

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pemilihan Eksplan Rumput Laut *G. verrucosa* sebagai Induksi Kalus

Proses kegiatan yang dapat mendorong keberhasilan induksi kalus adalah pemilihan sumber eksplan yang tepat. Menurut Apriliyani dan Wahidah, 2017 dalam Septiani *et al.*, (2022) faktor yang dapat menunjang keberhasilan kultur jaringan, yaitu media serta kombinasi zat pengatur tumbuh yang digunakan, sumber eksplan, dan lingkungan yang harus steril. Sumber eksplan yang digunakan pada penelitian ini merupakan rumput laut jenis *G. verrucosa*. Berikut morfologi rumput laut *G. verrucosa* sebagai sumber eksplan dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Karakteristik Morfologi Rumput Laut *G. verrucosa*. Bagian- bagian rumput laut *G. verrucosa* : (1) Talus Utama (2) Talus Cabang 1 (Talus Primer) (3) Internodus Talus Tersier (4) Internodus Talus Sekunder (5) Talus Cabang 2 (Talus Sekunder)

Rumput laut *G. verrucosa* yang digunakan adalah rumput laut yang diambil pada usia 25-30 hari penanaman. Pada proses kultur jaringan harus memilih bagian talus yang tepat agar dapat digunakan. Bagian talus rumput laut yang akan digunakan adalah talus yang masih segar, tidak terserang penyakit dan bagian jaringan meristem apikal atau talus yang masih menghasilkan sel-sel baru.

Talus yang digunakan untuk proses kultur jaringan merupakan jaringan muda yang aktif melakukan pertumbuhan. Muhammad *et al.*, (2020) menyatakan jaringan muda memiliki daya regenerasi yang lebih tinggi, sel-sel masih aktif

melakukan pembelahan, sehingga saat dilakukan kultur respon pertumbuhan akan cepat terjadi karena sel masih aktif membelah diri. Hal ini sesuai dengan pernyataan Ramadhan dan Noor (2023) bahwa pemilihan talus yang masih aktif dapat meningkatkan keberhasilan tumbuh kalus lebih tinggi.

Bagian talus rumput laut *G. verrucosa* yang digunakan sebagai calon eksplan yaitu talus cabang 2 atau talus sekunder seperti pada Gambar 10. yang telah dilingkari warna biru merupakan calon eksplan yang digunakan untuk kultur jaringan serta akan dilakukan proses sterilisasi pada eksplan. Talus sekunder akan digunakan karena berada pada jaringan meristem apikal yang sangat aktif melakukan pembelahan dan mempunyai titik tumbuh yang banyak berupa jaringan muda atau jaringan meristem.

Bagian talus yang digunakan terdapat warna putih dan rapuh mengalami *bleaching* atau penyakit *ice-ice* merupakan tanda bahwa ketidaksuksesan kultur jaringan, karena talus tersebut tidak layak digunakan. Talus yang berubah warna menjadi putih dapat menghasilkan talus yang kurang baik atau tidak dapat menyerap nutrisi dengan sempurna dari zat pengatur tumbuh pada media agar. Menurut Safia (2021) Infeksi penyakit *ice-ice* menyerang pangkal talus, batang, dan ujung talus muda menyebabkan jaringan talus berubah menjadi warna putih. Penyakit *ice-ice* menyebar secara vertikal atau horizontal melalui perantara air.

4.2 Aklimatisasi Rumpat Laut *G. verrucosa*

Proses penting sebelum melakukan kultur jaringan, rumput laut secara bertahap menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan dikenal sebagai aklimatisasi seperti temperatur, kelembaban, dan pH. Menurut Yong *et al.*, (2014) menyatakan aklimatisasi sangat penting untuk pemeliharaan rumput laut tanpa proses aklimatisasi mungkin dapat mengakibatkan kematian rumput laut yang sangat cepat karena stres akibat dari perubahan keadaan lingkungan yang mendadak.

