

**INDUKSI KALUS JINTAN HITAM (*Nigella sativa* L.) DENGAN
KOMBINASI 2, 4-Dikhlorofenoksiasetat (2, 4-D) DAN
Benzyl Amino Purine (BAP) SECARA *IN VITRO***

S K R I P S I

Oleh:

PUTRI ANDREANI

NPM: 2004290061

Program Studi: AGROTEKNOLOGI



UMSU

Unggul | Cerdas | Terpercaya

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
MEDAN
2024**

**INDUKSI KALUS JINTAN HITAM (*Nigella sativa* L.) DENGAN
KOMBINASI 2, 4-Dikhlorofenoksiasetat (2,4-D) DAN
Benzyl Amino Purine (BAP) SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

**PUTRI ANDREANI
2004290061
AGROTEKNOLOGI**

**Disusun Sebagai Salah Satu Syarat untuk Menyelesaikan Stara (S1) pada
Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara**

Pembimbing:



Assoc. Prof. Dr. Daffi Mawar Tarigan, S.P., M.Si.

Disahkan Oleh:

Dekan



Assoc. Prof. Dr. Daffi Mawar Tarigan, S.P., M.Si.

Tanggal lulus : 17 oktober 2024

PERNYATAAN

Dengan ini saya:

Nama : Putri Andreani

NPM : 2004290061

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi dengan judul “**Induksi Kalus Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) dengan Kombinasi 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Amino Purine (BAP) secara *in vitro***” adalah berdasarkan hasil penelitian, pemikiran dan pemaparan asli dari saya sendiri. Jika terdapat karya orang lain, saya akan mencantumkan sumber yang jelas.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari ternyata ditemukan adanya penjiplakan (plagiarisme), maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah saya peroleh. Demikian pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar tanpa paksaan dari pihak manapun.

Medan, November 2024

Yang menyatakan



RINGKASAN

Putri Andreani, “Induksi Kalus Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) dengan Kombinasi 2,4-Dikhlorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Amino Purine (BAP) secara *in vitro*” Dibimbing oleh: Assoc. Prof. Dr. Dafni Mawar Tarigan, S.P., M.Si. selaku pembimbing. Penelitian dilaksanakan di laboratorium kultur jaringan Alifa Agricultural Research Center (ALIFA-ARC), Jl. Brigjend Katamso No. 454/51C, Kel. Kampung Baru, Kec. Medan Maimun, Kota Medan. Pada bulan Juli sampai September 2024. Tujuan penelitian untuk mengetahui efektivitas kombinasi 2,4-Dikhlorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Amino Purine (BAP) secara *in vitro*. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 faktor dan 3 ulangan. Faktor pertama pemberian konsentrasi 2,4-D yaitu: D₀: tanpa hormon (Kontrol), D₁: 1 mg/l, D₂: 2 mg/l dan D₃: 3 mg/l, faktor kedua pemberian BAP yaitu : B₀ tanpa hormon (Kontrol), B₁: 1 mg/l, B₂: 2 mg/l dan B₃: 3 mg/l. Parameter yang diamati adalah persentase eksplan terkontaminasi (%), persentase terbentuknya kalus (%), hari muncul kalus (hari), warna kalus, tekstur kalus dan berat basah kalus (g). Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan uji beda rata-rata menurut Duncan’s Multiple range Test (DMRT) pada α 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan 2,4-D memberikan pengaruh nyata pada berat basah kalus pada perlakuan D₁(1 mg/l). Perlakuan BAP (*Benzyl Amino Purine*) memberikan pengaruh nyata terhadap hari muncul kalus dan berat basah kalus B₂ (2 mg/l), sedangkan interaksi antara konsentrasi 2,4-D dan BAP berpengaruh nyata terhadap hari muncul kalus pada kombinasi perlakuan 2,4-D 2 mg/l dan BAP 0 mg/l (D₂B₀) menghasilkan nilai hari muncul kalus tercepat yaitu 14 hari. Untuk parameter pada warna kalus dominan menghasilkan warna hijau kecoklatan dan pada parameter tekstur kalus, 57 kalus bertekstur kompak, 26 kalus bertekstur remah dan 13 kalus tidak berbentuk kalus.

