

Inisiasi Kalus Bangle (*Zingiber purpureum* Roscoe) pada Beberapa Kombinasi 2.4-D dan Kinetin

Callus Initiation of Bangle (Zingiber purpureum Roscoe) on Some Combination of 2.4-D and Kinetin

Swary Dwi Suherna Tarigan¹, Ida Ayu Astarini^{1*}, Ni Putu Adriani Astiti¹

Diterima 3 Agustus 2023/ Disetujui 30 Agustus 2023

ABSTRACT

Bangle (Zingiber purpureum Roscoe) is belonging to the Zingiberaceae family that has been utilized as a medicinal plant. The objective of the research was to evaluate the effects of 2.4-D and kinetin on bangle's callus initiation. This research was conducted at the Plant Tissue Culture Laboratory, Biology Study Program, Faculty of Mathematics and Natural Science, Udayana University from February until May 2023. This experiment was arranged using a Completely Randomized Design (CRD) with two factors and repeated five times. The first factor was 2.4-D's concentration (0, 1 and 2 ppm) and the second factor was kinetin's concentration (0, 0.5 and 1 ppm). Variables observed were callus initiation time, percentage of callus formation, and callus morphology. The result shows that 1 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin produce the fastest callus initiation time (10.8 days) and the highest callus formation percentage (100%), whereas 1 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin and 2 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin produce embriogenic callus morphology (white color and friable texture).

Keywords: auxin, cytokinin, medicinal plant, Zingiberaceae

ABSTRAK

Bangle (*Zingiber purpureum* Roscoe) termasuk keluarga Zingiberaceae yang dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh 2.4-D dan kinetin pada inisiasi kalus bangle. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Prodi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana dari bulan Februari hingga bulan Mei 2023. Desain percobaan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor dan lima ulangan. Faktor pertama konsentrasi 2.4-D (0, 1 dan 2 ppm) dan faktor kedua konsentrasi kinetin (0, 0.5 dan 1 ppm). Variabel yang diamati meliputi waktu inisiasi kalus, persentase pembentukan kalus, dan morfologi kalus. Hasil penelitian menunjukkan 1 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin menghasilkan waktu inisiasi kalus tercepat (10.8 HST) dan persentase pembentukan kalus tertinggi (100%), sementara 1 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin dan 2 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin menghasilkan morfologi kalus yang baik dan embriogenik (warna putih dengan tekstur remah).

Kata Kunci: auksin, sitokinin, tanaman obat, *Zingiberaceae*

PENDAHULUAN

Bangle (*Zingiber purpureum* Roscoe) merupakan tanaman herba tahunan dari keluarga Zingiberaceae yang tersebar luas di Asia Tenggara. Di Indonesia, bangle sudah sejak lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional untuk mengobati penyakit demam, dermatitis, gastritis, diare, cacingan, pasca bersalin, respiratori, dan otot (Chongmelaxme *et al.*, 2017; Norikura *et al.*, 2020). Bangle digunakan

sebagai tanaman obat karena rimpang bangle mengandung fenilbutenoid, kurkuminoid, seskuiterpenoid, benzaldehida, kuinon, dan minyak atsiri yang mengandung monoterpenoid (Han *et al.*, 2021).

Besarnya manfaat bangle sebagai obat tradisional menyebabkan meningkatnya kebutuhan akan bangle untuk pengobatan. Kebutuhan yang tinggi ini tidak dapat terpenuhi karena produksi bangle yang rendah. Produksi yang rendah disebabkan oleh perbanyakan bangle dengan menggunakan

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana
Jl. Raya Kampus Unud, Bukit Jimbaran, Kuta Selatan, Badung, Bali 80361, Indonesia
E-mail: iaastarini@unud.ac.id (*penulis korespondensi)

rimpang yang menghasilkan 4-6 tanaman per rimpang per tahun. (Rajkumari dan Sanatombi, 2016). Oleh sebab itu, diperlukan teknik perbanyakan yang menghasilkan tanaman dengan jumlah banyak seperti kultur jaringan (Miri, 2020).

Kultur jaringan adalah teknik perbanyakan tanaman yang efisien untuk menghasilkan tanaman dengan kuantitas besar dalam waktu singkat. Kultur jaringan menggunakan bagian kecil dari tanaman (sel, organ, jaringan, dan protoplas) sebagai bahan tanam sehingga tidak mengganggu keberadaan tanaman di alam (Anggraeni *et al.*, 2022). Tanaman yang dihasilkan dalam kultur jaringan memiliki keunggulan yaitu seragam, bebas penyakit, dan menjamin ketersediaan tanaman dalam jangka panjang (Durroh dan Yunarti, 2020). Kultur jaringan juga dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan metabolit sekunder dari tanaman obat melalui inisiasi kalus (Laila dan Savitri, 2014).