Aklimatisasi mempengaruhi kultur jaringan karena rumput laut dapat menyesuaikan diri dengan perlakuan yang ada. Jika eksplan rumput laut tidak dapat menyesuaikan diri, perubahan ini dapat mempengaruhi kultur jaringan. Selama proses aklimatisasi talus tidak dapat menyesuaikan diri maka proses kultur

jaringan akan gagal dalam pembentukan kalus baru. Rumput laut yang dibawa dalam kondisi segar akan bertahan hidup hingga 3 bulan di Rumah Budidaya. Didukung oleh pernyataan Sulistiawati dan Yani (2014) bahwa kondisi awal rumput laut yang akan diaklimatisasi sangat memengaruhi proses aklimatisasi.



Gambar 11. Aklimatisasi (a) Aklimatisasi dirumah Budidaya (b) Aklimatisasi di Laboratorium

Kondisi rumput laut *G. verrucosa* yang telah diaklimatisasi di rumah budidaya selama 1 minggu masih bertahan hidup dengan baik walaupun tanpa pemberian perlakuan apapun. Pada Gambar 11(a) dapat dilihat bahwa rumput laut masih sangat segar berwarna hijau pekat karena terkena cahaya matahari yang cukup sehingga dapat melakukan fotosintesis sesuai dengan pernyataan Serdianti dan Irawati (2010) memanfaatkan sinar matahari sebagai sumber energi dapat membantu pertumbuhan rumput laut dengan memperoleh hara atau nutrisi.

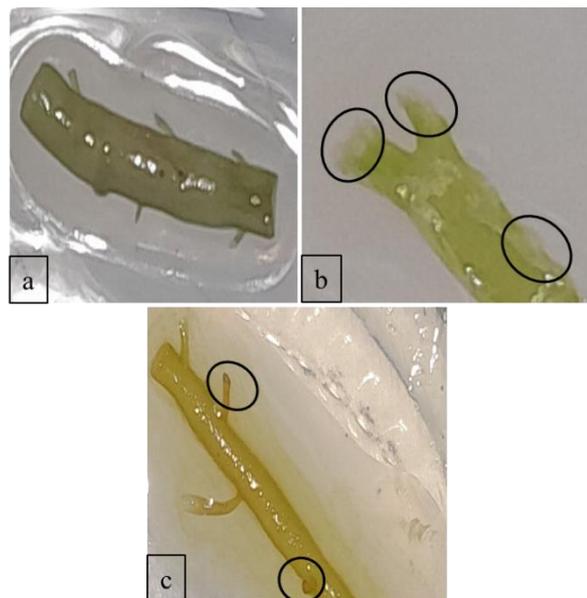
Rumput laut *G. verrucosa* yang telah diaklimatisasi selama 1 minggu pada rumah budidaya akan berpindah tempat ke laboratorium yang dapat dilihat pada Gambar 11 (b). Proses aklimatisasi menggunakan wadah kaca dan air laut yang steril sudah di sterilisasi menggunakan autoklaf. Tahapan sebelum melakukan induksi kalus pada proses aklimatisasi di laboratorium semua peralatan yang akan digunakan harus sudah dalam kondisi steril.

Air laut yang digunakan untuk budidaya rumput laut *G. verrucosa* di Laboratorium tidak diberi perlakuan. Aklimatisasi dilakukan selama 45 hari, 1x dalam seminggu pergantian air budidaya dan jika ada rumput laut yang terserang penyakit *ice-ice* di potong pada bagian yang terserang penyakit. Menurut

pernyataan Maulani *et al.*, (2017) Penyakit ice-ice menyebabkan bagian talus memutih dan mudah patah, memperlambat pertumbuhan rumput laut dan dapat menyebabkan kematian massal rumput laut.

4.3 Tahapan Pembentukan Kalus Rumput Laut *G. verrucosa*

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil pembentukan kalus rumput laut *G. Verrucosa* yang ditunjukkan pada Gambar 12.