SUMMARY

Putri Andreani, "**Induction of Callus of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) with a Combination of 2,4-Dichlorophenoxyacetate (2,4-D) and Benzyl Amino Purine (BAP) in Vitro**" Supervised by: Assoc. Prof. Dr. Dafni Mawar Tarigan, S.P., M.Si. as supervisor. The research was carried out at the tissue culture laboratory of the Alifa Agricultural Research Center (ALIFA-ARC), Jl. Brigjend Katamso No. 454/51C, Kel. Kampung Baru, Kec. Medan Maimun, Kota Medan. From July to September 2024. The aim of the research is to determine the effectiveness of the combination of 2,4-Dichlorophenoxyacetate (2,4-D) and Benzyl Amino Purine (BAP) in Vitro. The research uses a factorial Completely Randomized Design (CRD) consisting of 2 factors and 3 repetitions. The first factor for administering 2,4-D concentration is: D_0 : no hormones (Control), D_1 : 1 mg/l, D_2 : 2 mg/l and D_3 : 3 mg/l, the second factor for administering BAP is: B_0 no hormones (Control), B_1 : 1 mg/l, B_2 : 2 mg/l and B_3 : 3 mg/l. The parameters observed were the percentage of contaminated explants (%), percentage of callus formation (%), callus formation time (days), callus color, callus texture and callus wet weight (g). Observation data were analyzed using the mean difference test according to Duncan's Multiple range Test (DMRT) at α 5%. The results showed that the 2,4-D treatment had a significant effect on the wet weight of callus in the D_1 treatment (1 mg/l). The BAP (Benzyl Amino Purine) treatment had a significant effect on the day callus appeared and the wet weight of callus B_2 (2 mg/l), while the interaction between the concentration of 2,4-D and BAP had a significant effect on the day callus appeared in the 2,4- treatment combination. D_2 2 mg/l and BAP 0 mg/l (D_2B_0) produce the fastest value for the day callus appears, namely 14 days. For the parameter, the dominant callus color produces a brownish green color and for the callus texture parameter, 57 callus have a compact texture, 26 callus have a crumb texture and 13 callus do not form a callus.

RIWAYAT HIDUP

Putri Andreani, dilahirkan pada tanggal 16 Juli 2002 di Medan. Anak dari pasangan Joko Pramono S. dan Ramadhani yang merupakan anak ke- 1 dari 3 bersaudara.

Pendidikan yang telah ditempuh adalah sebagai berikut:

1. Tahun 2014 menyelesaikan Sekolah Dasar (SD) di SD Swasta Singosari, Kecamatan Deli Tua.
2. Tahun 2017 menyelesaikan Sekolah Menengah Pertama (SMP) di Wage Rudolf Supratman 2 Medan, Kecamatan Medan Johor.
3. Tahun 2020 menyelesaikan Sekolah Menengah Kejuruan (SMK) di SMK Negeri 3 Medan, Kecamatan Medan Amplas.
4. Tahun 2020 melanjutkan Pendidikan Strata 1 (S1) pada Program Studi Agroteknologi di Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

Kegiatan yang pernah diikuti selama menjadi mahasiswa Fakultas Pertanian UMSU antara lain:

1. Mengikuti kegiatan Pengenalan Kehidupan Kampus bagi Mahasiswa Baru Muhammadiyah (PKKMB) Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara 2020.
2. Mengikuti Masa Ta'aruf (Masta) Pimpinan Komisariat Ikatan Mahasiswa IV Muhammadiyah Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara secara online Tahun 2020.
3. Mengikuti Kegiatan Kajian Intensif Al-Islam dan Kemuhammadiyah (KIAM) oleh Badan Al-Islam dan Kemuhammadiyah (BIM) tahun 2020.

