

Induksi Kalus Eksplan Daun Stroberi (*Fragaria x ananassa* Duch) dengan Pemberian NAA dan CaP Secara In Vitro

Callus Induction of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) Leaf Explant with the Application of NAA and CaP under In Vitro Condition

Fauzia Khaerunnisa Millenia*, Sumadi, Erni Suminar, Anne Nuraini, Gina Gustiani Pitaloka

*) Email korespondensi: fauziakm01@gmail.com

Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung Sumedang KM 21, Jatinangor, Kabupaten Sumedang

ABSTRAK

Penggunaan varietas unggul stroberi seperti Sweet Charlie perlu diikuti dengan metode perbanyakan yang tepat agar dapat menghasilkan bibit stroberi dalam jumlah besar dengan waktu yang singkat dan bebas dari penyakit. Teknik perbanyakan secara *in vitro* dapat dilakukan melalui pembentukan kalus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi perlakuan NAA dan CaP dalam induksi kalus daun stroberi varietas Sweet Charlie secara *in vitro*. Percobaan ini disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 9 perlakuan, yaitu konsentrasi NAA (0 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹) dan CaP (0 mgL⁻¹, 1 mgL⁻¹, 2mg L⁻¹) yang diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan penggunaan NAA 5 mgL⁻¹ merupakan perlakuan terbaik dalam menunjang induksi kalus daun stroberi varietas Sweet Charlie secara *in vitro*, dengan parameter persentase membentuk kalus mencapai 100%, waktu muncul kalus pada 13,5 hari setelah tanam (HST), diameter kalus sebesar 9,00 mm, bobot kalus sebesar 0,52 g, dan persentase kalus bertekstur remah sebesar 50%.

Kata kunci: stroberi; NAA; CaP; *in vitro*; kalus.

ABSTRACT

The use of high-yielding strawberry varieties such as Sweet Charlie needs to be followed by proper propagation methods to produce large amounts of strawberry seeds quickly and free from disease. In vitro propagation techniques can be done through the formation of a callus. This study aims to determine the effect of the combination of NAA and CaP treatment on the in vitro induction of the Sweet Charlie strawberry variety leaf callus. This experiment was arranged using a completely randomized design (CRD) which consisted of 9 treatments, namely concentrations of NAA (0 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹) and CaP (0 mgL⁻¹, 1 mgL⁻¹, 2mg L⁻¹) which was repeated three times. The results showed that using NAA 5 mgL⁻¹ was the best treatment to support callus induction of the Sweet Charlie strawberry variety in vitro. The supporting with the parameter percentage of callus formation reaching 100%, callus appearance time at 13.5 days after planting (DAP), callus diameter of 9.00 mm, callus weight of 0.52 g, and the percentage of crumbly textured callus was 50%.

Keywords: strawberry; NAA; CaP; *in vitro*; callus.

I. PENDAHULUAN

Stroberi (*Fragaria x ananassa* Duch) merupakan spesies hibrida yang cukup terkenal di seluruh dunia dengan ciri warna merah yang menarik, aroma khas, dan memiliki nilai gizi tinggi dari segi vitamin dan mineral (Kumar dkk. 2022). Kesadaran masyarakat akan manfaat dari stroberi untuk kesehatan menjadikan permintaan stroberi di Indonesia terus

meningkat, namun tidak diimbangi dengan adanya peningkatan produksi. Data Badan Pusat Statistik dan Direktorat Jenderal Hortikultura menunjukkan bahwa produksi buah stroberi di Indonesia pada tahun 2016 sebesar 12.091 t menurun hingga 8.350 t pada tahun 2020. Permasalahan lain stroberi di Indonesia adalah ketersediaan benih berkualitas dan bebas penyakit (Nofrianinda dkk., 2017).

Salah satu varietas stroberi introduksi adalah Sweet Charlie dengan keunggulannya yaitu memiliki waktu berbuah yang cepat dan tahan penyakit antraknosa (Howard, 1994). Hingga saat ini, salah satu metode perbanyakan yang masih sering dilakukan dalam budidaya stroberi ialah secara konvensional menggunakan stolon. Namun kelemahan metode ini adalah volume perbanyakan yang relatif lebih sedikit serta adanya infeksi patogen endogenous yang ditularkan dari tanaman induk dapat menyebabkan benih tidak bebas penyakit (Bimantara dkk., 2018).

Teknik perbanyakan secara *in vitro* merupakan salah satu teknik penting untuk dapat menciptakan planlet *true-to-type* dan bebas patogen (Chung dan Ouyang, 2020). Regenerasi tanaman secara *in vitro* ini salah satunya dapat dilakukan melalui pembentukan kalus (Dewi dkk. 2016). Kalus adalah kumpulan sel yang belum terdiferensiasi dan terbentuk pada bekas irisan atau bekas luka pada organ tanaman yang dikulturkan (Dwiyani, 2015). Hasil penelitian Rahman dkk. (2015) disimpulkan bahwa pada stroberi induksi kalus lebih produktif dengan penggunaan jaringan daun sebagai eksplan. Daun muda merupakan organ tanaman yang mempunyai daya regenerasi tinggi dan mudah didapatkan dari tanaman induk. Marlin dkk. (2012) menyatakan bahwa untuk pembentukan kalus diperlukan auksin dalam jumlah yang relatif tinggi.

