

PROPAGASI *IN VITRO* KALIANDRA MERAH (*Calliandra calothyrsus* Meisn.) I: PERKECAMBAHAN BIJI DAN INISIASI TUNAS DARI EKSPLAN HIPOKOTIL DAN NODUS

Muhammad Idris¹, Auzia Asman², Deni Sorel³, Edi Joniarti⁴, Ulfa Mohtar⁵, Harmailis⁶, John Nefri⁷, dan Salivia⁸

¹Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas
^{2,3}Budidaya Tanaman, Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh
^{4,6}Rekayasa Pertanian dan Komputer, Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh
^{5,8}Peternakan dan Kesehatan Hewan, Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh
⁷Bisnis Pertanian, Politeknik Pertanian Negeri Payakumbuh

Email: ¹midris@sci.unand.ac.id, ²auzia.asman@politanipyk.ac.id,
³deni.sorel@politanipyk.ac.id, ⁴idedatuk@hotmail.com, ⁵ulvamohhtar@gmail.com,
⁶harmailis_chaniago@yahoo.com, ⁷johnnefri@gmail.com, dan ⁸salviasani@ymail.com

ABSTRACT

The red calliandra is a fuel wood crops that gave benefit for people. Recently, it is getting wide attention due to its important use as biofuel in industrial scale. The massive propagation is needed to meet industrial needs. Beside the use of conventional seedling production technique, the use of tissue culture for mass propagation is one of the alternatives to address this problem. This research was conducted to develop standard protocol for micropropagation of red calliandra through tissue culture. Here, the first step for that purpose was reported. The MS medium was used for basal media treatment. The seed source was stored for eight months under 5°C. This research was carried out in two stages *i.e.* 1) seed germination test and 2) shoot initiation and multiplication treatment. Each stage was arranged in experimental method. The result showed that seed were pre-treated with warm water (40°C) gave 62.5% germination under red light when compared to control (37.5%, pre-treated with water at 25°C under white light) three days after planting. Conversely, there is no striking differences of germinated seed percentages between light treatment at 25°C. Furthermore, it was found that addition of 2 mg/L BAP gave better result in shoot initiation and number of shoots formed from nodal explants after four weeks in treatment media. These results indicated that mass propagation of red calliandra can be done through tissue culture where multiplication stage is one of the important steps to produce multiple shoots only from single nodal explant.

ARTICLE HISTORY

Received 6 November 2023
Revised 16 March 2024
Accepted 1 April 2024

KEYWORDS

Biofuel,
Calliandra,
Micropropagation,
Seed Germination,
Shoot Multiplication,

*CORRESPONDING AUTHOR. Email: midris@sci.unand.ac.id

Pendahuluan

Kaliandra merah (*Calliandra calothyrsus* Meisn.) adalah tanaman perdu (semak berbunga) yang termasuk kedalam keluarga kacang-kacangan (Leguminosae, Fabaceae). Tumbuhan ini memiliki tinggi batang mencapai 4-6 m dan jika kondisi lingkungan mendukung bisa tumbuh mencapai 12 m. Berdasarkan informasi dari literatur, tumbuhan ini berasal dari Amerika Tengah, Meksiko, dan pertama kali diperkenalkan ke wilayah Indonesia pada masa kolonial Belanda tahun 1930an. Kaliandra merah pertama kali ditanam di Indonesia dengan tujuan untuk digunakan sebagai tanaman pelindung pada perkebunan kopi. Selain itu, kaliandra merah dimanfaatkan juga sebagai sumber kayu bakar, reklamasi lahan, pupuk hijau, hijauan ternak, pakan lebah dan untuk bubur kayu (Suliasih, 1985; Stewart *et al.*, 2001). Saat ini, kaliandra merah menjadi tren sebagai sumber biofuel terutama untuk industri, sehingga penggiatan penanaman kaliandra merah oleh Masyarakat menjadi tinggi untuk memenuhi kebutuhan industri. Kayu tumbuhan ini banyak digunakan sebagai sumber bahan baku energi baru terbarukan (EBT) untuk pembangkit listrik dan kebutuhan industri lainnya. Kaliandra merah digadangkan sebagai EBT biomassa yang ramah lingkungan (Ismail & Purwanto, 2014; Lumakto, 2018).

Penyediaan bibit kaliandra untuk tujuan diatas sangat penting dilakukan agar perwujudan kaliandra merah sebagai sumber EBT bisa tercapai. Anakan kaliandra merah umumnya diproduksi melalui pembibitan dengan sumber bahan utama berupa biji yang bisa ditemui sepanjang tahun terutama pada bulan Januari - April, puncak masa berbunga kaliandra merah di Indonesia (Chamberlain, 2000; Stewart *et al.*, 2001). Namun, akibat adanya perubahan iklim yang drastis dan efek berkelanjutan dari pemanasan global, menyebabkan terjadinya pergeseran dalam puncak pembungaan pada kaliandra merah sehingga untuk mendapatkan benih pun terjadi kendala (Tun *et al.*, 2021; Ismail *et al.*, 2022). Salah satu upaya mengatasi ketergantungan akan penyediaan benih melalui biji untuk pembibitan adalah melalui kultur jaringan yang dikenal sebagai teknik propagasi *in vitro* (mikropropagasi). Teknik ini merupakan cara yang lebih efektif dan efisien dalam memproduksi bibit untuk kepentingan komersial secara lebih cepat dan seragam. Melalui teknik ini, eksplan, bagian tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai sumber perbanyakan, dapat dimanfaatkan dari biji yang berkecambah. Bagian kecambah berupa hipokotil, kotiledon, nodus, pucuk dan daun dapat dimanfaatkan dalam propagasi massal bibit yang seragam (Park, 2021).