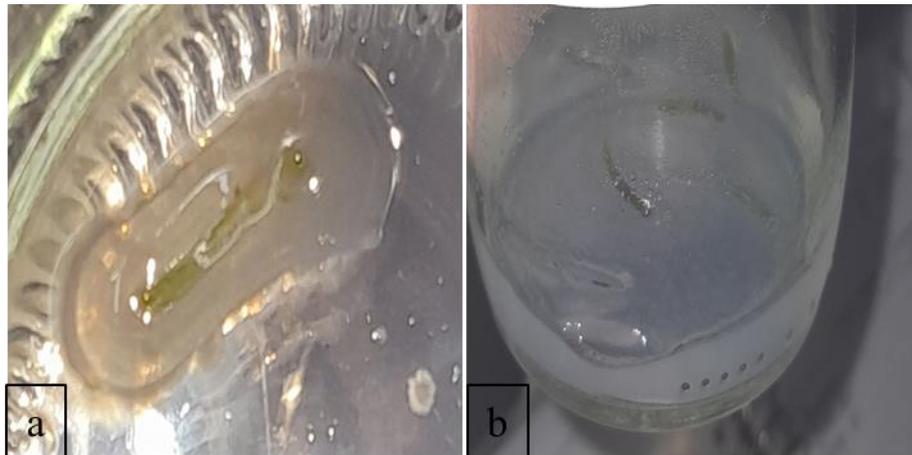


Gambar 12. Tahapan Pembentukan kalus pada Eksplan Rumput Laut *G. Verrucosa* (a) Bentuk awal eksplan rumput laut *G. Verrucosa* berwarna hijau pekat pada hari penginduksian, (b) Eksplan rumput laut pada hari ke-21 kalus mulai terlihat pada bagian permukaan serta ujung eksplan, (c) Kalus berubah warna menjadi coklat pada hari ke-45.

Kalus yang tumbuh pada hari ke-21 merupakan hasil dari perlakuan yang diberi zpt B (BAP 1 mg/l + IAA 3 mg/l) memiliki warna putih dan transparan. Hariyati *et al.* (2016) menyatakan pada bagian sekitar luka bekas irisan eksplan akan menimbulkan pembengkakan maka akan terjadi pertumbuhan kalus disekitarnya. Hasil penelitian Ariani *et al.* (2016) kalus berwarna putih transparan setelah 30 hari penanaman yang diberi perlakuan 2,4D 1 mg/l + BAP 3 mg/l.

Kalus pada Gambar 12 (c) terdapat perubahan warna menjadi kecoklatan, Kalus yang semakin tua dan kekurangan nutrisi dalam medianya diduga menjadi penyebab perubahan warna dari putih kekuningan menjadi coklat. Hal ini sesuai dengan penelitian Rahayu *et al.* (2020) bahwa kalus *Acalypha indica* mengalami pencoklatan karena terlalu lama berada dalam media kultur ketika kandungan nutrisi dalam media mulai menurun. Pada penelitian Mahadi *et al.* (2016) pertumbuhan kalus *Citrus macrocarpa* semakin menurun pada pekan ke-7 dan pencoklatan kalus muncul sebagai akibat dari penurunan unsur hara dan zat pengatur tumbuh di media kultur.

Keberhasilan eksplan dalam bertahan pada media perlakuan membuat media yang telah diberikan ZPT dapat mempertahankan kekuatan eksplan meskipun beberapa eksplan tidak menumbuhkan kalus dengan baik karena tidak merespon zpt dengan baik. Namun, ada media yang tidak dapat mempertahankan bentuk eksplan dikarenakan tekstur media mejadi cair. Contoh eksplan yang mengalami kerusakan dan media yang menjadi cair pada Gambar 13.



Gambar 13. (a) Kegagalan Eksplan, (b) Media perlakuan menjadi cair

Berdasarkan Gambar 13(a) menunjukkan bahwa eksplan pada media dalam keadaan tidak baik, kalus menjadi lembek dan tidak mendorong eksplan untuk hidup dalam media perlakuan. Faktor yang dapat mempengaruhi kerusakan eksplan pada media yaitu kelembaban media, eksplan yang sudah tidak unggul dapat menyebabkan jaringannya tidak aktif membelah lagi serta ZPT yang diberikan tidak mampu mendorong eksplan untuk tumbuh. Menurut Khair (2013)

dalam Saefudin *et al.* (2023) menyatakan bahwa konsentrasi yang terlalu tinggi akan mengganggu pertumbuhan tanaman, dan ZPT yang terlalu rendah tidak akan membantu pertumbuhan tanaman.