4. Menjadi Asisten Praktikum mata kuliah Ilmu Hama dan Penyakit Tanaman pada tahun ajaran 2023 dan 2024 genap.
5. Menjadi Asisten Praktikum mata kuliah Budidaya Tanaman Obat dan Rempah pada tahun ajaran 2024 ganjil.
6. Melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di PT. Perkebunan Nusantara IV Unit Usaha Padang Matinggi, Kecamatan Bosar Maligas, Kabupaten Simalungun, Provinsi Sumatera Utara pada Bulan Agustus Tahun 2023.
7. Melaksanakan Kegiatan KKN (Kuliah Kerja Nyata) UMSU 2023 di Desa Adil Makmur, Kecamatan Bosar Maligas, Kabupaten Simalungun.
8. Mengikuti Ujian *Test of English as a Foreign Language* (TOEFL) di Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Tahun 2024.
9. Melaksanakan penelitian dan praktik skripsi di Laboratorium Kultur Jaringan ALIFA-ARC, Jl. Brigjend Katamso, Kecamatan Medan Maimun.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan nikmat kesempatan dan kekuatan bagi penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Induksi Kalus Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) dengan Kombinasi 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Amino Purine (BAP) secara *in vitro*”.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Assoc. Prof. Dr. Dafni Mawar Tarigan, S.P., M.Si., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara dan selaku Pembimbing.
2. Ibu Prof. Dr. Ir. Wan Arfiani Barus, M.P., selaku Wakil Dekan I Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
3. Bapak Akbar Habib, S.P., M.P., selaku Wakil Dekan III Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
4. Ibu Dr. Rini Sulistiani, S.P., M.P, selaku Ketua Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
5. Seluruh Staf Pengajar dan Pegawai di Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
6. Kedua orang tua penulis Ayahanda Joko Pramono S. dan Ibunda Ramadhani yang telah memberikan dukungan baik secara moral dan material serta doa yang tiada henti-hentinya.
7. Sahabat memotivasi Yuri Azhary, Wita, Delima, Dinda, Rika, Fiona, Billa dan Setia yang turut membantu dan menemani dalam penelitian skripsi ini serta bantuan, dukungan dan motivasi untuk saya.
8. Teman-teman seperjuangan AGT 2020.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna dan masih banyak kekurangan baik dari segi susunan kalimat maupun tata bahasanya. Oleh karena itu penulis menerima segala masukan dan saran dengan tangan terbuka untuk menyempurnakan skripsi ini.

Medan, November 2024

Penulis

DAFTAR ISI

RINGKASAN.....	ii
SUMMARY.....	iii
RIWAYAT HIDUP.....	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
PENDAHULUAN.....	1
Latar Belakang.....	1
Tujuan Penelitian.....	3
Kegunaan Penelitian.....	4
TINJAUAN PUSTAKA.....	5
Tanaman Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> .L).....	5
Kandungan dan Manfaat Tanaman Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> L.).....	6
Perbanyakkan Tanaman Kultur Jaringan.....	8
Media Kultur.....	9
Eksplan.....	9
Peranan 2,4-D dan BAP.....	11
Hipotesis Penelitian.....	15
BAHAN DAN METODE.....	16
Tempat dan Waktu.....	16
Bahan dan Alat.....	16
Metode Penelitian.....	16
Metode Analisis Data.....	17
Pelaksanaan Penelitian	18
Sterilisasi Alat dan Bahan	18
Pembuatan Larutan Stok	18
Pembuatan Media.....	19
Penyediaan Eksplan.....	20
Sterilisasi dan Penanaman Eksplan.....	20

Pemeliharaan.....	21
Parameter Pengamatan.....	21
Presentasi Eksplan Tumbuh Berkalus (%).....	21
Presentasi Eksplan Terkontaminasi (%)	21
Hari Muncul Kalus (Hari).....	21
Warna Kalus.....	22
Tekstur Kalus	22
Berat Basah Kalus (g)	22
HASIL DAN PEMBAHASAN	23
KESIMPULAN DAN SARAN	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	42

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul	Halaman
1.	Persentase Ekspan Tumbuh Berkalus.....	23
2.	Hari Muncul Kalus Eksplan Jintan hitam pada Perlakuan 2,4-D dan BAP	26
3.	Warna Kalus Eksplan Jintan Hitam pada Perlakuan 2,4-D dan BAP.....	29
4.	Tekstur Kalus Eksplan Jintan Hitam pada Perlakuan 2,4-D dan BAP.....	31
5.	Berat Basah Kalus Eksplan Jintan Hitam pada Perlakuan 2,4-D dan BAP pada Umur 8 MST.....	34