Kalus merupakan kumpulan sel-sel yang amorphous (belum berdiferensiasi). Kalus merupakan bahan tanam yang penting dalam kultur jaringan karena kalus dapat berdiferensiasi menjadi tanaman baru jika ditempatkan pada media yang sesuai. Kalus memiliki keunggulan yaitu dapat diinisiasi dari semua bagian tanaman. Bagian tanaman yang bersifat meristematik memiliki daya membentuk kalus lebih tinggi (Purba *et al.*, 2017; Rasud dan Bustaman, 2020).

Faktor penting yang menentukan keberhasilan dalam kultur jaringan yaitu zat pengatur tumbuh (ZPT). ZPT akan mendorong dan menghambat pertumbuhan eksplan dalam media kultur. Jenis ZPT yang frekuensi penggunaannya paling tinggi dalam kultur jaringan yaitu auksin dan sitokinin. Auksin yang digunakan yaitu 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) dan berfungsi dalam pembentukan kalus dengan cara dediferensiasi sel dan menghambat organogenesis (Rumiyati *et al.*, 2017). Sitokinin yang digunakan yaitu 6-Furfurylaminopurine (kinetin) dan berfungsi dalam peningkatan laju pembelahan dan menginduksi tunas (Putra *et al.*, 2015).

Hasil penelitian induksi kalus kunyit oleh Gurav *et al.* (2019) menunjukkan bahwa 3 ppm 2,4-D - 0,8 ppm kinetin merupakan kombinasi yang tepat untuk pertumbuhan kalus kunyit dengan persentase kalus sebesar 79%, waktu inisiasi 10 hari, warna kalus hijau kekuningan, dan bertekstur

remah. Abubakar dan Pudake (2019), dalam penelitiannya menyatakan bahwa 0,5 ppm 2,4-D - 0,1 ppm kinetin merupakan kombinasi yang tepat untuk pertumbuhan kalus kunyit hitam dengan persentase kalus sebesar 50%, waktu inisiasi 5 minggu, warna kalus putih, dan bertekstur remah.

Tujuan dari penelitian yaitu mengetahui pengaruh 2,4-D dan kinetin pada inisiasi kalus bangle (*Z. purpureum Roscoe*).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana mulai dari bulan Februari hingga bulan Mei 2023.

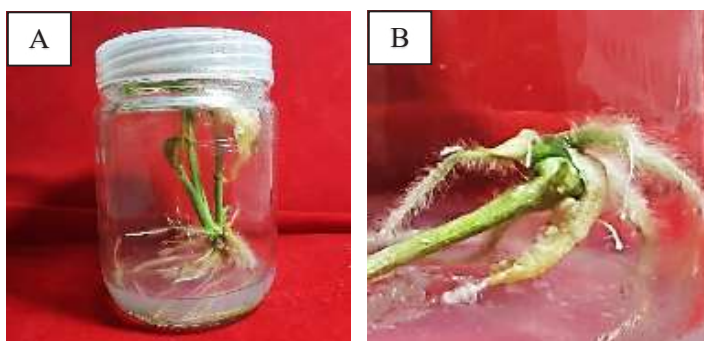
Bahan tanam yang digunakan yaitu plantlet bangle yang diinisiasi pada media MS dengan 4 ppm kinetin dan 1 ppm NAA berusia 8 minggu (Gambar 1A). Eksplan yang digunakan adalah organ akar yang berukuran ± 8 cm dan memiliki pertumbuhan yang baik yaitu sehat dan berwarna hijau (Gambar 1B). Media yang digunakan yaitu media MS yang diperkaya sukrosa sebanyak 30 g L⁻¹ dan agar sebanyak 7 g L⁻¹.

Percobaan didesain dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor terdiri atas konsentrasi 2,4-D dan konsentrasi kinetin. Faktor konsentrasi 2,4-D terdiri atas tiga taraf (0, 1, dan 2 ppm) dan faktor konsentrasi kinetin terdiri atas tiga taraf (0, 0,5, dan 1 ppm) sehingga diperoleh 9 kombinasi perlakuan (Tabel 1). Setiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali sehingga diperoleh total keseluruhan 45 botol percobaan.

