperti daun, hipokotil, kotiledon, batang, embrio zigotik dan bagian tanaman lainnya yang ditumbuhkan dalam media yang mengandung auksin seperti 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh media dengan konsentrasi auksin (2,4-D) yang tepat dari dua asal eksplan yang berbeda dalam menginduksi kalus krisan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan yang berasal dari daun memiliki respon terbaik terhadap pembentukan kalus pada media *Murashige and Skoog* (MS) dengan penambahan 3 mg L⁻¹ 2,4-D. Berbeda halnya dengan eksplan yang berasal dari *internode* memiliki respon terbaik terhadap pembentukan kalus pada media MS dengan penambahan 1 mg L⁻¹ 2,4-D dan 2 mg L⁻¹ 2,4-D.

Kata kunci: Auksin, kalus, krisan, variasi somaklonal

Abstract. Rivai RR, Helmanto H. 2015. Callus Induction of *Chrysanthemum indicum* for increasing genetic diversity from somatic cell. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (1): 167-170*. *Chrysanthemum indicum* L. is cut flowers that have been mass-produced in Indonesia. Somaclonal variation of *in vitro* culture can be used as an alternative way for plant breeding. Plant growth regulator is a factor for callus induction. Callus can be produced from various explants such as leaf, hypocotyl, cotyledon, stem, zygotic embryo and other plant parts that are cultured in medium containing auxin compounds especially 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). The objective of this research was to obtain the best concentration of 2,4-D within *Murashige and Skoog* (MS) basal medium for callus induction of *Chrysanthemum indicum* L. from different types of explants. The results showed that MS medium combined with 3 mg L⁻¹ 2,4-D was the best treatment for inducing callus from the leaf. However, MS medium combined with 1 or 2 mg L⁻¹ 2,4-D were the best treatments for inducing callus from internode.

Keywords: Auxin, callus, chrysanthemum, somaclonal variation

PENDAHULUAN

Krisan (*Chrysanthemum indicum* L.) merupakan tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai tanaman hias maupun bahan baku obat. Bunga potong ini termasuk kedalam komoditas penting dalam bisnis tanaman hias. Pengembangan krisan perlu terus diupayakan dalam upaya pemenuhan selera konsumen. Salah satu metode perbanyakan masal yang digunakan dalam budidaya krisan adalah secara *in vitro*.

Perbanyakan tanaman secara *in vitro* secara teoritis akan menghasilkan tanaman-tanaman yang secara genetik seragam karena tanaman *in vitro* berkembang hanya melalui pembelahan sel secara mitotik. Namun banyak bukti menunjukkan bahwa dalam populasi tanaman yang dihasilkan secara *in vitro* melalui kultur kalus dan

embriogenesis terjadi variasi fenotipik. Variasi tersebut dinamakan variasi somaklonal. Variasi somaklonal yang terjadi pada kultur *in vitro* dapat dimanfaatkan sebagai salah satu alternatif pemuliaan tanaman karena dapat meningkatkan keragaman genetik dari suatu tanaman (Yuwono 2006).

Pembelahan sel secara berulang-ulang pada kultur *in vitro* dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh (ZPT). Auksin khususnya 2,4-D dengan konsentrasi tertentu dapat merangsang terbentuknya kalus. Kalus yang terbentuk dapat direkayasa dan diarahkan untuk membentuk organ maupun tanaman lengkap tergantung stimulus ZPT yang diberikan. Sehingga, penelitian ini bertujuan untuk memperoleh konsentrasi auksin (2,4-D) terbaik dalam menginduksi kalus yang berasal dari dua eksplan yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2012 sampai dengan bulan Januari 2013.

Bahan

Bahan tanaman yang digunakan adalah planlet krisantimum yang sebelumnya ditumbuhkan pada media *Murashige and Skoog* (MS) tanpa tambahan zat pengatur tumbuh. Eksplan yang digunakan adalah bagian daun dan *internode*nya. Media yang digunakan untuk menginduksi kalus pada percobaan ini adalah media MS dengan tambahan auksin yaitu *2,4-dichlorophenoxy acetic acid* (2,4-D) yang terdiri atas tiga taraf: 1 mg L⁻¹ 2,4-D, 2 mg L⁻¹ 2,4-D dan 3 mg L⁻¹ 2,4-D.