Media perlakuan yang tidak padat atau menjadi cair di akibatkan saat pembuatan media pemanasan kurang lama seperti pada Gambar 13(b) dapat menyebabkan eksplan menjadi tenggelam dan tidak dapat tumbuh dengan optimal. Menurut Arimarsetiowati (2012) media yang terlalu lembek akan menyebabkan kegagalan dalam induksi kalus karena eksplan akan tenggelam, eksplan yang tenggelam tidak memiliki kemampuan untuk berkembang menjadi kalus karena media menutup area tumbuh kalus yaitu jaringan yang rusak.

4.4 Struktur dan Warna Kalus Rumput Laut *G. verrucosa*

Warna kalus yang berbeda pada setiap eksplan dan dapat dipengaruhi oleh laju pertumbuhan kalus pada media adalah salah satu indikator dalam teknik kultur jaringan. Setiap prosedur dengan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh menunjukkan berbagai warna kalus, Pengamatan skoring warna dari setiap perlakuan diberi label A,B,C dan D selama 2 bulan pemeliharaan tidak semua eksplan hidup dan tumbuh kalus. Struktur kalus secara visual ditandai dengan pengamatan skoring warna ditunjukkan pada Tabel 5.

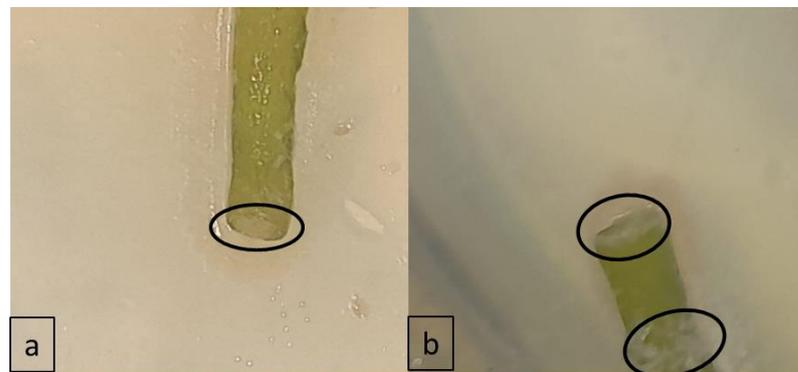
Tabel 5. Skoring Warna pada Kalus dengan 4 Perlakuan

Perlakuan	Pengulangan		
	I	II	III
A	-	-	-
B	0 (Coklat)	0 (Coklat)	1 (Putih)
C	0 (Coklat)	1 (Putih)	0 (Coklat)
D	-	0 (Coklat)	-

Keterangan : Konsentrasi media agar : A (Tanpa ZPT), B (BAP 1 mg/l + IAA 3mg/l), C (BAP 1 mg/l + NAA 3 mg/l), D (NAA 0,75 mg/l)

Berdasarkan hasil pengamatan Tabel 4. struktur kalus setelah 2 bulan pemeliharaan. Media perlakuan B (BAP 1 mg/l + IAA 3mg/l) dan C (BAP 1 mg/l + NAA 3 mg/l) menunjukkan 1(Putih) yang berarti kalus berwarna putih bening dan bertekstur kompak dapat dilihat pada Gambar 14. Busaifi *et al.* (2021) menyatakan warna putih atau terang dapat menunjukkan bahwa kalus masih dalam kondisi yang baik. Di samping itu hasil penelitian Harahap (2020)

menunjukkan bahwa tekstur kalus tanaman paitan padat, rapat, dan termasuk sulit untuk dipisahkan merupakan tekstur kompak.