Pada teknik kultur jaringan, media kultur berperan penting dalam penyediaan nutrisi yang dibutuhkan oleh eksplan pada masa pertumbuhannya. Media umum yang dipakai untuk perbanyakan tumbuhan secara *in vitro* adalah media dasar Murashige & Skoog (MS) yang kaya akan nutrisi pendukung pertumbuhan eksplan (George & De Klerk, 2008). Selain itu, untuk tujuan tertentu, misalnya untuk inisiasi dan multiplikasi tunas, perakaran tunas, atau penginduksian kalus, penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) berperan penting dalam penentuan arah pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang dikultur (Kieber & Schaller, 2014). Pada tahap inisiasi dan multiplikasi tunas, keterlibatan ZPT golongan sitokinin sangat penting dalam memacu inisiasi dan perbanyakan tunas pada eksplan yang ditanamkan secara *in vitro*. Sitokinin yang umum dipakai dalam kultur jaringan adalah 6-benzilaminopurine (BAP). Penambahan konsentrasi BAP pada media tanam disesuaikan dengan jenis tumbuhan dan tipe organ yang dipakai, umumnya berkisar dibawah 10 mg/L (Neumann, Kumar & Imani, 2009; Goldbio, 2019). Pada tumbuhan tembakau, BAP digunakan dengan konsentrasi 0,5 mg/L untuk inisiasi dan multiplikasi tunas sedangkan pada tumbuhan stevia konsentrasi BAP 0,5-4 mg/L digunakan untuk inisiasi dan multiplikasi tunas dimana 2 mg/L merupakan konsentrasi terbaik (Hussain *et al.*, 2012). Penelitian yang dilakukan oleh Tyub *et al.* (2021), mendapatkan bahwa penggunaan 4-5 μ M BAP (1 mg/L setara dengan 4.4 μ M) mampu menginisiasi dan

memultiplikasi tunas lebih baik pada *Echinacea angustifolia*. Pada inisiasi tunas alpukat, digunakan BAP pada rentang 0,5-2 mg/L (Hiti-Bandaralage, Hayward & Mitter, 2017). Putri *et al.* (2022), menambahkan 4 μ M BAP dalam inisiasi tunas *Aquilaria malaccensis*. BAP Tunggal terbukti lebih efektif dalam menginisiasi dan memultiplikasi tunas secara *in vitro*.

Pada penelitian ini, biji kaliandra merah yang dikoleksi terlebih dahulu disimpan pada kondisi dingin (pada suhu 5°C) untuk tujuan evaluasi apakah biji yang disimpan lama dalam kondisi dingin masih memiliki tingkat perkecambahan yang tinggi. Kecambah kemudian digunakan untuk sumber eksplan dalam propagasi *in vitro* kaliandra merah untuk pengembangan protokol baku dalam produksi massal bibit kaliandra merah yang seragam. Pada artikel ini dilaporkan dua tahapan awal dari mikropropagasi kaliandra merah yaitu (1) uji perkecambahan biji secara *in vitro* dalam penyediaan sumber eksplan, dan (2) inisiasi dan multiplikasi tunas kaliandra merah secara *in vitro* dengan melibatkan penggunaan ZPT berupa BAP. Media dasar yang dipakai adalah media dasar MS.

Metode

Material tanaman

Pada penelitian ini, biji kaliandra merah didapatkan dari daerah Yogyakarta. Biji disimpan pada kondisi suhu rendah (5°C) selama delapan bulan sebelum dimanfaatkan sebagai sumber eksplan. Penyimpanan biji bertujuan untuk mengevaluasi viabilitas biji jika disimpan dalam waktu yang cukup panjang pada kondisi dingin.

Alat dan bahan

Alat yang diperlukan untuk kultur jaringan seperti set alat menanam (pinset, scalpel dan mata pisau), lampu spiritus, laminar airflow cabinet (L AFC) yang dilengkapi dengan lampu UV, set peralatan pembuatan media tanam (gelas ukur, gelas piala, magnetic stirrer dan hot plate), autoclave, dan peralatan pendukung lainnya. Bahan yang diperlukan meliputi media dasar MS (*Murashige & Skoog basal medium with vitamins, Phyto Technology Laboratories, USA*), alkohol 70%, alkohol 96%, sodium hipoklorit komersial (5,25% NaClO, *Bayclin, PT. Johnson Home Hygiene, Product, Indonesia*), stok BAP 100 mg/L, dan aquadest.

Sterilisasi sampel biji

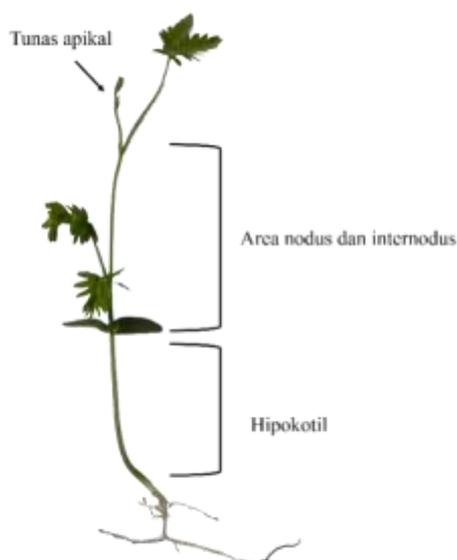
Setelah diberi pra-perlakuan menggunakan perbedaan suhu imbibisi (25 dan 40°C), biji kaliandra merah disterilisasi di L AFC dengan urutan sebagai berikut; 2 menit pada alkohol 70%, 8 menit pada sodium hipoklorit komersial yang diencerkan menjadi 30%. Biji kemudian dicuci menggunakan aquadest steril sebanyak 3-5 kali. Biji yang telah disteril kemudian dikeringkan dan disimpan pada petridisk.

Desain eksperimen

Pada penelitian ini, dua tahapan eksperimen dilakukan yaitu uji perkecambahan dan inisiasi serta multiplikasi tunas. Uraian tahapan eksperimen dijelaskan sebagai berikut:

- 1) Uji perkecambahan biji yang disimpan lama. Pada tahap ini, biji yang disimpan selama delapan bulan pada suhu 5°C diimbibisi menggunakan dua pra-perlakuan suhu yaitu 25 dan 40°C selama 60 menit. Biji kemudian disterilisasi seperti yang dijelaskan diatas dan ditanam pada media MS. Botol berisi biji kemudian ditempatkan pada tiga perlakuan Cahaya yaitu cahaya putih, cahaya merah dan dalam kondisi gelap sampai dilakukan pengamatan pada hari ke-3 setelah penanaman.