Naphthalene acetic acid (NAA) adalah auksin sintetis yang digunakan untuk merangsang pertumbuhan kalus. NAA digunakan karena memiliki beberapa keunggulan, seperti sifatnya yang lebih stabil dibandingkan dengan IAA (Wulandari dkk., 2004) serta penggunaan 2,4-D dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan variasi somaklonal (Bairu dkk., 2011). Hasil penelitian pada stroberi ditemukan pemberian 4 mg L⁻¹ NAA mampu memberikan persentase kalus tertinggi (Biswas dkk. 2007), dengan adanya penambahan konsentrasi diharapkan induksi kalus dapat terjadi lebih optimal. Penelitian oleh Nurhidayati dkk. (2016), disimpulkan bahwa kombinasi ½ MS + 5 mg L⁻¹ NAA menghasilkan kalus temulawak dengan penambahan bobot yang tinggi yaitu 1,46 g. Penambahan 10 mg L⁻¹ NAA pada media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa dilaporkan menghasilkan persentase eksplan membentuk kalus > 80% untuk semua jenis eksplan dari empat genotipe ubi kayu yang diujikan (Nugroho, 2017).

Kultur *in vitro* juga membutuhkan vitamin sebagai katalis dari berbagai proses metabolik (Sukmadjaja, 2014). *Calcium pantothenate* (CaP) merupakan salah satu jenis vitamin yang dapat digunakan dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro*. CaP merupakan bentuk garam kalsium dari asam pantotenat atau disebut juga vitamin B5. Media yang diberikan 1 - 2 mgL⁻¹ CaP berpengaruh memberikan peningkatan pada diameter kalus ubi kayu varietas Adira 2 (Khumaida dkk. 2011).

Informasi mengenai peranan NAA yang dikombinasikan dengan CaP dalam proses induksi kalus secara *in vitro* masih belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, penelitian ini

bertujuan untuk mengetahui pengaruh dan mendapatkan kombinasi terbaik dari NAA dan CaP dalam menginduksi kalus daun stroberi varietas Sweet Charlie secara *in vitro*.

II. METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Teknologi Benih, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran. Percobaan dilakukan pada bulan Desember 2021 sampai Maret 2022.

1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, eksplan Daun stroberi varietas Sweet Charlie hasil subkultur ke-4 koleksi UPTD Balai Pengembangan Benih Hortikultura dan Aneka Tanaman Pasir Banteng, zat pengatur tumbuh NAA dan CaP, aquades steril, media MS (Murashige and Skoog), gula (sukrosa), agar Gelzan, HCl, dan NaOH.

2. Pelaksanaan Penelitian

a. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat yang digunakan untuk penanaman menggunakan sabun anti bakteri kemudian dikeringanginkan dan disterilisasi menggunakan oven dengan suhu 120°C selama ± 3 jam. Sedangkan untuk botol kultur disterilisasi menggunakan autoklaf bertekanan 17.5 psi (kg cm^{-2}) dengan suhu 121°C selama 1 jam. Sterilisasi ruang kultur sebelum penanaman dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% pada *Laminar Air Flow* dan dilap bersih menggunakan tisu kering, kemudian dinyalakan lampu UV selama ± 15 menit.

b. Pembuatan Media

Pembuatan media perlakuan dilakukan dengan mencampurkan media MS, gula (sukrosa), agar murni gelzan dan ditambahkan NAA dan CaP sesuai dengan konsentrasi perlakuan yang telah ditentukan, terdiri dari : A (Kontrol), B (1 mg L^{-1} CaP), C (2 mg L^{-1} CaP), D (5 mg L^{-1} NAA), E (5 mg L^{-1} NAA + 1 mg L^{-1} CaP), F (5 mg L^{-1} NAA + 2 mg L^{-1} CaP), G (10 mg L^{-1} NAA), H (10 mg L^{-1} NAA + 1 mg L^{-1} CaP), dan I (10 mg L^{-1} NAA + 2 mg L^{-1} CaP).

c. Penanaman Eksplan

Penanaman dilakukan di LAF dimana eksplan berupa daun stroberi varietas Sweet Charlie diambil menggunakan pinset dari botol kultur tanaman induk kemudian dipotong atau dipisahkan dari bagian batang dan diletakkan pada petridish steril. Eksplan kemudian dilukai menggunakan *scalpel* dan segera ditanam dengan posisi daun tertelungkup sebanyak satu eksplan untuk setiap botol. Botol kemudian ditutup menggunakan plastik dan diikat dengan karet gelang dan bagian luar botol disemprot alkohol 70% untuk selanjutnya diinkubasikan di dalam ruang kultur dengan penyinaran cahaya selama 16 jam dan suhu $21-22^{\circ}\text{C}$.

d. Analisis data

Rancangan penelitian ini menggunakan model linier Rancangan Acak Lengkap (RAL)

yang terdiri dari sembilan perlakuan diulang sebanyak tiga kali dan setiap ulangan terdiri dari dua unit sehingga didapat 54 unit percobaan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varian ANOVA pada taraf 5% dan apabila terdapat pengaruh nyata (nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$) maka dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf 5% menggunakan software SPSS.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Persentase Eksplan Membentuk Kalus

Tabel 1 menunjukkan induksi kalus dapat terbentuk dari eksplan daun stroberi varietas Sweet Charlie yang diberi perlakuan NAA secara mandiri maupun dikombinasikan dengan CaP pada 12 MST (minggu setelah tanam) dengan persentase masing-masing mencapai 100%. Pada perlakuan kontrol dan penambahan CaP secara mandiri, eksplan daun mengalami pelengkungan dan sebagian hingga pembengkakan, tetapi tidak dapat menginduksi terjadinya kalus hingga akhir pengamatan. Kondisi ini diduga karena auksin endogen pada eksplan belum mampu menginduksi kalus secara optimal, sehingga diperlukan tambahan auksin eksogen pada media kultur.