Gambar 14. Pengamatan Tekstur Kalus Perlakuan B dan C

Kalus pada perlakuan D (NAA 0,75 mg/l) Gambar 15. menghasilkan 0 (Coklat) kalus yang tumbuh berwarna coklat yang dapat dikategorikan kalus yang mengalami kegagalan untuk tumbuh. Menurut Sitinjak *et al.* (2015) dalam Rasud *et al.* (2019) aktifitas pembelahan yang sangat rendah, daya regenerasi sel-sel ini berkurang. Hasil penelitian Anwar dan Mayta (2020) menunjukkan pada perlakuan P3 (1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA) kalus berwarna kecoklatan menandakan terjadi sintesis fenol, pencoklatan kalus diduga disebabkan oleh bertambahnya umur jaringan atau sel kalus dan terlambatnya proses subkultur menyebabkan eksplan menghasilkan senyawa fenol yang tinggi, merugikan eksplan, dan menyebabkan kalus berwarna coklat.



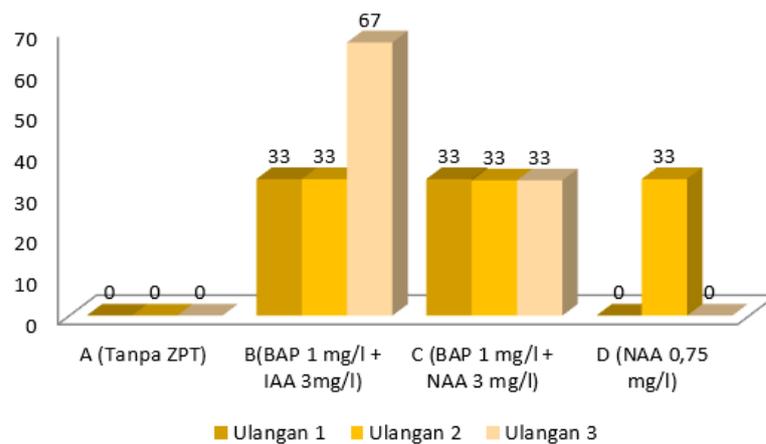
Gambar 15. Kalus *G. verrucosa* Berwarna Coklat

Perlakuan A (tanpa ZPT) eksplan tidak mengalami pertumbuhan kalus, eksplan mengalami perubahan warna menjadi coklat yang dapat mengakibatkan

kematian pada eksplan. Denish (2007) menyatakan bahwa kematian eksplan yang ditandai dengan pencoklatan seluruh bagian permukaan eksplan. Hal ini diakibatkan oleh tidak ditambahkan zat pengatur tumbuh pada media kultur jaringan sebagai reaksi eksplan terhadap pelukaan yang diberikan sehingga eksplan menghasilkan senyawa fenol.

4.5 Persentase Eksplan Berkalus Rumput Laut *G. verrucosa*

Eksplan rumput laut *G.verrucosa* yang telah diinkubasi selanjutnya dilakukan pengamatan kalus yang hidup dan kemudian dilakukan pengolahan data persentase eksplan yang berkalus pada media perlakuan A (Tanpa hormon ZPT), B (BAP 1,0 mg/l + IAA 3,0 mg/l), C (BAP 1,0 mg/l + NAA 3,0 mg/l), D (NAA 0,75 mg/l). Grafik persentase eksplan yang berkalus disetiap perlakuan dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Grafik Persentase Kalus Hidup disetiap Perlakuan

Hasil yang didapat menunjukkan perlakuan B(BAP 1 mg/l + IAA 3 mg/l) memiliki nilai persentase eksplan yang berkalus paling tinggi daripada perlakuan lainnya dengan rata-rata sebesar 44%. Pada penelitian yang dilakukan Katuri dan Amri (2019) konsentrasi perlakuan IAA 2 mg/l+ BAP 1 mg/l menghasilkan pertumbuhan kalus 62,5%. Menurut Syahid *et al.*, (2010) karena sitokinin dan auksin saling bekerja sama oleh sebab itu menambahkan sitokinin ke media yang sudah mengandung auksin dapat merangsang pertumbuhan kalus. Hal ini menunjukan bahwa auksin dan sitokinin berperan sebagai penggerak dalam proses tumbuh dan perkembangan jaringan.