Metode percobaan

Penelitian tersusun atas dua percobaan. Percobaan pertama yaitu induksi kalus yang berasal dari eksplan daun. Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) satu faktor yaitu konsentersasi 2,4-D. Terdapat tiga taraf konsentersasi 2,4-D yaitu: 1, 2 dan 3 mg L⁻¹. Terdapat enam ulangan untuk masing-masing perlakuan sehingga terdapat 18 satuan percobaan (botol kultur). Tiap satuan percobaan terdiri atas 3 eksplan, sehingga terdapat 54 satuan amatan. Sedangkan percobaan kedua yaitu induksi kalus yang berasal dari eksplan *internode*. Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) satu faktor yaitu konsentersasi 2,4-D. Terdapat tiga taraf konsentersasi 2,4-D yaitu: 1, 2 dan 3 mg L⁻¹. Terdapat enam ulangan untuk masing-masing perlakuan sehingga terdapat 18 satuan percobaan (botol kultur). Tiap satuan percobaan terdiri atas 3 eksplan, sehingga terdapat 54 satuan amatan.

Prosedur kerja

Pembuatan media tanam

Pembuatan media MS dilakukan dengan mengambil larutan dari setiap larutan stok media (A, B, C, D, E, F, *myoinositol* dan vitamin) yang telah dibuat sesuai dengan volume yang diperlukan serta ditambah dengan auksin sesuai dengan taraf perlakuan masing-masing (1, 2 dan 3 mg L⁻¹). Setelah semua larutan dimasukkan ke dalam labu takar ditambahkan gula yang telah dilarutkan dengan konsentersasi 30 g l⁻¹. Lalu ditera sampai tanda tera dengan aquades. Setelah itu dilakukan pengukuran pH dengan kertas lakmus sampai pH media 5.8. Larutan media yang telah diukur pH dimasukkan kedalam panci lalu ditambahkan agar dengan konsentersasi 7 g l⁻¹. Larutan media dimasak sampai mendidih. Larutan media lalu dimasukkan ke dalam botol kultur sekitar 15 ml per botol. Semua media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 17.5 Psi selama 25-30 menit.

Penanaman eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* yang telah dibersihkan dengan menggunakan

alkohol 70%. Planlet krisantimum dikeluarkan dari botol dan disimpan dalam cawan petri steril. Akar dan daun yang telah kering dibuang. Daun tanpa tangkainya dan *internode* dipotong serta dilukai. Daun dan *internode* ditanam terpisah pada media sesuai perlakuan. Setiap botol ditanam tiga eksplan dan diberi kode. Semua botol disimpan di rak kultur yang gelap dan bertemperatur 18-21°C.

Peubah pengamatan

Peubah yang diamati terdiri atas persentase eksplan steril, persentase eksplan berkalus, diameter kalus dan jumlah tunas yang muncul.

Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan metode deskriptif serta analisis ragam dengan uji F pada taraf nyata 5%. Jika uji F berpengaruh nyata maka nilai tengah diuji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan (*Duncan Multiple Range Test/ DMRT*) pada taraf nyata 5%. Perangkat lunak yang digunakan adalah *Microsoft Excel* dan *Statistical Tool for Agricultural Research (STAR 2.0.1)*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan terhadap eksplan daun dan *internode* yang ditanam pada media MS ditambah dengan tiga taraf konsentersasi 2,4-D selama enam minggu setelah tanam menunjukkan bahwa rata-rata persentase eksplan hidup mencapai 89.23 % (Gambar 1.). Menurut Smith (2013) kondisi ini menggambarkan bahwa dengan adanya penambahan auksin (2,4-D) pada media tanam diduga dapat meningkatkan proses fisiologis sel sehingga eksplan daun dan *internode* dapat bertahan hidup. Eksplan menyerap air dan hara melalui pelukaan kemudian mengalir ke jaringan pembuluh sebagai aliran hara. Selain itu, eksplan yang digunakan merupakan planlet steril yang telah dikulturkan sebelumnya.