Akar bagian pangkal hingga tengah dipotong berukuran 1 cm dan disubkultur pada media perlakuan. Eksplan diinkubasi pada suhu 25 \pm 2 °C dan pencahayaan 16 jam pencahayaan terang dan 8 jam pencahayaan gelap selama 4 minggu. Variabel yang diamati yaitu:

1. Waktu inisiasi kalus

Pengukuran variabel ini dilakukan setiap hari dan inisiasi kalus dicirikan dengan adanya pembengkakan pada eksplan. Waktu terjadinya pembengkakan pada eksplan dinyatakan sebagai Hari Setelah Tanam (HST).



Gambar 1. Bahan tanam yang digunakan. A) Plantlet bangle berusia 8 minggu, B) Akar *in-vitro* bangle

Tabel 1. Kombinasi perlakuan 2.4-D dan kinetin

2.4-D (ppm)	Kinetin (ppm)		
	0	0.5	1
0	A	B	C
1	D	E	F
2	G	H	I

2. Persentase pembentukan kalus

Pengukuran variabel ini dilakukan pada akhir penelitian (4 minggu) dengan cara menghitung eksplan yang berkalus dengan menggunakan rumus:

$$\text{Persentase kalus} = \frac{\text{Jumlah eksplan membentuk kalus}}{\text{Jumlah eksplan per perlakuan}} \times 100\%$$

3. Morfologi kalus

Pengamatan morfologi kalus dilakukan pada akhir penelitian (4 minggu) dengan mengamati secara visual tekstur dan warna kalus yang terbentuk. Penentuan warna kalus ditetapkan berdasarkan skoring yang dilakukan oleh Gultom *et al.* (2012) dengan modifikasi:

- 1: Coklat; 3: Kuning 5: Putih
- 2: Putih Kuning; 4: Hijau Kuning

Penentuan tekstur kalus ditetapkan berdasarkan skoring yang dilakukan oleh Sugiyarto dan Kuswandi (2014) yaitu:

- 1: Kompak dengan ciri-ciri tonjolan nodular, tidak dapat dipisahkan menjadi sel tunggal karena terdiri atas sel yang berukuran kecil dan rapat, serta bertekstur padat dan keras.
- 2: Remah dengan ciri-ciri dapat dipisahkan menjadi sel tunggal karena ikatan yang renggang, ruang antar sel yang besar, dan sangat kaya akan kandungan air.

Data kualitatif dianalisis secara deskriptif sedangkan data kuantitatif dianalisis secara statistik dengan sidik ragam (ANOVA). Dari hasil uji ANOVA yang berbeda nyata

($\alpha \leq 0.05$) selanjutnya dilakukan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*). Analisis data dilakukan menggunakan program SPSS for Windows versi 25.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Waktu inisiasi kalus

Indikator penting yang menunjukkan adanya pertumbuhan dalam kultur jaringan adalah terbentuknya kalus pada eksplan. Kalus adalah kumpulan sel-sel amorphous dan aktif membelah. Hasil ANOVA menunjukkan 2.4-D dan kinetin berpengaruh signifikan bagi waktu inisiasi kalus (Tabel 2). Waktu inisiasi kalus pada penelitian ini berkisar antara 10.8-27.2 HST. Waktu inisiasi kalus tercepat dihasilkan pada perlakuan E (1 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin) yaitu 10.8 HST sedangkan waktu inisiasi kalus terlama dihasilkan pada perlakuan C (0 ppm 2.4-D - 1 ppm kinetin) yaitu 27.2 HST. Perlakuan A (kontrol) tidak menghasilkan kalus hingga akhir pengamatan.

Kalus pada eksplan inisiasi awalnya berupa pembengkakan dan terbentuknya jaringan putih pada daerah perlukaan eksplan. Jaringan ini tumbuh berbentuk bulatan yang jelas, dan timbul agregat kalus. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Waryastuti *et al.* (2017), dimana tanda pembentukan kalus pada eksplan yaitu terjadi pembengkakan dan terbentuk jaringan putih pada permukaan eksplan.

Waktu induksi kalus tercepat pada penelitian ini dihasilkan oleh perlakuan E (1 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin) yaitu 10.8 HST. 2.4-D dan kinetin berperan sinergis untuk pembelahan sel dengan cara mengontrol aktivitas CDK (*Cyclin Dependent Kinase*) yaitu enzim yang berperan dalam pembelahan sel (Marthani *et al.*, 2016). Waktu muncul kalus yang cepat disebabkan oleh interaksi dan keseimbangan antara ZPT eksogen dengan hormon endogen pada eksplan. Keseimbangan ini menyebabkan proses fisiologis yaitu pembelahan sel pada eksplan berlangsung lebih efektif dan kalus muncul lebih cepat.