- 2) Perlakuan inisiasi dan multiplikasi tunas. Pada tahap ini, eksplan berupa hipokotil dan nodus ditanam pada media MS yang diperkaya dengan BAP pada rentang 0-4 mg/L untuk menginisiasi sekaligus memultiplikasi tunas. Eksplan diperoleh dari perkecambahan yang dilakukan pada tahap 1, dimana dalam satu kecambah didapatkan 4 potongan hipokotil dan 3 potongan nodus dengan ukuran yang proporsional. Umur kecambah yang digunakan adalah sekitar 2 minggu setelah perkecambahan seperti ditampilkan pada Gambar 1. Satu botol media perlakuan berisi 4 potongan hipokotil atau 3 potongan nodus. Botol berisi eksplan kemudian dipelihara pada ruang kultur dengan suhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperiodisme 12 jam terang/12 jam gelap dengan intensitas pencahayaan sekitar 2000 lux. Pemeliharaan dilakukan pada minggu ke-1 setelah penanaman untuk melihat respon eksplan terhadap media perlakuan dan pada minggu ke-4 untuk melihat tingkat keberhasilan multiplikasi tunas.



Gambar 1. Kecambah kaliandra merah berumur dua minggu pada media MS yang dijadikan sebagai sumber eksplan untuk inisiasi tunas.

Pengamatan dan analisis data

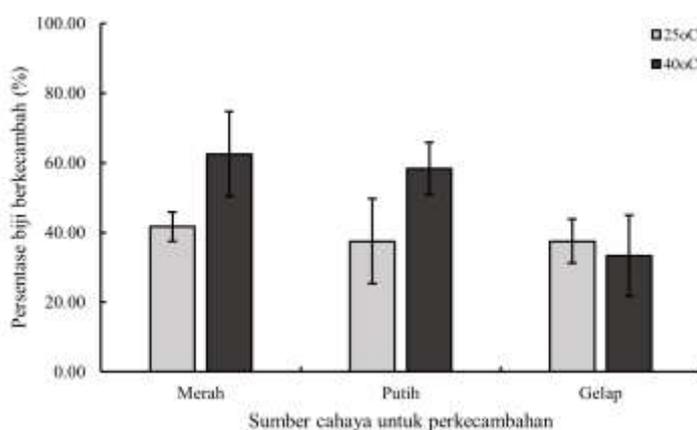
Parameter yang diamati pada penelitian ini untuk setiap tahap meliputi; 1) persentase biji berkecambah dan morfologi kecambah pada uji perkecambahan, 2) morfologi eksplan, respon pembentukan tunas setelah satu minggu perlakuan, jumlah tunas dan morfologi tunas setelah empat minggu perlakuan pada inisiasi dan multiplikasi tunas. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan statistika berupa rata-rata dan SE diterapkan untuk melihat perbedaan respon antar perlakuan.

Hasil

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan, memperlihatkan bahwa perkecambahan dan pertumbuhan kaliandra merah yang berasal dari biji yang telah disimpan selama lebih dari delapan bulan pada kondisi dingin mengalami penurunan tingkat perkecambahan. Kemudian penggunaan eksplan dari kecambah memiliki potensi yang besar dalam produksi massal bibit kaliandra merah kedepannya melalui teknik kultur jaringan. Uraian dari hasil penelitian dijelaskan sebagai berikut.

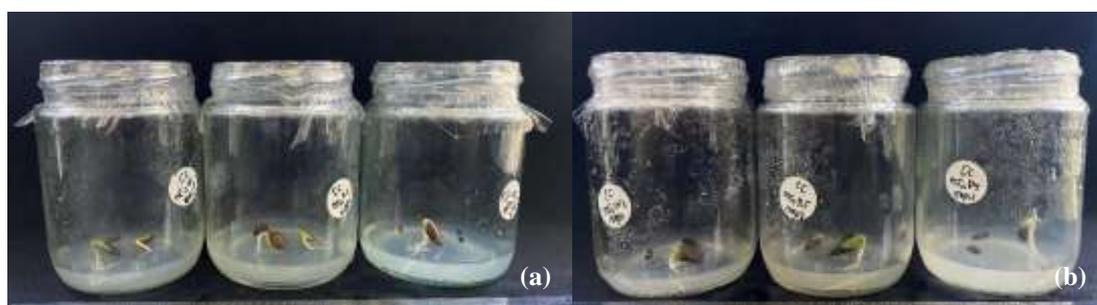
Uji perkecambahan biji kaliandra yang disimpan pada suhu rendah

Berdasarkan pengujian perkecambahan yang dilakukan dengan melibatkan pra perlakuan suhu perendaman serta perkecambahan pada beberapa sumber cahaya, didapatkan hasil seperti ditampilkan pada Gambar 2 berikut. Pada gambar terlihat bahwa tingkat perkecambahan biji yang disimpan lama dengan pra perlakuan suhu 40°C memiliki jumlah biji berkecambah lebih tinggi dibandingkan dengan pra perlakuan suhu 25°C. Selain itu, dengan perlakuan cahaya terlihat bahwa biji yang dikecambahkan pada kondisi cahaya merah memiliki tingkat keberhasilan perkecambahan lebih tinggi bila dibandingkan dengan cahaya putih atau dikecambahkan dalam kondisi gelap.



Gambar 2. Perkecambahan biji kaliandra setelah pra-perlakuan suhu 25 dan 40°C yang dikecambahkan pada tiga kondisi cahaya. Total biji yang dikecambahkan per perlakuan adalah 24 biji. Data merupakan rata-rata \pm SE.

Secara umum, biji kaliandra berkecambah dengan normal pada ketiga perlakuan cahaya baik yang diberi pra-perlakuan suhu 25 maupun 40°C. Namun, jumlah biji yang berkecambah terlihat lebih tinggi pada suhu 45°C bila dibandingkan dengan suhu 25°C seperti diuraikan diatas. Gambar 3 memperlihatkan morfologi kecambah dari biji yang berkecambah pada media MS setelah biji diismpn selama lebih dari delapan bulan.