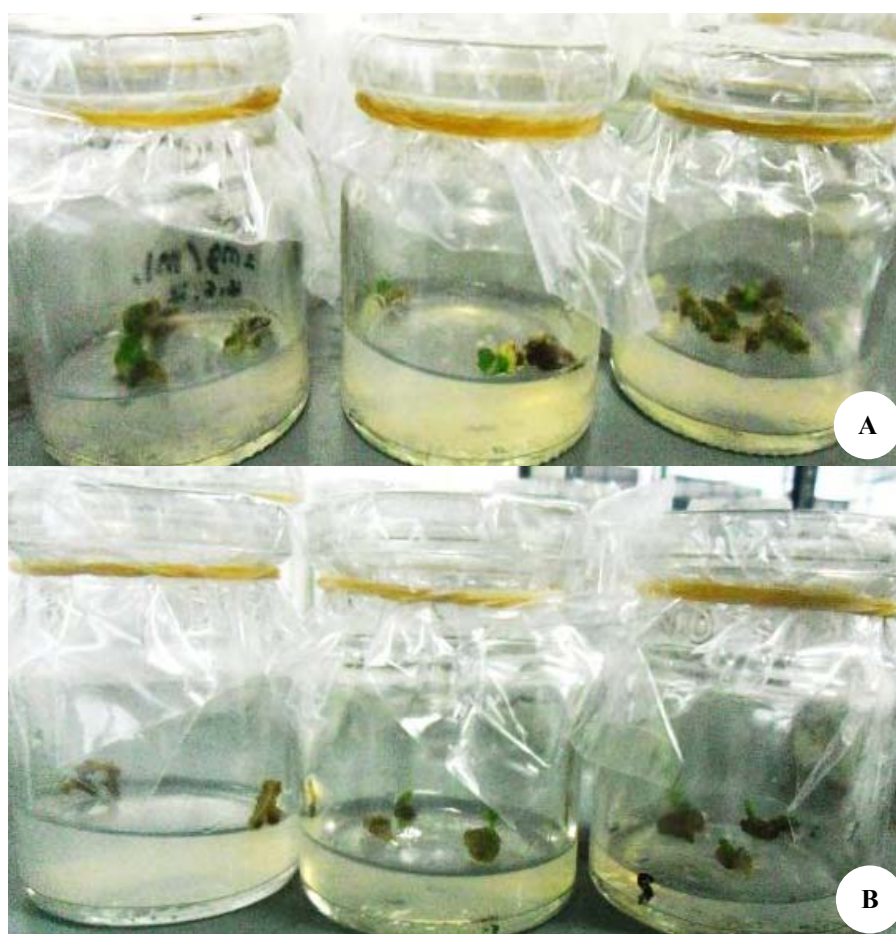
Eksplan daun yang ditanam pada media MS ditambah dengan berbagai taraf konsentersasi (1, 2 dan 3) mg L⁻¹ 2,4-D mulai memberikan respon pembentukan kalus pada tujuh hari setelah eksplan ditanam. Tabel 1. menunjukkan persentase eksplan daun berkalus pada berbagai konsentersasi 2,4-D selama enam minggu setelah tanam. Penambahan 2,4-D dengan konsentersasi 3 mg L⁻¹ pada media MS menunjukkan respon terbaik terhadap persentase eksplan daun berkalus. Smith (2013) menjelaskan bahwa penggunaan auksin pada kultur *in vitro* dapat merangsang pembentukan kalus dan menekan morfogenesis.

Kalus krisan pada media MS ditambah dengan 2 mg L⁻¹ BA dan 0.1 mg L⁻¹ NAA terbentuk 96% dari daun yang digunakan sebagai eksplan (Nahid et al 2007). Jaramillo et al (2008) melaporkan bahwa regenerasi krisan dengan menggunakan daun sebagai eksplan memiliki respon terbaik pada media MS ditambah dengan 4 mg L⁻¹ NAA dan 4.5 mg L⁻¹ BAP. Barakat et al (2010) menambahkan bahwa media terbaik untuk menginduksi kalus krisan yang berasal dari eksplan daun adalah media MS yang ditambah dengan 0.5 mg L⁻¹ NAA dan 1 mg L⁻¹ BAP.

Tabel 1. Persentase eksplan daun berkalus, *internode* berkalus, diameter kalus eksplan awal daun dan diameter kalus eksplan awal *internode* pada berbagai konsentrasi 2.4-D selama 6 minggu setelah tanam (%).

Konsentrasi 2.4-D (mg L ⁻¹)	Daun		<i>Internode</i>	
	Eksplan berkalus (%)	Diameter kalus (cm)	Eksplan berkalus (%)	Diameter kalus (cm)
1	53 b	0.06 b	100 b	0.57 a
2	12 c	0.12 b	100 c	0.46 a
3	100 a	0.41 a	42 a	0.19 b

Catatan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada hasil uji lanjut DMRT taraf 5%.