Tabel 2. Pengaruh kombinasi 2.4-D dan kinetin terhadap waktu inisiasi dan persentase pembentukan kalus

Perlakuan	Waktu Muncul Kalus (Hari)	Persentase Pembentukan Kalus (%)
A. 2.4-D (0 ppm) + Kinetin (0 ppm)*	0*a	0.00a
B. 2.4-D (0 ppm) + Kinetin (0.5 ppm)	1.8 ± 13.5bcd	20.00 ± 44.7ab
C. 2.4-D (0 ppm) + Kinetin (1 ppm)	1.2 ± 6.2d	20.00 ± 44.7ab
D. 2.4-D (1 ppm) + Kinetin (0 ppm)	1.4 ± 10.7bc	60.00 ± 54.7abc
E. 2.4-D (1 ppm) + Kinetin (0.5 ppm)	1.8 ± 2.5ab	100c
F. 2.4-D (1 ppm) + Kinetin (1 ppm)	1.8 ± 8.0bcd	80.00 ± 44.7bc
G. 2.4-D (2 ppm) + Kinetin (0 ppm)	1.2 ± 8.1cd	40.00 ± 54.7abc
H. 2.4-D (2 ppm) + Kinetin (0.5 ppm)	23.0 ± 9.6bcd	40.00 ± 54.7abc
I. 2.4-D (2 ppm) + Kinetin (1 ppm)	19.0 ± 10.1bcd	60.00 ± 54.7abc

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata berdasarkan uji DMRT 5%, *: Tidak muncul kalus hingga akhir pengamatan.

Hasil ini sesuai dengan pernyataan Wahyuni *et al.* (2020), dimana kalus terbentuk karena adanya interaksi dan keseimbangan antara hormon endogen dalam eksplan dengan ZPT eksogen yang ditambahkan pada media.

Persentase pembentukan kalus

Persentase pembentukan kalus merupakan indikator koresponsifan eksplan terhadap kombinasi perlakuan yang dicobakan. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi 2.4-D dan kinetin berpengaruh signifikan bagi persentase pembentukan kalus (Tabel 2). Persentase kalus pada penelitian ini berkisar antara 20-100%. Persentase kalus tertinggi dihasilkan oleh perlakuan E (1 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin) yaitu sebesar 100%. Persentase kalus terendah dihasilkan pada perlakuan B (0 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin) dan perlakuan C (0 ppm 2.4-D - 1 ppm kinetin) yaitu sebesar 20%.

Hasil penelitian menunjukkan 2.4-D memiliki pengaruh signifikan pada persentase kalus. Media perlakuan dengan 2.4-D tunggal atau 2.4-D dalam kombinasi dengan kinetin menghasilkan persentase kalus yang lebih tinggi (40-100%) dibandingkan dengan media perlakuan tanpa 2.4-D (20%). Hal ini karena 2.4-D berperan penting dalam pembentukan kalus dengan cara dediferensiasi sel dan menghambat organogenesis (Rumiyati *et al.*, 2017).

Penambahan 2.4-D akan menstimulasi ARF (*Auxin Response Factor*) untuk mengaktifkan ekspresi LBD (*Lateral Organ Boundaries Domain*) sehingga menginduksi E2Fa (factor binding promotor E2) yang berperan dalam mengulang kembali (*re-entry*) siklus sel dan menyebabkan terbentuknya kalus. Selain itu, 2.4-D juga menyebabkan terbentuknya kalus dengan cara meningkatkan keasaman dinding sel yang berakibat sel menyerap air sehingga sel membengkak dan muncul kalus (Teoh *et al.*, 2023).

2.4-D yang dikombinasikan dengan kinetin memberikan hasil lebih baik dari 2.4-D tunggal dimana persentase kalus tertinggi (100%) dihasilkan oleh perlakuan E (1 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin). Hal ini karena kinetin berfungsi dalam peningkatan laju pembelahan. Kinetin berperan penting pada tahap metafase yaitu untuk membentuk benang gelendong (Mahadi *et al.*, 2016). 2.4-D dan kinetin yang digunakan dalam kombinasi memiliki pengaruh yang sinergis dimana