Tabel 1. Persentase eksplan daun stroberi membentuk kalus (%) dengan pemberian NAA dan CaP secara *In Vitro* pada 12 MST.

	Perlakuan	Eksplan membentuk kalus (%)
A	Kontrol	0
B	1 mg L ⁻¹ CaP	0
C	2 mg L ⁻¹ CaP	0
D	5 mg L ⁻¹ NAA	100
E	5 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ CaP	100
F	5 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ CaP	100
G	10 mg L ⁻¹ NAA	100
H	10 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ CaP	100
I	10 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ CaP	100

Keberhasilan induksi kalus pada eksplan daun stroberi juga dilaporkan Chomboon dan Pana (2022), pada media dengan penambahan NAA secara mandiri dengan persentase 53% hingga 100%. Pada media kontrol atau tanpa penambahan ZPT tidak terjadi induksi kalus pada eksplan daun yang ditanam. NAA merupakan auksin sintetik yang banyak digunakan dalam kultur jaringan yang aplikasinya dalam konsentrasi tinggi mampu memicu terbentuknya kalus. Penambahan CaP sebagai vitamin tidak berpengaruh dalam menginduksi kalus apabila tidak dikombinasikan dengan NAA karena auksin dibutuhkan sebagai hormon yang berperan dalam induksi kalus (Pierik, 1987).

2. Waktu Muncul Kalus

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pemberian NAA dan CaP berpengaruh nyata terhadap waktu muncul kalus (Tabel 2). Tabel 2 menunjukkan kontrol dan penambahan CaP secara mandiri tidak membentuk kalus hingga akhir pengamatan. Waktu muncul kalus paling cepat terdapat pada perlakuan F (5 mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ CaP) yaitu pada 12,67

HST (hari setelah tanam) namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan D, E, dan I. Ketiga perlakuan tersebut juga tidak berbeda nyata dengan perlakuan G, serta perlakuan G tidak berbeda nyata dengan perlakuan H.

Tabel 2. Waktu muncul kalus eksplan daun stroberi (HST) dengan pemberian NAA dan CaP secara *In Vitro*.

Perlakuan		Waktu muncul kalus (HST)
A	Kontrol	0,00 a
B	1 mg L ⁻¹ CaP	0,00 a
C	2 mg L ⁻¹ CaP	0,00 a
D	5 mg L ⁻¹ NAA	13,50 bc
E	5 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ CaP	15,30 bc
F	5 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ CaP	12,67 b
G	10 mg L ⁻¹ NAA	16,50 cd
H	10 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ CaP	17,67 d
I	10 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ CaP	13,50 bc

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada Taraf 5%.

Perhitungan waktu muncul kalus ditandai pada saat munculnya bulir-bulir putih bening yang merupakan kalus (Gambar 1). Kalus hanya tumbuh pada penambahan NAA secara mandiri dan saat dikombinasikan dengan CaP. Pembentukan kalus dikehendaki auksin dalam jumlah yang relatif tinggi dan penambahan vitamin, yang dapat berpengaruh pada pertumbuhan sel serta proses diferensiasi sel dan jaringan (Dwiyani, 2015).

Hasil yang diperoleh ini sejalan dengan penelitian Kawochar dkk. (2017), bahwa penambahan 5 mgL⁻¹ NAA pada media MS mampu menginduksi kalus tanaman kentang dengan kisaran waktu muncul kalus pada 7-25 HST, namun tidak mampu menginduksi terjadinya kalus pada media yang tidak ditambahkan NAA. Induksi kalus eksplan daun bagian ujung dan pangkal suspensi temu putih juga terjadi pada pemberian 10 mg L⁻¹ NAA + 0,1 BA mg L⁻¹ yaitu pada hari ke-30 setelah tanam (Yustiawan, 2007). Rahmi dkk. (2017) menyebutkan bahwa penambahan CaP berperan dalam menyumbang kalsium dan asam pantotenat. Penambahan asam pantotenat terbukti mampu menyokong produksi kalus dari bagian batang tanaman haw atau *hawthorn berry* (Morel, 1946; dalam George dkk. 2008). Asam pantotenat diketahui mampu mensintesis koenzim A untuk berperan dalam metabolisme karbohidrat dan asam lemak dalam reaksi penghasilan energi (Coxon dkk. 2005) untuk dapat mendorong terjadinya pembelahan sel-sel baru.



Gambar 1. Awal muncul kalus eksplan daun stroberi pada 2 MST.

Waktu muncul kalus yang lebih lama pada perlakuan H diduga karena semakin tinggi konsentrasi auksin yang ditambahkan pada media kultur, sehingga dapat meningkatkan produksi etilen yang menghambat aktivitas auksin dalam pemanjangan sel (Sari dan Mayta, 2021). Hasil ini didukung oleh penelitian Widyawati (2010) yang menyimpulkan semakin tinggi konsentrasi NAA maka cenderung dapat menghambat saat kemunculan kalus pada eksplan tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas*).

3. Diameter Kalus

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pemberian NAA dan CaP berpengaruh nyata terhadap diameter kalus (Tabel 3). Tabel 3 menunjukkan perlakuan D (5 mg L⁻¹ NAA), F (5 mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ CaP), dan I (10 mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ CaP) memiliki diameter kalus yang lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya. Ketiga perlakuan tersebut tidak berbeda nyata dengan perlakuan E dan G. Kedua perlakuan tersebut juga tidak berbeda nyata dengan perlakuan H.

Tabel 3. Diameter kalus eksplan daun stroberi (mm) dengan pemberian NAA dan CaP secara *In Vitro* pada 12 MST.