Gambar 3. Biji kaliandra yang dikecambahkan pada media MS dimana pra perlakuan perendaman dilakukan pada suhu (a) 40°C dan (b) 25°C. Masing-masing botol

mewakili perlakuan cahaya merah (R), putih (W) dan gelap (D) secara berurutan dari kiri ke kanan.

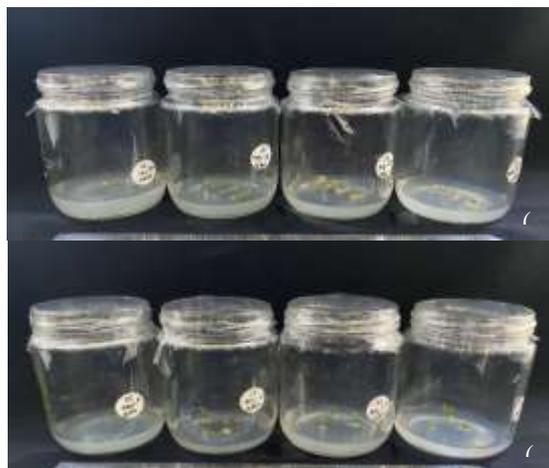
Inisiasi dan multiplikasi tunas dari potongan hipokotil dan nodus

Tabel 1 memperlihatkan hasil pengamatan terhadap respon eksplan nodus dan hipokotil terhadap penambahan BAP (0-4 mg/L) pada media MS setelah satu minggu perlakuan. Pada Tabel 1, dengan memanfaatkan jaringan eksplan muda dari kecambah berumur dua minggu, respon awal yang diberikan oleh eksplan hipokotil adalah pemuluran dan pembengkakan. Pembengkakan terutama terjadi pada pemberian BAP, sedangkan tanpa BAP tidak terlihat respon yang jelas. Pembengkakan mengindikasikan adanya pembentukan kalus. Sebaliknya, pada penggunaan nodus sebagai sumber eksplan, terlihat bahwa satu minggu setelah perlakuan, area nodus telah memperlihatkan pertumbuhan tunas baru dengan ukuran yang masih kecil terutama dengan pemberian BAP. BAP menginisiasi pembentukan tunas-tunas baru diarea meristematik terutama diketiak daun (area nodus). Hasil ini mengindikasikan bahwa potongan jaringan yang digunakan sebagai eksplan merespon BAP yang terkandung pada media dengan mulai terbentuk massa sel berupa kalus (hipokotil) dan tunas baru yang muncul (nodus).

Tabel 1. Respon potongan eksplan hipokotil dan nodus kaliandra merah pada media inisiasi tunas satu minggu sesudah perlakuan.

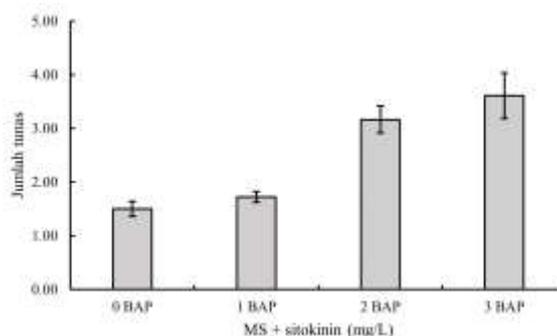
Perlakuan	Jenis eksplan			
	Hipokotil	Nodus		
	Bentuk respon	Persentase respon (%)	Bentuk respon	Persentase pembentukan tunas (%)
MS	tidak memperlihatkan respon	0	ada terlihat tunas baru muncul	33.33
MS + 1 mg/L BAP	pembengkakan (kalus)	83.33	terlihat tunas baru muncul	83.33
MS + 2 mg/L BAP	pemuluran dan pembengkakan (kalus)	66.67	terlihat tunas baru muncul	100
MS + 3 mg/L BAP	pemuluran dan pembengkakan (kalus)	83.33	terlihat tunas baru muncul	100

Pengamatan morfologi yang dilakukan terhadap respon eksplan hipokotil dan nodus pada media perlakuan BAP ditampilkan pada Gambar 4 berikut. Pada gambar terlihat bahwa peluang dihasilkannya tunas-tunas baru lebih besar dengan penambahan BAP pada media, dan terlihat BAP konsentrasi 3 mg/L sepertinya sudah maksimal dalam penginisiasian tunas dari eksplan nodus, sedangkan eksplan hipokotil masih dalam tahapan awal, hanya berupa kalus. Diharapkan dengan pemberian BAP tunggal mampu mempercepat peningkatan jumlah tunas yang dihasilkan per eksplan sehingga mampu mencapai tujuan dalam produksi massal bibit yang seragam.