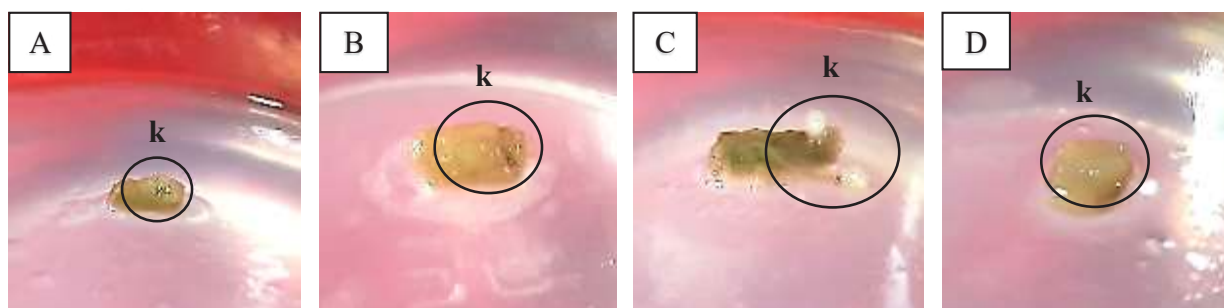
2.4-D berfungsi untuk pemanjangan dan pembesaran sel sedangkan kinetin berfungsi untuk meningkatkan pembelahan (Afiyah *et al.*, 2022).

Media dengan kinetin tunggal dapat menghasilkan kalus dengan persentase yang rendah (20%). Hal ini karena kinetin berperan dalam pembelahan sel dan regenerasi kalus. Kinetin mengaktifkan enzim yang akan melepaskan gugus fosfat dari protein CDK (*Cyclin Dependent Kinase*). Protein CDK yang hanya mengandung satu gugus fosfat menjadi aktif dan menginisiasi sel untuk memasuki fase mitosis (Aprilia *et al.*, 2022).

Morfologi kalus

Morfologi kalus merupakan kenampakan fisik kalus pada setiap perlakuan dan didasari oleh warna dan tekstur. Kalus yang dihasilkan pada penelitian belum terbentuk secara sempurna dan hanya terbentuk pada bagian perlukaan. Penggunaan 2.4-D dan kinetin mempengaruhi morfologi kalus (Tabel 3). Hasil penelitian menyatakan warna kalus dalam penelitian ini terdiri dari 4 warna yaitu hijau kekuningan (Gambar 2A), kuning (Gambar 2B), putih (Gambar 2C), dan putih kekuningan (Gambar 2D). Tekstur kalus yang diperoleh terdiri dari 2 tekstur yaitu remah (Gambar 3A) dan kompak (Gambar 3B).

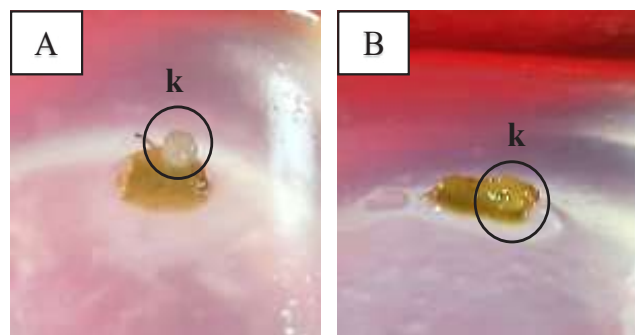
Warna kalus merupakan indikator yang menggambarkan kondisi sel-sel penyusun kalus masih aktif membelah atau sudah berhenti membelah (Afiyah *et al.*, 2022). Warna hijau kekuningan menunjukkan kalus memiliki kemampuan membelah yang baik. Warna hijau kekuningan mengindikasikan adanya kandungan klorofil pada kalus. Warna putih menunjukkan bahwa plastida belum terdiferensiasi dan mencirikan kondisi meristematik atau embrionik (Prashariska *et al.*, 2021; Setiawati *et al.*, 2021). Warna kalus putih menunjukkan kapasitas embriogenik. Kapasitas embriogenik ini memungkinkan kalus untuk berproliferasi menjadi embrio somatik melalui tahapan embriogenesis somatik (Oktafiani *et al.*, 2022). Warna putih kekuningan menunjukkan bahwa kalus berada pada fase akhir pembelahan aktif. Warna kuning menunjukkan bahwa kalus memiliki kemampuan pembelahan yang baik. Warna kuning mengindikasikan pada sel parenkim kalus terdapat pigmen flavonoid (Ekawati *et al.*, 2022).