Perlakuan yang memiliki persentase pertumbuhan kalus paling tinggi B(BAP 1 mg/l + IAA 3mg/l) dikarenakan kombinasi antara auksin dan sitokinin yang tepat dapat memacu pertumbuhan kalus. Hasil penelitian Adi *et al.*, (2022) penambahan IAA dan BAP terhadap pertumbuhan eksplan daun angrek *C. pandurate Lindl* mempengaruhi waktu muncul kalus, tebal kalus dan persentase hidup kalus. Menurut Thomy (2012) bahwa secara umum, menambahkan auksin dalam jumlah tinggi dapat membantu mempercepat pertumbuhan kalus.

Perlakuan pada C (BAP 1 mg/l + NAA 3 mg/l) memiliki rata-rata persentase pembentukan kalus yang cukup tinggi sebesar 33%. Berdasarkan penelitian Wahyuni *et al.*, (2020) pemberian NAA 3 mg/l + BAP 0,5 mg/l mampu membentuk kalus sebesar 100% merupakan kombinasi yang paling ideal, dan mungkin lebih responsif dalam pembentukan kalus akan tetapi eksplan yang ditanam pada media kultur disetiap pengulangan hanya 1. Sedangkan pada penelitian Karlianda *et al.*, (2012) pada konsentrasi NAA 0,2 mg/l + BAP 2 mg/l menghasilkan hanya 37,5%. Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan konsentrasi zat pengatur pertumbuhan yang berbeda, konsentrasi NAA yang diberikan lebih rendah daripada konsentrasi BAP sehingga kemampuan eksplan untuk membentuk kalus tidak ideal.

Konsentrasi B(BAP 1 mg/l + IAA 3mg/l) dan C (BAP 1 mg/l + NAA 3 mg/l) menggunakan kombinasi auksin dan sitokinin serta komposisi zat pengatur tumbuh yang digunakan sama akan tetapi terdapat perbedaan persentase pembentukan kalus terhadap keduanya. Hal ini diduga karena dipengaruhi oleh kondisi eksplan yang digunakan dan kondisi ruang inkubasi serta media tumbuh. Hal ini sesuai dengan pernyataan Palei (2017) bahwa jenis eksplan yang digunakan, komposisi media kultur, dan tingkat hormon auksin endogen semua memengaruhi pembentukan kalus.

Perlakuan D (NAA 0,75 mg/l) tanpa kombinasi ZPT pada Gambar 15. menunjukkan nilai rata-rata pengulangan yang sangat rendah dapat dikatakan bahwa pada perlakuan D (NAA 0,75 mg/l) belum mencapai keseimbangan yang optimal untuk melakukan proses pertumbuhan kalus. Sesuai dengan pendapat Wulandari *et al.*, (2022) agar kalus dapat berkembang secara optimal, hormon auksin dan sitokinin harus berada dalam konsentrasi yang seimbang dan tepat di

media kultur. Proses pembelahan secara kontinyu pada waktu yang tepat adalah kombinasi kedua ZPT tersebut.

Eksplan yang tidak terjadi pertumbuhan kalus dikarenakan adanya kekurangan unsur hara, air dan kekurangan kandungan hormon dalam eksplan. George *et al.*, 2008 dalam Pardede *et al.*, 2021 menyatakan pada proses kultur jaringan kalus memerlukan keseimbangan hormon auksin dan sitokinin. Auksin dapat menginduksi kalus sedangkan sitokinin dapat menginisiasi terjadinya proses embriogenik pada kalus.

Hasil persentase eksplan kalus rumput laut *G.verrucosa* dari perlakuan A, B, C, dan D telah dihitung dan dianalisis dengan uji ANOVA *One Way*. Jika nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$, maka data yang diuji dianggap berbeda nyata. Jika nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$, maka data dianggap tidak berbeda nyata. Akibatnya data tidak perlu diuji lebih lanjut dengan BNT (Beda Nyata Terkecil) atau LSD (*Least Significant Different*).