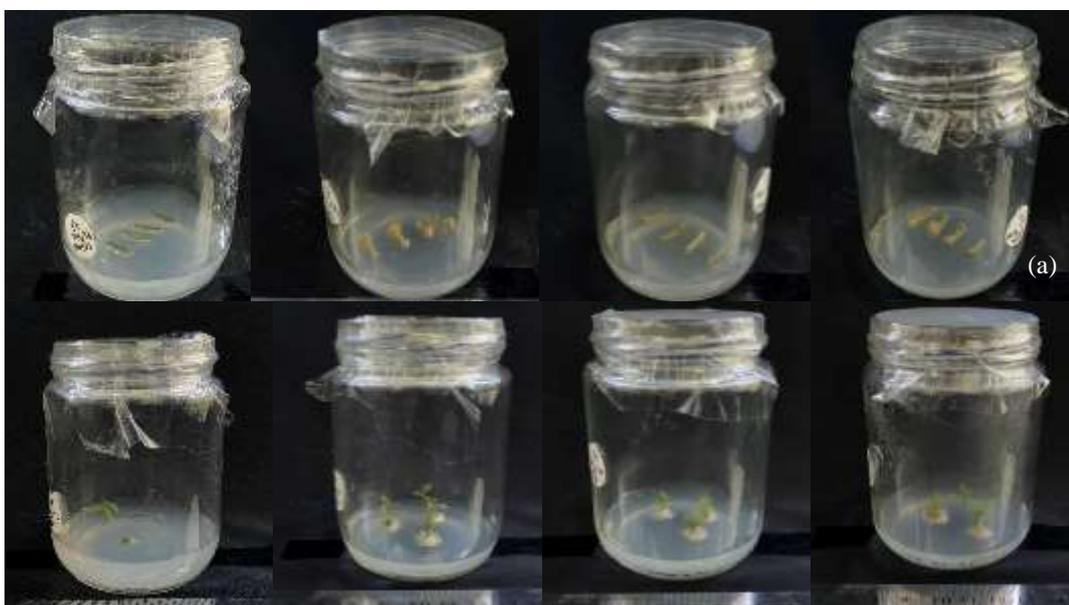


Gambar 4. Penampakan morfologi dari eksplan kaliandra merah pada media MS dengan penambahan BAP dalam inisiasi tunas satu minggu setelah disubkultur pada media perlakuan: (a) eksplan hipokotil pada media perlakuan dan (b) eksplan nodus pada media perlakuan. Masing-masing gambar dari kiri ke kanan mewakili MS, MS + 1 mg/L BAP, MS + 2 mg/L BAP dan MS + 3 mg/L BAP.

Pengamatan yang dilakukan setelah 4 minggu perlakuan pada media MS dengan penambahan BAP memperlihatkan peningkatan respon dalam inisiasi dan multiplikasi tunas pada eksplan nodus. Hasil perhitungan terhadap jumlah tunas yang dihasilkan pada perlakuan media MS dengan penambahan BAP disajikan pada Gambar 5 berikut. Pada gambar terlihat bahwa peningkatan konsentrasi BAP pada media meningkatkan jumlah tunas yang dihasilkan per nodus. Pada media MS tanpa BAP, jumlah tunas yang dihasilkan per nodus lebih rendah namun setara dengan perlakuan penambahan 1 mg/L BAP. Pada peningkatan konsentrasi BAP menjadi 2 dan 3 mg/L, terlihat bahwa jumlah tunas yang dihasilkan lebih banyak (150-200%) bila dibandingkan dengan perlakuan MS tanpa dan dengan 1 mg/L BAP. Peningkatan jumlah tunas yang dihasilkan antara perlakuan 2 mg/L BAP hampir setara dengan perlakuan 3 mg/L BAP yang mengindikasikan bahwa konsentrasi 3 mg/L BAP telah menjadi konsentrasi maksimal yang cocok dipakai dalam inisiasi dan multiplikasi tunas kaliandra merah dari eksplan nodus.



Gambar 5. Rata-rata jumlah tunas per eksplan nodus kaliandra merah pada media perlakuan perlakuan MS dengan penambahan BAP untuk inisiasi dan multiplikasi tunas setelah 4 minggu penanaman. Total eksplan yang dikultur per perlakuan adalah 18 nodus. Data merupakan rata-rata \pm SE.



Gambar 6. Penampakan morfologi (a) kalus dan (b) tunas yang dihasilkan pada perlakuan media MS dengan penambahan BAP setelah 4 minggu pada perlakuan. Masing-masing gambar dari kiri ke kanan mewakili MS, MS + 1 mg/L BAP, MS + 2 mg/L BAP dan MS + 3 mg/L BAP.

Pengamatan morfologis yang dilakukan terhadap eksplan hipokotil dan nodus kaliandra merah 4 minggu setelah perlakuan disajikan pada Gambar 6. Pada gambar terlihat bahwa untuk eksplan hipokotil, respon pemuluran, pembengkakan dan pembentukan kalus terlihat jelas namun belum ada tanda-tanda terbentuknya tunas baru, perubahan warna kalus menjadi kehijauan tidak teramati. Kalus terlihat mengalami perubahan warna dari kekuningan (Gambar 4a) menjadi kecoklatan (Gambar 6a) setelah 4 minggu. Pada eksplan nodus, terlihat peningkatan jumlah dan ukuran tunas (perlakuan 2 dan 3 mg/L BAP) yang diikuti dengan pembentukan kalus pada dasar potongan eksplan nodus sebagai respon terhadap BAP pada 4 minggu setelah perlakuan (Gambar 6b). Pada gambar juga terlihat tunas yang terbentuk dalam gerombolan yang mengindikasikan peran BAP dalam menginisiasi dan memultiplikasi tunas pada nodus dapat diamati dengan jelas.

Efek media dasar MS pada pertumbuhan tunas

Pada eksperimen yang telah dilakukan juga teramati adanya proses pengguguran daun oleh tunas yang ditumbuhkan pada media MS secara *in vitro*. Pada Gambar 7 ditampilkan fotografi beberapa tunas yang telah tumbuh dengan baik pada media MS setelah 4 dan 8 minggu subkultur. Planlet (tunas berakar) telah berhasil diproduksi 4 minggu setelah subkultur pada media MS (Gambar 7a). Pada Gambar 7b teramati adanya proses pengguguran daun pada planlet setelah ditumbuhkan 8 minggu pada media MS. Planlet terlihat mulai memperlihatkan daun yang mengalami penguningan sebelum gugur yang mengindikasikan adanya kekurangan nutrisi pada media tanam.



Gambar 7. Pertumbuhan tunas kaliandra pada media MS selama 4-8 minggu setelah perlakuan. Tunas yang digunakan berasal dari tunas apikal kecambah kaliandra yang kemudian disubkultur pada media MS untuk uji pertumbuhan: (a) tunas yang ditumbuhkan berumur 4 minggu setelah sub-kultur dan (b) tunas berumur 8 minggu setelah subkultur yang memperlihatkan adanya proses pengguguran daun.

Diskusi

Efek cahaya dalam perkecambahan

Biji kaliandra disimpan selama 8 bulan pada suhu rendah dengan tujuan untuk mengevaluasi viabilitas biji dalam berkecambah akibat penyimpanan lama pada suhu rendah. Suhu rendah dipakai sebagai metode penyimpanan karena dapat menurunkan aktifitas enzimatis tanpa mengurangi kemampuan berkecambah seperti halnya dilakukan pada biji padi di laboratorium penyimpanan biji internasional (International Rice Research Institut, 2013) ataupun di beberapa laboratorium diluar negeri seperti Jepang yang menggunakan biji sebagai sumber utama untuk perlakuan penelitian. Suhu penyimpanan yang dipakai adalah sekitar 5°C (Katta *et al.*, 2019). Tujuan dilakukan pengujian perkecambahan setelah penyimpanan ini adalah agar stok biji yang dikoleksi bisa disimpan lebih lama sehingga bisa dipakai sewaktu dibutuhkan tanpa melakukan pengkoleksian lagi di lapangan. Selain itu, biji yang disimpan juga dapat digunakan sebagai sumber eksplan dalam produksi massal bibit melalui teknik *in vitro* sewaktu-waktu.