Media in vitro		Diameter kalus (mm)
A	Kontrol	0,00 a
B	1 mg L ⁻¹ CaP	0,00 a
C	2 mg L ⁻¹ CaP	0,00 a
D	5 mg L ⁻¹ NAA	9,00 c
E	5 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ CaP	5,50 bc
F	5 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ CaP	8,43 c
G	10 mg L ⁻¹ NAA	3,93 bc
H	10 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ CaP	3,63 b
I	10 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ CaP	8,00 c

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada Taraf 5%.

Kalus yang tumbuh dengan baik ditandai dengan pertambahan diameter. Setiap milimeter pertambahan kalus menjadikan jumlah sel-sel meningkat sebagai materi genetik yang terus berkembang dan berpotensi untuk beregenerasi menjadi tunas (Latief dkk. 2018). Pertambahan diameter yang baik ini akan menyokong bobot kalus yang baik juga. Santoso dan Nursandi (2004) menyatakan auksin berperan merangsang pembelahan sel dan diferensiasi, sedangkan kandungan kalsium pada CaP dapat ikut berperan dalam pemanjangan dan pembelahan sel (Aranda-Peres dkk., 2009) sehingga ukuran kalus menjadi lebih besar. Hasil ini sesuai dengan penelitian Khumaida dkk. (2011), yaitu penggunaan CaP diketahui dapat berpengaruh terhadap peningkatan diameter kalus ubi kayu varietas Adira 2.

Ukuran diameter kalus yang lebih kecil pada perlakuan H diduga karena konsentrasi NAA yang terlalu tinggi dapat menyebabkan pertumbuhan terhambat akibat adanya biosintesis etilen. Hasil ini tidak selaras dengan penelitian Nugroho (2017), yang menyimpulkan bahwa media MS + 20 g L⁻¹ sukrosa + 10 mg L⁻¹ NAA mampu menghasilkan diameter kalus terbaik pada beberapa genotipe ubi kayu. Hal ini dapat terjadi karena setiap spesies jenis tanaman maupun bagian tanaman tertentu yang digunakan sebagai eksplan

dapat memiliki respon berbeda terhadap pemberian konsentrasi zat pengatur tumbuh yang sama (Darmawati, 2013).

4. Bobot Kalus

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pemberian NAA dan CaP berpengaruh nyata terhadap bobot kalus (Tabel 4). Perlakuan media D (5 mg L⁻¹ NAA) menunjukkan bobot kalus terbaik yaitu 0,52 g, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan F dan I. Hasil ini sejalan dengan penelitian Abbas dkk., (2017) yang menunjukkan bobot kalus terbaik pada media dengan pemberian 5 mg L⁻¹ NAA dan 2 mg L⁻¹ BAP sebesar 1,02 g pada eksplan daun stroberi kultivar Albion.

NAA dalam aplikasinya memberikan pengaruh yang baik pada seluruh parameter. Hal ini karena seluruh variabel pengamatan saling berkaitan satu sama lain. Diameter kalus yang dihasilkan dapat dipengaruhi dari waktu muncul kalus, serta bobot basah kalus yang lebih besar biasanya didukung oleh diameter kalus yang besar pula (Fitriani dkk. 2019). Induksi kalus pada *Amaranthus tricolor* juga diketahui menghasilkan ukuran kalus terbesar sekaligus bobot kalus terbaik pada media MS + 10 mg L⁻¹ NAA + 0,5 mg L⁻¹ BAP sebesar 2,54 g dan pada media MS + 5 mg L⁻¹ NAA + 1 mg L⁻¹ BAP sebesar 2,19 g (Comia-Yebon dkk. 2017).

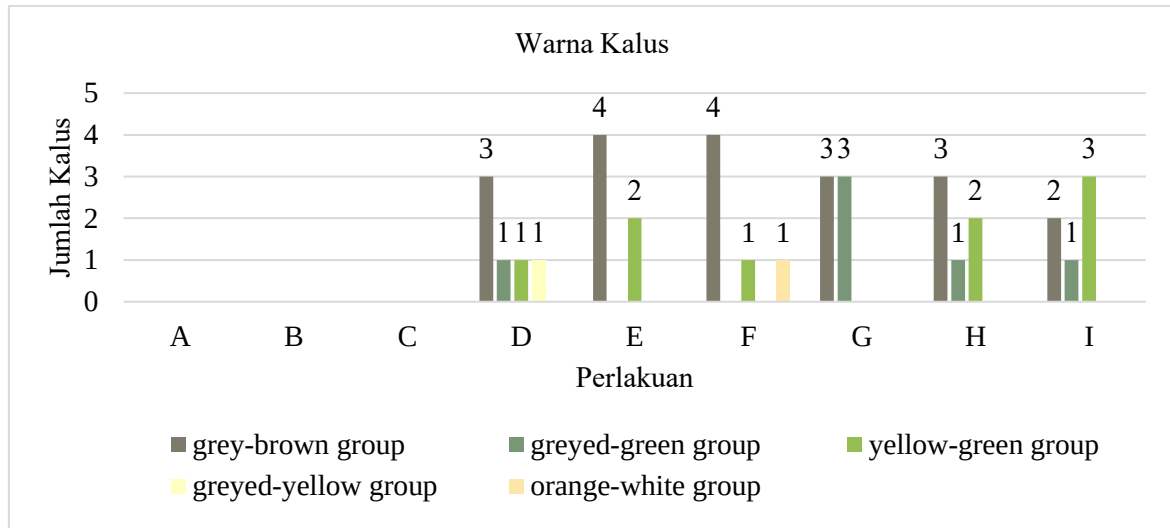
Tabel 4. Bobot kalus eksplan daun stroberi (g) dengan pemberian NAA dan CaP secara *In Vitro* pada 12 MST.