Gambar 2. Warna kalus yang diperoleh. A) Hijau kekuningan, B) Kuning, C) Putih, D) Putih kekuningan. Keterangan: k: kalus

Tabel 3. Pengaruh kombinasi 2.4-D dan kinetin terhadap morfologi kalus

Perlakuan	Skor	Warna	Skor	Tekstur
A. 2.4-D (0 ppm) + Kinetin (0 ppm)	-	-	-	-
B. 2.4-D (0 ppm) + Kinetin (0.5 ppm)	4	Hijau Kekuningan	1	Kompak
C. 2.4-D (0 ppm) + Kinetin (1 ppm)	4	Hijau Kekuningan	1	Kompak
D. 2.4-D (1 ppm) + Kinetin (0 ppm)	3.33	Kuning	1	Kompak
E. 2.4-D (1 ppm) + Kinetin (0.5 ppm)	4.6	Putih	1.6	Remah
F. 2.4-D (1 ppm) + Kinetin (1 ppm)	3.25	Kuning	1.25	Kompak
G. 2.4-D (2 ppm) + Kinetin (0 ppm)	2.5	Putih Kekuningan	1	Kompak
H. 2.4-D (2 ppm) + Kinetin (0.5 ppm)	4.5	Putih	1.5	Remah
I. 2.4-D (2 ppm) + Kinetin (1 ppm)	2.33	Putih Kekuningan	1	Kompak



Gambar 3. Tekstur kalus yang diperoleh. A. Remah, B. Kompak. Keterangan: k: kalus

Tekstur kalus merupakan indikator yang menggambarkan kualitas kalus. Kalus berkualitas baik yaitu kalus dengan tekstur remah. Kalus remah memiliki ciri-ciri yaitu dapat dipisahkan menjadi sel tunggal karena ikatan yang renggang, ruang antar sel yang besar, dan sangat kaya akan kandungan air (Setiawati *et al.*, 2021). Kalus remah terbentuk akibat adanya 2.4-D dalam media. Menurut Silvina *et al.* (2021), kalus remah baik digunakan dalam kultur suspensi sel karena dapat dipisahkan menjadi sel tunggal dan memiliki aerasi oksigen yang baik. Kalus kompak memiliki ciri-ciri berupa adanya tonjolan nodular, tidak dapat dipisahkan menjadi sel tunggal karena terdiri atas sel yang berukuran kecil dan rapat, serta bertekstur padat dan keras (Julianti *et al.*, 2021). Kalus kompak merupakan kalus yang terlignifikasi akibat adanya kinetin dalam media. Menurut Arieswari *et al.* (2018), kalus kompak mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak daripada kalus remah. Hal ini karena kalus remah memiliki lebih banyak kandungan air sehingga akan mengakumulasi lebih sedikit metabolit sekunder.

Perlakuan E (1 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin) dan perlakuan H (2 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin) diperoleh kalus dengan tekstur remah dan berwarna putih atau kalus embriogenik. Terbentuknya kalus embriogenik pada kedua perlakuan ini disebabkan karena konsentrasi 2.4-D yang

lebih tinggi dari kinetin. 2.4-D dapat mengaktifkan ekspresi gen *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase* yang berperan dalam pembentukan embrio somatik. 2.4-D juga berperan dalam aktivasi hormon ABA yang selanjutnya menginduksi ekspresi LEA (*Leaf Embryogenesis Abundant*) yaitu protein untuk perkembangan embriogenesis somatik (Hidayah dan Dewanti, 2023).