Berdasarkan uji perkecambahan yang telah dilakukan (Gambar 2), hasil yang didapatkan mengindikasikan bahwa adanya keterlibatan cahaya dalam proses inisiasi perkecambahan pada biji kaliandra merah. Bila dibandingkan dengan kondisi gelap, biji kaliandra lebih banyak berkecambah pada kondisi paparan cahaya terutama cahaya merah. Secara umum, cahaya merah terlibat dalam perkecambahan biji dan mampu mempercepat perkecambahan akibat aktifitas fotoreseptor cahaya merah yaitu fitokrom. Pada protokol perkecambahan biji padi untuk mengamati respon kecambah padi terhadap cahaya gelombang pendek (280-500 nm), Idris *et al.* (2021), mengecambahkan biji padi pada cahaya merah untuk mempercepat perkecambahan sekaligus mengurangi efek cahaya putih yang mengandung cahaya biru yang mampu mempengaruhi pertumbuhan kecambah. Selain itu, berdasarkan pengamatan terhadap kecambah kaliandra merah, terlihat bahwa biji kaliandra merah dapat digolongkan sebagai biji fotoblastik positif berdasarkan jumlah biji yang berkecambah dibawah

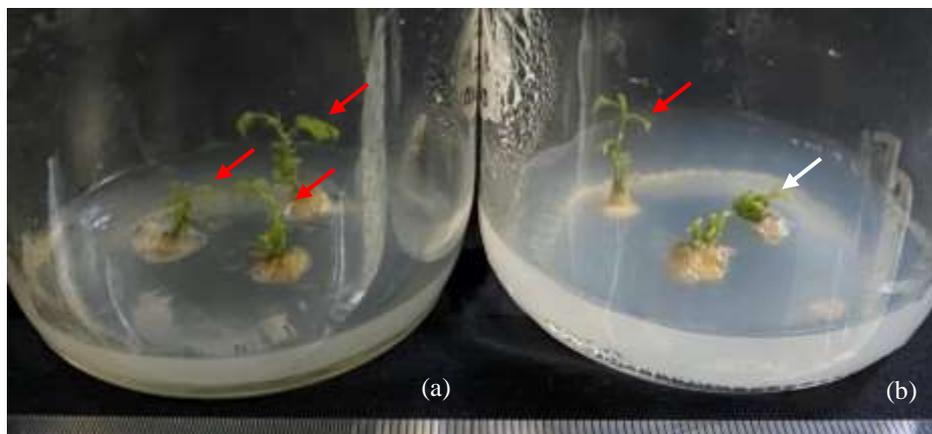
cahaya lebih banyak dibandingkan pada gelap. Namun, keberadaan biji yang berkecambah dalam kondisi gelap mengindikasikan bahwa biji kaliandra merah juga tergolong fotoblastik negatif. Menurut E Silveira, Fernandes & Fernandes (2005), biji *Calliandra fasciculata* mampu berkecambah baik dalam kondisi gelap maupun terang namun lebih dipengaruhi oleh perbedaan suhu pada awal perlakuan dimana suhu diatas 25°C mampu memacu perkecambahan biji lebih baik dibandingkan suhu 15°C. Umumnya biji fabaceae berkecambah baik dalam kondisi fotoperiodisme gelap/terang, selain itu kondisi gelap juga mendukung perkecambahan jenis fabaceae hasil koleksi di India bagian utara (Jayasuriya & Phartyal, 2023)

Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, secara umum persentase biji yang berkecambah lebih rendah bila dibandingkan dengan percobaan yang dilakukan oleh tim dari Politeknik Negeri Pertanian Payakumbuh dimana biji yang diberi perlakuan perendaman dengan air hangat memiliki tingkat perkecambahan lebih dari 90%, sedangkan pada penelitian ini sebagai akibat penyimpanan selama 8 bulan terjadi penurunan kemampuan berkecambah biji menjadi sekitar 60%. Hal ini mengindikasikan penyimpanan menyebabkan penurunan viabilitas biji. Liu *et al.* (2011), menguji perkecambahan 489 spesies tumbuhan di dataran tinggi Tibet dimana penyimpanan (suhu tinggi maupun rendah) menurunkan persentase biji yang berkecambah setelah penyimpanan. Penelitian yang dilakukan oleh Wawrzyniak, Michalak & Chmielarz (2020) mendapatkan bahwa proses penyimpanan biji (dalam suhu rendah maupun desikasi) memberikan efek yang signifikan terhadap jumlah biji yang berkecambah terutama menurunkan perkecambahan namun tidak mempengaruhi pertumbuhan kecambah terhadap beberapa tumbuhan buah-buahan Eropa. Xing *et al.* (2020), melakukan uji perkecambahan terhadap biji buah naga yang disimpan pada suhu dingin dimana persentase perkecambahan juga menurun setelah penyimpanan. Metode penyimpanan yang lebih tepat diperlukan untuk mempertahankan stok biji kaliandra merah yang akan digunakan sebagai sumber untuk penyediaan bibit baik secara konvensional maupun melalui teknik kultur jaringan.