Perlakuan		Bobot kalus (g)
A	Kontrol	0,00 a
B	1 mg L ⁻¹ CaP	0,00 a
C	2 mg L ⁻¹ CaP	0,00 a
D	5 mg L ⁻¹ NAA	0,52 b
E	5 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ CaP	0,05 a
F	5 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ CaP	0,26 ab
G	10 mg L ⁻¹ NAA	0,01 a
H	10 mg L ⁻¹ NAA + 1 mg L ⁻¹ CaP	0,02 a
I	10 mg L ⁻¹ NAA + 2 mg L ⁻¹ CaP	0,25 ab

Keterangan: Nilai rata-rata yang diikuti dengan huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada Taraf 5%.

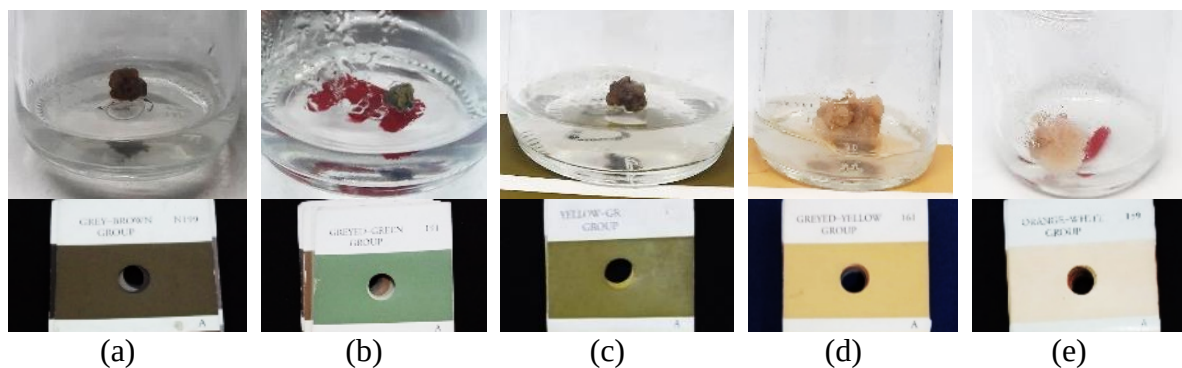
5. Warna dan Tekstur Kalus

Berdasarkan hasil pengamatan warna kalus disesuaikan dengan *Royal Horticulture Society color chart* pada 12 MST (Gambar 2), diperoleh warna kalus *grey-brown group* sebanyak 19 kalus, *yellow-green group* 9 kalus, *greyed-green group* 6 kalus, serta *orange-white group* dan *greyed-yellow group* masing-masing 1 kalus (Gambar 3). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kalus yang terbentuk mulanya berwarna putih. Seiring berjalannya waktu, ada yang berubah menjadi warna putih kekuningan hingga menjadi kecoklatan. Kalus putih kekuningan merupakan massa sel yang menuju fase akhir pembelahan aktif dan kalus kecoklatan menandakan massa sel menuju fase penuaan (senesen) (Rasud dan Bustaman, 2020).



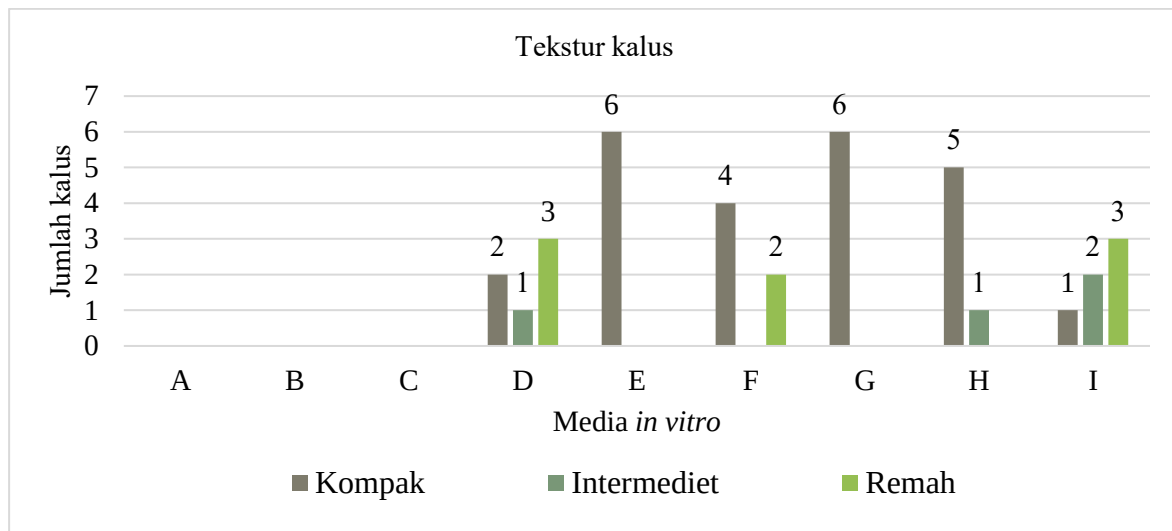
Gambar 2. Warna kalus eksplan daun stroberi pada setiap perlakuan NAA dan CaP secara *in vitro* pada 12 MST.

Dominansi warna kalus *grey-brown group* pada 12 MST disebabkan karena kalus telah mengalami pencoklatan. Peristiwa pencoklatan ini dapat terjadi karena meningkatnya produksi senyawa fenolat yang diikuti oleh adanya aktivitas enzim polifenol oksidase dan polimerasinya (Tabiyeh dkk. 2006). Faktor lain yang dapat terjadi adalah karena senesen, ditandai dengan proses penuaan yang cepat meskipun nutrisi pada media dan sirkulasi gas masih mencukupi. Hal ini dapat terjadi dalam kalus yang berubah warna secara gradual dari abu-abu menjadi coklat (Prihatmanti dan Nurhayati, 2004).