DAFTAR GAMBAR

No	Judul	Halaman
1.	Tanaman Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> L.).....	5
2.	Eksplan Tanaman Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> L.) Umur 8 MST...	23
3.	Hubungan Hari Muncul Kalus pada Eksplan Tanaman Jintan Hitam dengan Perlakuan BAP (hari).....	26
4.	Hubungan Hari Muncul Kalus pada Eksplan Tanaman Jintan Hitam dengan Kombinasi Perlakuan 2,4-D dan BAP (hari).....	27
5.	Indikator Warna Kalus Terbaik Putih Cerah.....	29
6.	Warna Kalus Eksplan Daun Jintan Hitam (<i>Nigella sativa</i> L.) Umur 8 MST.....	30
7.	Tekstur Kalus Eksplan Daun Tanaman Jintan Hitam Umur 8 MST.....	33
8.	Hubungan Berat Basah Kalus pada Eksplan Tanaman Jintan Hitam dengan Perlakuan 2,4-D Umur 8 MST (g).....	35
9.	Hubungan Berat Basah Kalus pada Eksplan Tanaman Jintan Hitam dengan Perlakuan BAP Umur 8 MST (g).....	36

DAFTAR LAMPIRAN

No	Judul	Halaman
1.	Komposisi Media <i>Murashige dan Skoog</i>	42
2.	Bagan Penelitian.....	43
3.	Bagan Tanaman Sampel.....	44
4.	Data Rataan Pengamatan Hari Muncul Kalus (hari).....	45
5.	Daftar Sidik Ragam Pengamatan Hari Muncul Kalus (hari).....	45
6.	Data Rataan Pengamatan Berat Basah Kalus (g) 8 MST.....	46
7.	Daftar Sidik Ragam Pengamatan Berat Basah Kalus (g) 8 MST..	46
8.	Perkembangan Kalus Tanaman Jintan Hitam Umur 2,4,6, dan 8 MST.....	47

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Transplantasi satu varietas tanaman ke varietas tanaman lain, baik secara seksual maupun aseksual, dikenal sebagai perbanyakan tanaman. Perbanyakan vegetatif merupakan strategi reproduksi alami untuk tanaman tertentu, tetapi dapat juga dilakukan secara buatan. Manfaat mendasar dari perbanyakan vegetatif adalah keturunannya merupakan replika genetik dari tanaman induk, yang berarti hanya ada sedikit perpindahan materi genetik di antara keduanya. Dalam perbanyakan tanaman komersial, strategi vegetatif ini penting untuk menghasilkan jenis tanaman yang konsisten dan tanaman berkualitas tinggi. Meskipun perbanyakan vegetatif memudahkan pembudidayaan karena kesamaan genetik, terdapat risiko cedera atau kematian pada seluruh tanaman jika klon sensitif terhadap penyakit tertentu. Widoretno (2019) berpendapat bahwa ini berarti keterlibatan manusia diperlukan untuk pemeliharaan varietas genetik.

Jintan hitam atau *Habbatus sauda*, adalah biji-bijian dengan khasiat terapeutik yang bermanfaat secara universal. Satu hal yang pasti: jintan hitam memiliki korelasi langsung dengan kekebalan tubuh manusia. Jintan hitam ditanam di beberapa tempat di dunia, termasuk India, dan digunakan dalam pengobatan Islam di wilayah Mediterania. Kelompok minyak atsiri, sebagian besar monoterpena, menyusun sekitar 0,5-2,6% dari total kandungan biji jintan hitam. Kesulitan muncul karena biji jintan hitam sangat diminati di Indonesia, yang membuka pintu bagi tahap produksi yang lebih maju dengan menggunakan metode kultur jaringan. Kultur jaringan memberikan peluang untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder, yang disebabkan oleh tidak adanya pigmen pada sel

yang dihasilkan (Kementerian Perdagangan Republik Indonesia, 2017).