KESIMPULAN

Inisiasi kalus bangle dipengaruhi oleh konsentrasi dan interaksi antara 2.4-D dan kinetin. Eksplan yang dikultur pada media dengan 1 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin menghasilkan waktu inisiasi kalus tercepat (10.8 HST) dan persentase pembentukan kalus tertinggi (100%). Eksplan yang dikultur pada media 1 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin dan 2 ppm 2.4-D - 0.5 ppm kinetin menghasilkan morfologi kalus yang baik dan embriogenik (warna putih dengan tekstur remah). Kalus yang dihasilkan merupakan solusi untuk mengatasi masalah perbanyakan bangle sehingga kebutuhan akan bangle untuk pengobatan tradisional dapat terpenuhi. Kalus yang dihasilkan juga bermanfaat untuk memperoleh metabolit sekunder dari bangle.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, A.S., R.N. Pudake. 2019. Sterilization procedure and callus regeneration in black turmeric (*Curcuma caesia*). Agri. Sci. Diges. 39(2): 96-101. Doi: <https://doi.org/10.18805/ag.D-4714>.
- Afiyah, N.N., M.I. Surya, L. Ismaini, E. Azizah, N.W. Saputro. 2022. Inisiasi kalus secara *In Vitro* dari daun *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. Buletin Kebun Raya. 23(5): 121-130. Doi: <https://doi.org/10.55981/bkr.2022.801>.
- Anggraeni, D., L. Ismaini, M.I. Surya, H. Rahmi, N.W. Saputro. 2022. Inisiasi kalus daun *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd pada beberapa kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid dan Benzyl Adenine. J. Agrikultura. 33(3): 276-288. Doi: <https://doi.org/10.24198/agrikultura.v33i3.40540>.
- Aprilia, M., N. Setiari, Y. Nurchayati. 2022. Callus development from Potato (*Solanum tuberosum*) Stem at various concentrations of Benzylaminopurine. Biosaintifika. 14(2): 219-225. Doi: <http://dx.doi.org/10.15294/biosaintifika.v14i2.35703>.
- Arieswari, N.N.N., I.A. Astarini, N.P.A. Astiti, J. Pramana. 2018. *In Vitro* callus induction of 'Shiraz' Grape (*Vitis vinifera* L.) using different medium and growth regulator combination. Int. J. Biosciences and Biotechnology. 6(1): 25-33. Doi: <https://doi.org/10.24843/IJBB.2018.v06.i01.p03>.
- Chongmelaxme, B., R. Sruamsiri, P. Dilokthornsakul, T. Dhipayom, C. Kongkaew, S. Saokaew, A. Chuthaputti, N. Chaiyakunapruk. 2017. Clinical effects of *Zingiber cassumunar* (Plai): A systematic review. Complement. Ther. Med. 35(9): 70-77. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2017.09.009>.
- Durroh, B., Y. Winarti. 2020. Pemanfaatan air kelapa dan aplikasi pupuk organik untuk merangsang pertumbuhan bibit Tebu G3 hasil kultur jaringan. Agro Bali. 3(1): 21-27. Doi: <https://doi.org/10.37637/ab.v3i1.415>.
- Ekawati, Y., A. Anggraeni, A.D. Prawestri, 2022. Induksi kalus sisik umbi *Lilium longiflorum* Thunb. oleh auksin dan sitokinin, serta respons pertumbuhannya secara *In Vitro*. Agrosaintek. 6(2): 28-37. Doi: <https://doi.org/10.33019/agrosaintek.v6i2.316>.
- Gultom, M.S., N. Anna, E.B.M. Siregar. 2012. Respon eksplan biji Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) terhadap pemberian IAA secara *In Vitro*. Peromona Forestry Science Journal. 1: 1-6.
- Gurav, S.S., N.S. Gurav, A.T. Patil, N.J. Duragkar. 2019. Effect of explant source, culture media, and growth regulators on callogenesis and expression of secondary metabolites of *Curcuma Longa*. J. Herbs Spices Med. Plants. 26(2): 172-190. Doi: <https://doi.org/10.1080/10496475.2019.1689542>.
- Han, A.R., H. Kim, D. Piao, C.H. Jung, E.K. Seo. 2021. Phytochemicals and bioactivities of *Zingiber cassumunar* Roxb. Molecules. 26(4): 1-16. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26082377>.
- Hidayah, V.N., P. Dewanti. 2023. Pengaruh kombinasi BAP (6-Benzylaminopurine) dan 2,4-D (Dichlorophenoxyacetic Acid) untuk Pembentukan Kalus Tebu (*Saccharum officinarum* L.) melalui metode *Thin Cell Layer*. J. Agrotek Tropika. 11(1): 89-95. Doi: <http://dx.doi.org/10.23960/jat.v11i1.5141>.
- Julianti, R.F., Y. Nurchayati, N. Setiari. 2021. Pengaruh konsentrasi sukrosa dalam medium MA terhadap kandungan flavonoid kalus tomat (*Solanum lycopersicum* syn *Lycopersicon esculentum*). Metamorfosa. 8(1): 141-149. Doi: <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2020.v08.i01.p015>.
- Laila, F.N., E.S. Savitri. 2014. Produksi metabolit sekunder Steviosida pada kultur kalus Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert. M.) dengan penambahan ZPT 2,4-D dan PEG (Polyethylene Glykol) 6000 pada media MS (Murashige & Skoog). El-Hayah. 4(2): 57-65. Doi: <https://doi.org/10.18860/elha.v4i2.2627>.
- Mahadi, I., W. Syafi'i, Y. Sari. 2016. Induksi kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) menggunakan hormon 2,4-D dan BAP dengan metode *In Vitro*. JIPI. 21(2): 84-89. Doi: <https://doi.org/10.18343/jipi.21.2.84>.
- Marthani, Q.K.A., Y.U. Anggraito, E.S. Rahayu. 2016. Kalogenesis eksplan setengah biji Koro Benguk (*Mucuna pruriens* L.) secara *In Vitro* menggunakan BAP dan NAA. Life Science. 5(1): 72-78.
- Miri, S.M. 2020. Micropropagation, callus induction and regeneration of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Open Agric. 5: 75-84. Doi: <https://doi.org/10.1515/opag-2020-0008>.
- Norikura, T., S. Kajiya, M. Sugawara, M. Kubo, Y. Fukuyama, S. Sato. 2020. *cis*-Banglone, A Bangle (*Zingiber purpureum*)-derived bioactive compound, promotes mitochondrial biogenesis and glucose uptake by activating the IL-6/AMPK signaling pathway in C2C12 skeletal muscle cells. J. Funct. Foods. 64(1). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.10363>.