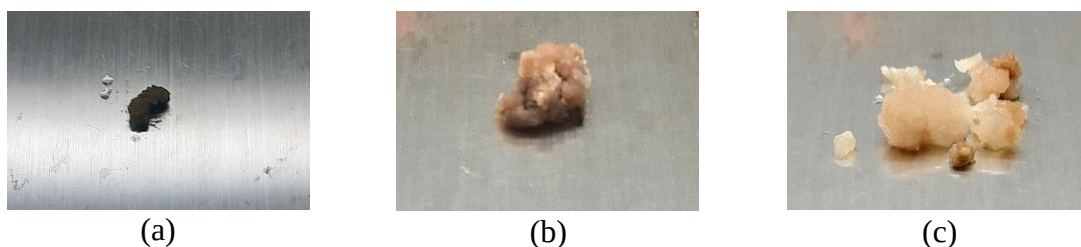
Gambar 3. Warna kalus eksplan daun stroberi pada media MS dengan pemberian NAA dan CaP (a) *grey-brown group*; (b) *greyed-green group*; (c) *yellow-green group*; (d) *greyed-yellow group*; (e) *orange-white group*.

Penanaman periode panjang kalus pada media dengan konsentrasi auksin cukup tinggi diketahui beresiko menurunkan daya regenerasi kalus (Budiarto dkk. 2015). Ini dapat dicegah dengan melakukan subkultur atau pemindahan kalus pada media kultur yang baru, agar kebutuhan hara tetap terpenuhi untuk melakukan pertumbuhan. Menurut Wahyuni dkk. (2020), proliferasi kalus sebaiknya dilakukan setiap 28 hari sekali. Media untuk subkultur dapat sama atau berbeda dengan komposisi media sebelumnya tergantung dari tujuan yang dikehendaki.



Gambar 4. Tekstur kalus eksplan daun stroberi pada setiap perlakuan NAA dan CaP secara *in vitro* pada 12 MST (Minggu Setelah Tanam).

Tekstur kalus merupakan parameter yang dapat menentukan kualitas suatu kalus yang selnya masih aktif membelah atau telah mengalami stagnansi dalam pembelahan selnya (Ariani dkk. 2016). Berdasarkan hasil pengamatan tekstur kalus pada 12 MST (Gambar 4), tekstur didominasi oleh tekstur kompak yaitu sebesar 66,67%, yang terbentuk karena proses lignifikasi disebabkan oleh efek dari ZPT dalam transport zat hara sehingga tekstur kalus menjadi lebih keras (Mahadi dkk. 2016). Kalus intermediet merupakan massa kalus yang terdiri dari kelompok sel-sel yang sebagian kompak dan sebagian remah (Gambar 5).



Gambar 5. Tekstur kalus eksplan daun stroberi (a) Kompak; (b) Intermediet; (c) Remah.

Tekstur kalus yang baik untuk tujuan perbanyakan jumlah kalus ialah kalus remah, dengan tekstur lunak dan mampu meningkatkan aerasi oksigen antar-sel serta mudah dipisahkan menjadi sel-sel tunggal (Rasud dan Bustaman, 2020). Nisak dkk. (2012) menambahkan tekstur kalus yang remah disebabkan oleh hormon NAA yang dapat menstimulasi pemanjangan sel dengan menambah plastisitas dinding sel menjadi longgar, sehingga air dapat masuk ke dalam dinding sel dengan cara osmosis dan sel mengalami pemanjangan.

Tekstur kalus remah banyak dihasilkan pada perlakuan D (5 mg L⁻¹ NAA) dan I (10 mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ CaP) sebesar masing-masing 50%. Penelitian de Sousa dkk. (2022) menunjukkan penggunaan 5 mg L⁻¹ NAA + 2,5 mg L⁻¹ BAP mampu menginduksi terbentuknya *primary callus* dengan kenampakan kalus berwarna putih dan bertekstur remah (*friable*) pada eksplan *P. hispidineverum* hingga 32% pada 60 HST. Penambahan CaP

dengan kandungan kalsiumnya diduga memiliki interaksi dengan zat pengatur tumbuh dalam pembentukan kalus yang *friable* atau mudah pecah (Montoro dkk. 1995; dalam Ghasemi dkk. 2009).

Penambahan NAA dan CaP terutama perlakuan D (5 mg L⁻¹ NAA), F (5 mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ CaP) dan I (10 mg L⁻¹ NAA + 2 mg L⁻¹ CaP) mampu menginduksi terbentuknya kalus dan memberikan hasil yang baik pada beberapa parameter pertumbuhan kalus. Oleh karena itu, pemberian 5 mg L⁻¹ NAA atau perlakuan D terbukti efisien dan dinilai lebih ekonomis untuk dapat menunjang terjadinya induksi kalus serta memberikan respon pertumbuhan kalus yang baik dari eksplan daun stroberi varietas Sweet Charlie secara *in vitro* hingga 12 MST.

IV. KESIMPULAN

Media terbaik untuk induksi kalus eksplan daun stroberi varietas Sweet Charlie secara *in vitro* adalah media dengan pemberian NAA 5 mg L⁻¹, dengan persentase membentuk kalus sebesar 100%, waktu muncul kalus pada 13,5 HST, diameter kalus sebesar 9,00 mm, bobot kalus sebesar 0,52 g, dan persentase kalus bertekstur remah sebesar 50%. Disarankan penelitian lebih lanjut untuk melihat perkembangan kalus pada tahap regenerasi menjadi planlet. Selain itu, subkultur sebaiknya segera dilakukan ketika kalus sudah mulai menunjukkan tanda atau perubahan warna menjadi kecoklatan memasuki fase penuaan dan daya regenerasinya menurun.