Sitokinin dan multiplikasi tunas dalam kultur jaringan

Secara umum, eksplan hipokotil dan nodus banyak digunakan dalam multiplikasi tunas untuk tujuan propagasi massal secara *in vitro*. Selain dua eksplan diatas, kotiledon juga dapat digunakan sebagai sumber eksplan. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, hipokotil lebih mengarah kepada pembentukan tunas secara tidak langsung dimana pada awal respon terhadap media mengandung BAP adalah pembentukan kalus yang nantinya kalus akan berkembang membentuk tunas-tunas baru. Berlawanan dengan eksplan nodus, pada eksplan ini tunas dapat dihasilkan secara langsung dari area ketiak daun yang memiliki jaringan meristematik yang aktif membelah. Adanya BAP pada media memberikan pengaruh besar dalam proses multiplikasi tunas. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, pemberian 2 mg/L BAP memberikan efek yang tidak jauh berbeda dalam jumlah tunas yang dihasilkan (Gambar 5) namun morfologi tunas yang dihasilkan terlihat lebih besar pada perlakuan 2 mg/L BAP bila dibandingkan dengan 3 mg/L BAP (Gambar 8). Penambahan BAP pada media mempercepat proses pembelahan dan pembentukan tunas baru pada nodus, yang terlihat dari semakin banyaknya tunas terbentuk dengan peningkatan konsentrasi BAP (adanya gerombolan tunas pada nodus pada perlakuan 3 mg/L BAP (Gambar 8b). Joseph, Siril & Nair (2011) menggunakan eksplan nodus dalam tahapan perbanyak tunas dari tumbuhan *Bixa orellana* dimana satu nodus mampu menghasilkan 10,66 tunas baru pada pemberian konsentrasi 5 µM BAP. Shekhawat *et al.* (2015), menyatakan bahwa penambahan 2 mg/L BAP mampu memultiplikasi tunas sebanyak 6,33 dari potongan nodus tumbuhan *Passiflora foetida*. Shaheen *et al.* (2020), menggunakan nodus sebagai eksplan dalam multiplikasi tunas dimana 5,7 tunas

dihasilkan pada media yang mengandung 2 mg/L BAP. BAP sebagai hormon sintetik sitokinin memberikan hasil yang menjanjikan dalam multiplikasi tunas pada nodus kaliandra merah.



Gambar 8. Efek penggunaan BAP pada konsentrasi (a) 2 mg/L dan (b) 3 mg/L terhadap morfologi tunas hasil multiplikasi pada eksplan nodus kaliandra merah setelah 4 minggu setelah perlakuan. Panah merah mengindikasikan tunas yang berukuran besar dan panah putih mengindikasikan tunas yang dihasilkan dalam bentuk gerombolan.

Media kultur dalam pertumbuhan tunas

Pada penelitian ini, media dasar MS digunakan sebagai media utama dalam mendukung perkecambahan dan pertumbuhan kecambah kaliandra merah. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan pada perkecambahan, inisiasi dan multiplikasi tunas, media MS mampu mendukung kebutuhan nutrisi yang diperlukan oleh eksplan untuk tumbuh dan menginisiasi pembentukan tunas baru dengan dukungan BAP yang ditambahkan pada media. Ketika tunas kaliandra merah dipelihara pada media MS selama lebih dari 4 minggu pada tahap pertumbuhan tunas, terlihat bahwa terjadi pengguguran daun dimana beberapa daun majemuk terlihat menguning dan jatuh ke permukaan media. Hal ini mengindikasikan bahwa kandungan nutrisi pada media terutama nitrogen menjadi sangat rendah karena telah diserap oleh tunas yang ditumbuhkan pada media. Dengan pengurangan nitrogen yang signifikan pada media, menyebabkan mobilisasi nitrogen pada daun tua ke daun muda, sehingga daun tua menguning dan akhirnya gugur. Media MS merupakan media dengan kandungan nutrisi yang tinggi terutama nitrogen dan telah umum digunakan dalam kultur jaringan tanaman kacang-kacangan selain media Gamborg atau B5 (Greenway *et al.*, 2012; Mitrofanova *et al.*, 2020; Gantait & Mukherjee, 2021). Pemilihan media MS sudah tepat namun dibutuhkan masa subkultur dari satu media ke media berikutnya dalam rentang waktu yang cukup pendek. Selain itu penggunaan media dasar B5 dapat dijadikan sebagai media alternatif yang dapat dicobakan dalam kultur *in vitro* kaliandra merah.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan diperoleh kesimpulan bahwa; (a) pra perlakuan dengan perendaman biji pada suhu 40°C memberikan hasil perkecambahan yang lebih baik dibawah cahaya merah yaitu 62,5%, (b) penambahan 2 mg/L BAP pada media MS memberikan hasil yang lebih baik terhadap performa tunas dan jumlah tunas yang dihasilkan setara dengan pemberian 3 mg/L BAP pada eksplan nodus, dan (c) hipokotil tidak disarankan sebagai sumber eksplan dalam produksi massal bibit kaliandra merah untuk multiplikasi tunas.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Akademik Pendidikan Tinggi Vokasi, Direktorat Jenderal Pendidikan Vokasi, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi melalui Program Pendanaan Matching Fund dan Hilirisasi Produk Penelitian Terapan tahun 2023, dengan kontrak nomor 152/PKS/D.D4/PPK.01.APTV/V/2023 dan 2737/PL25/KS/2023. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada PT. Semen Padang yang ikut mendanai kegiatan ini sebagai mitra pada Program Pendanaan Matching Fund dengan nomor kontrak 000120/HK.03.02/PJJ/50003897/3000/03.2023 dan 1594/PL25/KS/2023. Selain itu, penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Fani Fatmawati Parma, Ghinaa Zahrah, Nada Maiza Arpita, Okta Septiani Putri, Stia Prihatiningsih Idris, dan Zikra Laretta Putri atas bantuan yang diberikan selama penelitian berlangsung.