Tabel 6. Uji ANOVA Persentase Kalus Hidup Rumput Laut *G.verrucosa*

Source of Variation	SS	df	MS	F_{hit}	F_{tabel}
Between Groups	3674,250	3	1224,750	6,547	4,07
Within Groups	1496,667	8	187,083		
Total	5170,971	11			

Keterangan : SS (Sum of Squares), MS (Mean Squares), F_{hit} (F hitung), dan F_{tab} (F table)

Hasil yang didapat dari uji ANOVA persentase kalus yang hidup dapat dilihat pada Table 6. F_{hit} 6,547 > F_{tab} 4,07 menunjukkan nilai yang berbeda nyata, sehingga dapat disimpulkan bahwa komposisi zat pengatur tumbuh benar-benar memengaruhi pertumbuhan kalus eksplan yang dikultur. Selanjutnya dapat dilakukan uji lanjutan BNT atau LSD dari hasil tersebut yang dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji BNT Persentase Kalus Hidup Rumput Laut *G.verrucosa*

Perlakuan	Pembanding Perlakuan	Sig.	Rerata Persentase Kalus Hidup
A (Tanpa ZPT)	B (BAP 1 + IAA 3)	,004	0 ± 0 ^a
	C (BAP 1 + NAA 3)	,018	
	D (NAA 0,75)	,353	
B (BAP 1 + IAA 3)	A (Tanpa ZPT)	,004	44 ± 19,6 ^c
	C (BAP 1 + NAA 3)	,340	
	D (NAA 0,75)	,017	
C (BAP 1 + NAA 3)	A (Tanpa ZPT)	,018	33 ± 0 ^{bc}
	B (BAP 1 + IAA 3)	,340	
	D (NAA 0,75)	,084	
D (NAA 0,75)	A (Tanpa ZPT)	,354	11 ± 19,05 ^{ab}
	B (BAP 1 + IAA 3)	,017	
	C (BAP 1 + NAA 3)	,084	

Keterangan : - Angka yang diikuti huruf berbeda menunjukkan bahwa berbeda nyata
- Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan bahwa perlakuan berbeda tidak nyata
- Nilai sig (signifikasi) menunjukkan nilai tersebut berbeda nyata ($p < 0,05$) atau tidak berbeda nyata ($p > 0,05$)

Hasil uji lanjut BNT persentase eksplan yang berkalus rumput laut *G.verucosa* dapat dilihat pada Tabel 7. Hasil uji perlakuan A (tanpa hormon ZPT) tidak berbeda nyata terhadap perlakuan D (NAA 0,75 mg/l) dikarenakan kedua perlakuan tersebut hanya menggunakan ZPT auksin dengan formulasi konsentrasi terlalu sedikit dan tidak ada kombinasi dengan ZPT sitokinin. Hal ini sesuai dengan pernyataan Illahi *et al.*, (2022) yang menyatakan kalus akan lebih baik dihasilkan dengan kombinasi auksin dan sitokinin daripada hanya auksin yang memiliki kemungkinan kecil untuk tumbuh kalus. Namun hasil uji perlakuan A (tanpa hormon ZPT) terhadap perlakuan B (BAP 1 mg/l + IAA 3 mg/l) dan perlakuan C (BAP 1 mg/l + NAA 1 mg/l) berbeda nyata, hal tersebut terjadi karena pada perlakuan B dan C diberi kombinasi formulasi auksin dan sitokinin.

Hasil uji BNT ini dapat dijadikan sebagai acuan untuk menentukan formulasi yang efisien untuk proses induksi kalus rumput laut. Hasil yang didapat jika berdasarkan uji BNT maka perlakuan C (BAP 1 mg/l + NAA 3 mg/l) dan perlakuan B (BAP 1 mg/l + IAA 3 mg/l) karena mendapatkan nilai signifikasi yang tidak berbeda nyata. Namun, jika dilihat berdasarkan hasil persentase eksplan berkalus didapati perlakuan B (BAP 1 mg/l + IAA 3 mg/l) dengan nilai persentase 44 % yang tertinggi di seluruh perlakuan.