V. UCAPAN TERIMA KASIH

Kementerian Riset dan Teknologi/Badan Riset dan Inovasi Nasional dengan hibah SPK No. 1827/UN6.3.1/LT/2020 dan seluruh pihak yang telah membantu dan mendukung penelitian ini hingga selesai.

VI. REFERENSI

- Abbas, K. H., Al-Sallihy, A. A. M., & Inrahim, K. M. (2017). Contamination free callus cultures in strawberry (*Fragaria × ananassa* Dutch cv.). *International Journal of Chemtech Research*, 10(9), 633-640.
- Aranda-Peres, A. N., Peres L. E. P., Higashi E. N., & Martinelli A. P. (2009). Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea bromeliads* from the Brazilian Atlantic Forest: the importance of calcium. *HortScience*, 44 (1), 106-112.
- Ariani, R., Anggraito, Y. U., & Rahayu, E. S. (2016). Respons pembentukan kalus koro benguk (*Mucuna pruriens* L.) pada berbagai konsentrasi 2,4-D dan BAP. *Jurnal MIPA*, 39(1), 20-28.
- Badan Pusat Statistik. (2016). *Produksi Tanaman Buah-buahan 2016*. <https://www.bps.go.id/indicator/55/62/5/produksi-tanaman-buah-buahan.html>. Diakses tanggal 15 November 2021.

- Badan Pusat Statistik. (2020). *Produksi Tanaman Buah-buahan 2020*. <https://www.bps.go.id/indicator/55/62/1/produksi-tanaman-buah-buahan.html>. Diakses tanggal 15 November 2021.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van S. J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Pl Growth Regul* 63(2), 147-173.
- Bimantara, D. S., Maghfoer, M. D., Barunawati, N., Yenni, Y., & Siregar, A. S. 2018. Multiplikasi kultur meristem stroberi kultivar Earlibrite dengan penambahan konsentrasi hormon BAP dan kinetin. *Jurnal Produksi Tanaman*, 6(3), 432-437.
- Biswas, M., Islam R., & Hossian, M. (2007). Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 90, 40-45.
- Budiarto, R., Sigit S., & Kacung, H. (2015). Induksi kalus dan daya regenerasi *in vitro* berbagai umur kalus dan kultivar tebu Thailand (*Saccharum officinarum* L.). *Berkala Ilmiah Pertanian*.
- Chomboon, P., dan Pana, L. (2022). Mass propagation system of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) microshoots by liquid shake culture. *Current Applied Science and Technology*, 22(1), 1-12.
- Chung, H. H., dan Ouyang, H. Y. (2021). Use of thidiazuron for high-frequency callus induction and organogenesis of wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plants*, 10(1), 67.
- Comia-Yebron, R., Evalour, T. A., & Emmanuel, L. B. (2017). Callus induction in *Amaranthus tricolor* and *Amaranthus spinosus*. *Journal of ISSAAS (International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences)*, 23(1), 12-23.
- Coxon, K. M., Chakauya, E., Ottenhof, H. H., Whitney, H. M., Blundell, T. L., Abell, C., & Smith, A.G. (2005). Pantothenate biosynthesis in higher plants. *Biochemical Society Transactions*, 33(4), 743-746.
- Darmawati, I. P., Dwiyani, R. I. N. D. A. N. G., & Hestin, D. A. N. (2013). Induksi Kalus dengan 2,4-D pada Mikropropagasi Tanaman Stroberi (*Fragaria x ananassa* Duch cv. Rosalinda). *Agrotrop*, 3(2), 21-26.
- De Sousa, P. C. A., Silva e Souza, S. S., Nogueira, G. F., de Araújo Silva-Cardoso, I. M., & Scherwinski-Pereira J. E. (2022). Indirect somatic embryogenesis of *Piper hispidinervum* L. and evaluation of the regenerated plants by flow cytometry. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 1-14.
- Dewi, A., Darmawati, I. & Semarajaya, C. (2016). Inisiasi kalus embriogenik stroberi (*Fragaria* sp.) dengan pemberian IBA (indolebutyric acid) dan BAP (benzylaminopurine). *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika (Journal of Tropical Agroecotechnology)*, 5(3), 243-253.
- Dwiyani, R. (2015). *Kultur Jaringan Tanaman*. Pelawan Sari: Denpasar Barat.
- Fitriani, Y., Wijana, G., & Darmawati, I. A. P. (2019). Teknik sterilisasi dan efektivitas 2,4-D terhadap pembentukan kalus eksplan daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth) *in vitro*. *Journal of Agricultural Science and Biotechnology*, 8(1), 41-52.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. D. (2008). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In *Plant propagation by tissue culture*, 1, 115-173.