Gambar 1. Kalus krisan yang terbentuk: a. Eksplan daun; b. Eksplan *internode*

Berdasarkan Tabel 1. media yang memberikan respon terbaik terhadap persentase eksplan *internode* berkalus adalah media MS yang ditambah dengan 1 atau 2 mg L⁻¹ 2.4-D. Hasil penelitian yang diperoleh Ilahi et al (2007) menunjukkan bahwa media MS yang mengandung 0.5 mg L⁻¹ NAA dan 0.5 mg L⁻¹ BAP merupakan media terbaik untuk menginduksi kalus krisan dengan menggunakan eksplan yang berasal dari *internode*. Shatnawi et al. (2010) mengungkapkan bahwa media MS dengan tambahan 0.6 mg L⁻¹ kinetin merupakan media terbaik untuk multiplikasi

kalus krisan dengan menggunakan buku tunggal sebagai eksplan awal. Penggunaan media MS dengan tambahan zat pengatur tumbuh tunggal juga dilakukan oleh Waseem et al (2011) untuk menginduksi kalus krisan dengan eksplan awal berupa *internode*, media MS ditambah dengan 0.2 mg L⁻¹ IBA merupakan media terbaik untuk menginduksi kalus.

Hasil pengamatan terhadap diameter kalus yang terbentuk pada eksplan awal berupa daun disajikan pada Tabel 1. Penambahan 2.4-D dengan konsentrasi 3 mg L⁻¹

pada media MS menunjukkan respon terbaik terhadap diameter kalus yang terbentuk. Berbeda halnya dengan hasil pengamatan pada Tabel 1. yang menunjukkan bahwa penambahan 2,4-D dengan konsentrasi 1 atau 2 mg L⁻¹ pada media MS menunjukkan respon terbaik terhadap diameter kalus yang terbentuk dari eksplan awal berupa *internode*.

Tunas yang muncul dari kalus dengan eksplan awal berupa daun terdapat pada media MS + 3 mg L⁻¹ 2,4-D sebanyak 33.3% selama enam minggu setelah tanam. Sedangkan kalus yang berasal dari eksplan awal berupa *internode* menghasilkan tunas hanya pada media MS + 1 mg L⁻¹ 2,4-D sebanyak 11.2 %. Perlu adanya subkultur kalus pada media inisiasi tunas dan pengakaran. Verma (2012) melaporkan bahwa media MS + 0.5 mg L⁻¹ NAA merupakan media terbaik untuk pengakaran kalus krisan. Pada tahun yang sama, Nalini (2012) mengungkapkan bahwa media MS + 3 mg L⁻¹ kinetin + 2 mg L⁻¹ IAA merupakan media terbaik untuk menginisiasi munculnya tunas, sedangkan media MS + 1 mg L⁻¹ IBA adalah media terbaik untuk pengakaran kalus krisan. Lindiro et al (2013) menambahkan bahwa media terbaik untuk menginisiasi munculnya tunas krisan adalah media MS + 5 mg L⁻¹ BAP sedangkan media terbaik untuk pengakaran adalah media MS + 10 mg L⁻¹ IBA. Menurut Zafarullah et al (2013) media MS + 1 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ IAA merupakan media terbaik untuk multiplikasi tunas krisan secara *in vitro*. Sedangkan untuk pengakaran, media MS + 0.1 mg L⁻¹ IBA merupakan media terbaik.

Penggunaan kultur jaringan, khususnya induksi kalus sebagai metode perbanyakan tanaman dapat meningkatkan variasi somaklonal. Miler dan Zalewska (2014) mengungkapkan bahwa variasi somaklonal pada kultur kalus krisan terjadi lebih besar pada eksplan yang berasal dari daun dibandingkan dengan *internode*. Upaya peningkatan keragaman genetik pada krisan telah dilakukan Misra dan Datta (2007) menggunakan radiasi sinar gamma dengan dosis terbaik 10 Gy. Zalewska et al (2011) telah menghasilkan kultivar krisan baru dari hasil mutagenesis menggunakan radiasi sinar gamma dengan dosis 15 Gy. Nencheva (2006) melaporkan bahwa terdapat korelasi positif antara tinggi planlet ketika berumur 4 minggu setelah aklimatisasi dengan panjang tangkai bunga ketika tanaman tersebut mulai berbunga. Keragaman genetik dan proses penyeleksian merupakan modal utama dalam pemuliaan tanaman.