- Oktafiana, N., S. Ummayah, W.N. Ningtyas, B. Sugiharto. 2022. Regenerasi kalus embriogenik Sorgum (*Sorghum bicolor*) menggunakan kombinasi ZPT dan mikronutrien. Agriprima. 6(1): 54-61. Doi: <https://doi.org/10.25047/agriprima.v4i2.375>.
- Prashariska, K., A. Pitoyo, Solichatun. 2021. Pengaruh *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) dan *Benzyl Amino Purine* (BAP) terhadap induksi dan deteksi alkaloid kalus Kamillen (*Matricaria chamomilla* L.). Innofarm. 23(2): 104-114.
- Purba, R.V., H. Yuswanti, I.N.G. Astawa. 2017. Induksi kalus eksplan daun tanaman Anggur (*Vitis vinifera* L.) dengan aplikasi 2.4-D secara *In Vitro*. E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika. 6(2): 218-228.
- Putra, I.M.A., A. Purwito, M. Kosmiatin. 2015. Propagasi mikro dan sambung mikro Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*) Garut hasil mutagenesis *In Vitro* dengan batang bawah *Japansche Citroen*. J. Hort. Indonesia. 6(2): 99-108. Doi: <https://doi.org/10.29244/jhi.6.2.99-108>.
- Rasud, Y., Bustaman. 2020. Induksi kalus secara *In Vitro* dari daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dalam media dengan berbagai konsentrasi auksin. JIPI. 25(1): 67-72. Doi: <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>.
- Rumiyati, Sismindari, E. Semiarti, A. F. Milasari, D.K. Sari, N. Fitriana, S. Galuh. 2017. Callus induction from various organs of dragon fruit, apple, and tomato on some mediums. Pak. J. Biol. Sci. 20(5): 244-252. Doi: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2017>.
- Sanatombi, R., K. Sanatombi. 2016. Biotechnology of *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex A. Dietr.: A Review. J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants. 4(3): 1-4. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.09.001>.
- Setiawati, T., A.L. Astuti, M. Nurzaman, N. Ratningsih. 2021. Analisis pertumbuhan dan kandungan total flavonoid kultur kalus Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) dengan Pemberian Asam 2.4-Diklorofenoksiasetat (2.4-D) dan Air Kelapa. J. Pro-Life. 8(1): 32-44. Doi: <https://doi.org/10.33541/jpvol6Iss2pp102>.
- Silvina, F., Isnaini, W. Ningsih. 2021. Induksi kalus daun Binahong Merah (*Basella rubra* L.) dengan pemberian 2.4-D dan kinetin. J. Agro. 8(2): 274-285. Doi: <https://doi.org/10.15575/14273>
- Sugiyarto, L., P.C. Kuswandi. 2014. Pengaruh 2.4-D *Diklorofenoksiasetat* (2.4-D) dan *Benzil Aminopurin* (BAP) terhadap pertumbuhan kalus daun Binahong (*Anredera cordifolia* L.) serta analisis kandungan flavonoid total. J. Penelitian Saintek. 19(1): 23-30. Doi: <https://doi.org/10.21831/jps.v19i1.2322>.
- Teoh, S.C., S. Subramaniam, B.L. Chew. 2023. The effects of 2.4-D *ichlorophenoxyacetic Acid* on the Induction of callus from Cotyledon and Hypocotyl explants of Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*). Malaysian Applied Biology. 52(1): 61-72. Doi: <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v52i1.2444>.
- Wahyuni, A., B. Satria, A. Zainal. 2020. Induksi kalus gaharu dengan NAA dan BAP secara *In Vitro*. Agrosains. 22(1): 39-44. Doi: <https://doi.org/10.20961/agsjpa.v22i1.36007>.
- Waryastuti, D.E., L. Setyobudi, T. Wardiyati. 2017. Pengaruh tingkat konsentrasi 2.4-D dan BAP pada media MS terhadap induksi kalus embriogenik Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). J. Produksi Tanaman. 5(1): 140-149.