- Ghasemi, Y., Mashayekhi, K., Ghasemnezhad, A., & Movahedi, S. (2009). The effects of calcium and magnesium on carrot (*Daucus carota* cv. Nants) petiole somatic embryogenesis. *International Journal of Plant Production*, 3(4), 67-70.
- Howard, C. M. (1994). Strawberry plant named 'Sweet Charlie'. Washington, D.C.: The Office. May 17, 1994.
- Kawochar, M. A., Ahmed, N. U., Hossain, M. I., & Ferdois, J. (2017). Role of explants and NAA on callus induction of potato (*Solanum tuberosum*). *Am J Life Sci*, 5(5), 140-144.
- Khumaida, N., Ardie, S. W. & Nugroho, C. C. (2011). Kinetin and calcium pantothenate effects on shoot multiplication in in vitro cultured cassava var. Adira 2 and Adira 4. *Improving food, energy and environment with better crops. 7th Asian Crop Science Association Conference*, 141-146.
- Kumar, L., Kumar, S., Verma, R. S., Yadav, S., & Singh, V. (2022). Effect of plant growth regulators and mulches on growth and yield of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Chandler. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 11(1), 189-191.
- Latief, M. F., Karti, P. D. M. H., Prihantoro, I., & Pakan, F. P. (2018). Daya tumbuh kalus lamtoro varietas Tarramba hasil iradiasi sinar Gamma 40 gray yang toleran asam pada media 2,4-D. *Buletin Makanan Ternak*, 16(1), 36-46.
- Mahadi, I., Syafi'i, Y., & Sari. (2016). Induksi kalus jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*) menggunakan hormon 2,4-D dan BAP dengan metode *in vitro*. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 21(2), 84-89.
- Marlin, Yulian, dan Hermansyah. (2012). Inisiasi kalus embriogenik pada kultur jantung pisang dengan penambahan sukrosa, BAP dan 2,4-D. *Jurnal Agrivor*. 11(2), 275-283.
- Montoro, P., Etienne, H., & Carron, M. P. (1995). Effect of calcium on callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg.: relations with callus mineral nutrition, nitrogen metabolism and water parameters. *Journal of Experimental Botany*, 46(2), 255-261.
- Morel, G. & Muller J.-F. (1964). In vitro culture of the apical meristem of the potato. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, Paris 258, 5250-5252.
- Nisak, K., Nurhidayati, T. & Purwani, K. I. (2012). Pengaruh kombinasi konsentrasi ZPT NAA dan BAP pada kultur jaringan tembakau *Nicotiana tabacum* var. Prancak 95. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 1(1), 1-6.
- Nofrianinda, V., Yulianti, F. & Agustina, E. (2017). Pertumbuhan planlet stroberi (*Fragaria ananassa* D.) var. Dorit pada beberapa variasi media modifikasi *in vitro* di balai penelitian jeruk dan buah subtropika (BALITJESTRO). *Biotropic*, 1(1). 41-50.
- Nugroho, C. C. (2017). Induksi kalus embriogenik beberapa genotipe ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.). *Jurnal Magrobis*, 17(1), 1-15.
- Nurhidayati, T., Hamzah, A., & Islami, T. (2016). Penggunaan modifikasi media murashige and skoog dan penambahan naphthalene acetic acid pada perbanyakan kalus temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Fakultas Pertanian*, 4(2).
- Pierik, R. L. M. (1987). *In Vitro Culture of Higher Plant*. Netherland: Martinus Nijjhof Publisher.
- Prihatmanti, D., dan Nurhayati, A. M. (2004). Penggunaan zat pengatur tumbuh NAA (naphthaleine acetic acid) dan BAP (6-benzyl amino purine) serta air kelapa untuk

- menginduksi organogenesis tanaman anthurium (*Anthurium andraeanum* Linden Ex Andre). *Bul Agron.* 32(1), 20-25.
- Rahman, M. W., Zohora, S. A. D. I. A. T. U. Z., Talukder, M. A. I., & Kayess, M. O. (2015). Effect of different hormone combinations on callus induction and plant regeneration of strawberry. *International Journal of Advanced Research*, 3(6), 1244-1250.
- Rahmi, A.F., Purwito, A., Husni, A., & Dinarti, D. (2017). Embriogenesis dan desikasi embrio somatik Jeruk Keprok Batu 55 (*Citrus reticulata* Blanco.) untuk meningkatkan frekuensi perkecambahan. *Jurnal Hortikultura Indonesia*, 8(2), 79-87.
- Rasud, Y., dan Bustaman, B. (2020). Induksi kalus secara *in vitro* dari daun cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.) dalam media dengan berbagai konsentrasi auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25(1), 67-72.
- Santoso, U. dan F. Nursandi. (2004). *Kultur Jaringan Tanaman*, Malang: UMM Pers.
- Sari, M., dan Mayta, N.I. (2021). Respon daun *Tacca chantrieri* terhadap pembentukan kalus dengan berbagai konsentrasi 2,4-D dan BAP secara *in vitro*. *Jurnal Biologi UNAND*, 9(1), 8-17.
- Sukmadjaja, D. (2014). *Pengadaan Benih Tanaman Melalui Teknik Kultur Jaringan*. Bogor: Pusat Perpustakaan dan Penyebaran Teknologi Pertanian.
- Tabiyeh, D. T., F. Bernard, & H. Shacker. (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *ISHS Acta Hort*, 726, 201-204.
- Wahyuni, A., Satria, B., & Zainal, A. (2020). Induksi kalus gaharu dengan NAA dan BAP secara *in vitro*. *Agrosains: Jurnal Penelitian Agronomi*, 22(1), 39-44.
- Widyawati, G. (2010). Pengaruh Variasi Konsentrasi NAA dan BAP terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) (Doctoral dissertation, UNS (Universitas Sebelas Maret)).
- Wulandari, S., dan Syafi'i, W. (2004). Respon eksplan daun tanaman jeruk manis (*Citrus sinensis* L.) secara *in vitro* akibat pemberian NAA dan BA. *Biogenesis*, 1(01), 21-25.
- Yustiawan, B. B. (2007). Studi Teknologi Induksi Kalus dan Suspensi Sel Temu Putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe) pada Biakan *In Vitro*. (Doctoral dissertation, Universitas Brawijaya).