Eksplan yang berasal dari daun memiliki respon terbaik terhadap pembentukan kalus krisan pada media *Murashige and Skoog* (MS) dengan penambahan 3 mg L⁻¹ 2,4-D. Berbeda halnya dengan eksplan yang berasal dari *internode* memiliki respon terbaik terhadap pembentukan kalus krisan pada media MS dengan penambahan 1 mg L⁻¹ 2,4-D dan 2 mg L⁻¹ 2,4-D. Perlu adanya penelitian lanjutan terkait inisiasi tunas dan akar pada kalus yang telah terbentuk.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Megayani Sri Rahayu sebagai pembimbing dalam penelitian ini. Terimakasih pula kepada Nurila Kusuma Sari dan Mustika Dwi Rahayu, dari Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB Bogor yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Barakat MN, RSA Fattah, M Badr, MG El-Torky. 2010. *In vitro* culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*. African J Biotechnol 9(8): 1151-1158.
- Ilahi I, M Jabeen, SN Sadaf. 2007. Rapid clonal propagation of *Chrysanthemum* through embryogenic callus formation. Pakistan J Bot 39(6): 1945-1952.
- Jaramillo EH, A Forero, G Cancino, AM Moreno, LE Monsalve, W Acero. 2008. *In vitro* regeneration of three chrysanthemum (*Dendrathera grandiflora*) varieties via organogenesis and somatic embryogenesis. Universitas Scientiarum 13(2): 118-127.
- Lindiro C, J Kahia, T Asimwe, I Mushimiyimana, B Waweru, M Kouassi, E Koffi, S Kone, PY Sallah. 2013. *In vitro* regeneration of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) plantlets from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. international journal of application or innovation in engineering and management 2(7): 207-213.
- Miler N, M Zalewska. 2014. Somaclonal variation of *Chrysanthemum* propagated *in vitro* from different explants types. Acta Sci. Pol 13(2): 69-82.
- Misra P, SK Datta. 2007. Standardization of *in vitro* protocol in *Chrysanthemum* cv. Madam E Roger for development of quality planting material and to induce genetic variability using gamma radiation. Indian J Biotechnol 6(1): 121-124.
- Nahid JS, S Shyamali, H Kazumi. 2007. High frequency shoot regeneration from petal explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *in vitro*. Pakistan J Biol Sci 10(19): 3356-3361.
- Nalini R. 2012. Micropropagation of *Chrysanthemum (Chrysanthemum morifolium)* using shoot tip as explant. international journal of food, agriculture and veterinary sciences 2(2): 62-66.
- Nencheva D. 2006. *In vitro* prediction of plant height for *Chrysanthemum x grandiflorum* (Ramat.) Kitam. J Fruit Ornamental Res 14(1): 223-232.
- Shatnawi M, AA Fauri, H Megdadi, MKA Shatnawi, R Shibli, SA Romman, ALA Ghzawi. 2010. *In vitro* multiplication of *Chrysanthemum morifolium* Ramat and its responses to NaCl induced salinity. Jordan J Biol Sci 3(3): 101-110.
- Smith RH. 2013. Plant tissue culture: techniques and experiments. Academic press. Texas.
- Verma OP. Standardization of auxin concentration for root induction in *Chrysanthemum morifolium*. advances in applied science research 3(3): 1449-1453.
- Waseem K, MS Jilani, MS Khan, M Kiran, G Khan. 2011. Efficient *in vitro* regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) plantlets from nodal segments. african journal of biotechnology 10(8): 1477-1484.
- Yuwono T. 2006. Bioteknologi Pertanian. Univ Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Zafarullah S, S Ilyas, S Naz, F Aslam, F Manzoor. 2013. Effect of culture media and growth regulators on *in vitro* propagation of *Chrysanthemum indicum* L. Pakistan J Sci 65(4): 462-466.
- Zalewska M, A Tymozuk, N Miler. 2011. New *Chrysanthemum* cultivars as a result of *in vitro* mutagenesis with the application of different explant types. Acta Sci Pol 10(2): 109-123.