Referensi

- Chamberlain JR. 2000. Improving seed production in *Calliandra calothyrsus*, A field manual for researchers and extension workers. United Kingdom (UK): Oxford Forest Institute Oxford.
- E Silveira FAO, Fernandes F, Fernandes GW. 2005. Light and temperature influence on seed germination of *Calliandra fasciculata* Benth. (Leguminosae). Lundiana 6: 95-97.
- Gantait S, Mukherjee E. 2021. Tissue culture-based genetic improvement of fava bean (*Vicia faba* L.): Analysis on previous achievements and future perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology 105: 6531-6546.
- George EF, De Klerk GJ. 2008. The component of tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ, editors. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. The Netherlands (NL): Springer Dordrecht. p. 65-114.
- Goldbio [Internet]. 2019. Benzylaminopurine (stock colution TD-S Revision 2.0). Missouri, US: Gold Biotechnology; [updated 2019 Oct 17; cited 2023 Nov 01] Available from: <https://goldbio.com/documents/1380/Benzylaminopurine%20Stock%20Solution.pdf>
- Greenway, MB, Philips IC, Lloyd MN, Hubstenberger JF, Philips GC. 2012. A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 48: 403-410.
- Hiti-Bandaralage JCA, Hayward A, Mitter N. 2017. Micropropagation of avocado (*Persea americana* Mill.). American Journal of Plant Sciences 8: 2898-2921.
- Hussain A, Qarshi IA, Nazir H, Ullah I. 2012. Plant tissue culture: Current status and opportunities. In: Leva A, Rinaldi L, editors. Recent Advances in Plant in vitro Culture. United Kingdom (UK): IntechOpen. p. 1-28. Available at doi: doi: 10.5772/50568.

- International Rice Research Institute [Internet]. 2013. Grain storage and pest management. Los Banos PH: Postharvest Unit, CESD, International Rice Research Institute (IRRI); [updated 2013 Oct; cited 2023 Nov 01] Available from: <http://www.knowledgebank.irri.org/images/docs/training-manual-grain-storage.pdf>
- Idris M, Soe N, Jiang L, Kiyota S, Hidema J, Iino M. 2021. UV-B signalling in rice: Response identification, gene expression profiling and mutant isolation. *Plant, Cell & Environment* 44: 1468-1485
- Ismail S, Purwanto RH. 2014. Potensi biomassa dan karbon jenis kaliandra merah (*Calliandra calothyrsus*) dan peluangnya dalam pengurangan emisi gas karbon dioksida. Indonesia (ID): Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Ismail AY, Supartono T, Kusmana C, Sumekar Y, Aminudin S, Hendrayana Y, Nurlaila A. 2022. Phenology of flowering and fruiting of calliandra (*Calliandra* spp.) species in submontane forest, Indonesia. *Research on Crops* 23: 172-179.
- Jayasuriya KMGG, Phartyal SS. 2023. Dormancy, germination, and associated seed ecological traits of 25 Fabaceae species from northern India. *Plant Biology (early view)*: 13589. Available with doi: <https://doi.org/10.1111/plb.13589>.
- Joseph N, Siril EA, Nair GM. 2011. An efficient in vitro propagation methodology for Annatto (*Bixa orellana* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 17: 263-270.
- Katta YM, Kamara MM, Abd El-Aty MS, Elgamal WH, Soleiman RM, Mousa KM, Ueno T. 2019. Effect of storage temperature on storage efficacy, germination, and physical characters of some paddy rice cultivars during different storage periods. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* 64: 61-69.
- Kieber JJ, Schaller GE. 2014. Cytokinins. *The Arabidopsis Book* 12: e0168. Available with doi: <https://doi.org/10.1199/tab.0168>.
- Lui K, Baskin JM, Baskin CC, Bu H, Liu M, Liu W, Du G. 2011. Effect of storage conditions on germination of seeds of 489 species from high elevation grasslands of the Eastern Tibet Plateau and some implications for climate change. *American Journal of Botany* 98: 12-19.
- Lumakto G [Internet]. 2018. Kaliandra merah, tanaman pembangkit tenaga listrik: kompasiana.com; [cited 28 May 2023]. Available from: <https://www.kompasiana.com/girilu/5b3dc8985e1373602321bab2/kaliandra-merah-tanaman-pembangkit-tenaga-listrik>
- Mitrofanova I, Lesnikova-Sedoshenko N, Mitrofanova O, Smykov A, Chelombit S. 2020. Comparative studies of *in vitro* regeneration capacity in some breeding forms of *Prunus persica* (L.) Batsch. In: *BIO Web of Conferences* 24. Proceedings: 2020. International Conferences "Plant Diversity: Status, Trends, Conservation Concept". p. 00055. Available with doi: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202400055>.
- Neumann KH, Kumar A, Imani J. 2009. *Plant cell and tissue culture – a tool in biotechnology*. Germany (DE): Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Park S. 2021. *Plant tissue culture technique and experiments* 4th Edition. United Kingdom (UK): Academic Press (Elsevier) Oxford.
- Putri VA, Sugiyono, Prayoga L, Prasetyo R, Hilary S. 2022. The application of two steps culture in agarwood, *Aquilaria malaccensis*, *in vitro* culture improves microshoots induction and development. *Scripta Biologica* 9: 1-5.
- Shaheen A, Ali M, Ahmad N, Dewir YH, El-Hendawy S, Abd-El Gawad AM. 2020. Micropropagation of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) by using intermediate nodal explants. *Chilean Journal of Agricultural Research* 80: 326-333.

- Shekhawat MS, Kannan N, Manokari M, Ravindran CP. 2015. *In vitro* regeneration of shoots and *ex vitro* rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. 2015. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 13: 209-214.
- Stewart J, Mulawarman, Roshetko JM, Powell MH. 2001. Produksi dan pemanfaatan kaliandra (*Calliandra calothyrsus*): Pedoman lapang. Indonesia (ID): International Centre for Research in Agroforestry (ICRAF) Bogor.
- Suliasih. 1985. Sekilas uraian mengenai kaliandra. Buletin Kebun Raya 6: 133-136.
- Tun W, Yoon J, Jeon JS, An G. 2021. Influence of climate change on flowering time. Journal of Plant Biology 64: 193-203.
- Tyub S, Dar SA, Lone IM, Mir AH. 2021. A robust in-vitro protocol for shoot multiplication of *Echinacea angustifolia*. Current Plant Biology 28: 100221. Available with doi: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100221>.
- Wawrzyniak MK, Michalak M, Chmielarz P. 2020. Effect of different conditions of storage on seed viability and seedling growth of six European wild fruit woody plants. Annals of Forest Science 77: 58. Available with doi: <https://doi.org/10.1007/s13595-020-00963-z>.
- Xing Y, Wen D, Qin C, Jiang W, Wu Z, Qin X. 2020. Effect of low temperature storage on seed germination and seedling growth of dragon fruit. Agricultural Biotechnology 9: 73-78.