India, Mesir, dan berbagai negara di Timur Tengah memasok jintan hitam ke Indonesia. Dalam kurun waktu 2021 hingga 2022, Indonesia mengalami peningkatan impor jintan hitam secara keseluruhan. Impor jintan hitam meningkat dari 2.166.499 kg pada tahun 2021 menjadi 2.368.021 kg pada tahun 2022, dengan nilai 2.626.383 dolar AS, menurut statistik dari BPS Indonesia. Dengan masa panen 60-90 HST dan kemampuan menghasilkan 10 biji per rumpun kelopak bunga per tanaman, jintan hitam sangat diminati di Indonesia, seperti yang terlihat pada gambar di atas. Akibatnya, jumlah biji yang dipanen berbanding lurus dengan jumlah perbanyak tanaman yang dilakukan; lebih khusus lagi, jumlah biji yang dibuat di setiap kelopak tanaman jintan hitam. Dalam hal perbanyak tanaman yang efisien waktu, pendekatan kultur jaringan sangat penting untuk pengembangan jintan hitam (Setiawati *et al.*, 2018). Salah satu manfaat penting dari kultur jaringan adalah efisiensi dan kecepatan dalam menghasilkan spesies tanaman baru.

Metode ini memanfaatkan media kultur yang kaya nutrisi tanaman, seperti agar atau gel, untuk menghasilkan banyak tanaman yang secara genetik tidak dapat dibedakan dari induknya. Keturunan ini kemudian dapat dibiakkan secara selektif untuk menunjukkan sifat yang diinginkan, seperti peningkatan ketahanan terhadap hama dan penyakit (Ashar *et al.*, 2023). Hormon auksin 2,4-D menawarkan banyak keuntungan, termasuk peningkatan tekanan osmotik, peningkatan pertumbuhan dan perkembangan kalus, penambahan kapasitas sel, pengurangan tekanan pada dinding sel, stimulasi sintesis protein, peningkatan fleksibilitas, dan fasilitasi pembentukan dinding sel. Meskipun BAP adalah

hormon sitokinin yang membantu tanaman membelah sel, membantu perkembangan embrio, dan menunda penuaan organ dengan menghambat kerusakan klorofil. Kalus bertekstur padat dapat dicapai dengan menggunakan dosis tinggi 2,4-D dalam kultur jaringan (Rasud *et al.*, 2019). Wiraatmaja (2017) menyatakan bahwa auksin dan sitokinin merupakan dua hormon endogen tanaman yang berfungsi secara berlawanan atau antagonis. Hormon endogen ini dapat memengaruhi perkembangan dan pertumbuhan tanaman meskipun tanpa ZPT eksogen.

Untuk membuat struktur organ potensial dari kumpulan sel yang akan berdiferensiasi, eksplan diambil dari jaringan muda yang memiliki sifat meristematik. Jaringan khusus ini memiliki hormon endogen yang sedang mengalami pembelahan aktif, kemudian dikombinasikan dengan hormon auksin (2,4-D) dan sitokinin (BAP) eksogen. Pemanfaatan jaringan yang sedang berkembang secara aktif selama fase pertumbuhan awal untuk tujuan eksplan merupakan praktik yang diterima secara luas. Ardiana (2019) menemukan bahwa penggunaan hormon auksin dan sitokinin secara bersamaan dalam induksi kalus dapat meningkatkan perkembangan dan pertumbuhan kalus serta jumlah metabolit sekunder.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas kombinasi 2, 4-*Diklorofenoksiasetat* (2,4-D) dan *Benzyl Amino Purine* (BAP) terhadap induksi kalus jintan hitam (*Nigella sativa* L.) secara *in vitro*.

Kegunaan Penelitian

1. Induksi kalus *in vitro* dari jintan hitam (*Nigella sativa* L.) dengan menggunakan kombinasi 2,4-D dan BAP dapat dijadikan referensi dalam memperbanyak spesies ini.
2. Sebagai prasyarat untuk menempuh Program Studi Sarjana (S1) di Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
3. Ini berfungsi sebagai sumber bagi individu yang mencari pengetahuan, dibuat untuk meningkatkan penelitian selanjutnya.

TINJAUAN PUSTAKA

Tanaman Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.)

Tanaman jintan hitam telah dikenal sebagai obat herbal selama lebih dari dua ribu tahun. Bijinya merupakan bagian tanaman yang digunakan dalam praktik pengobatan alternatif. Biji tanaman jintan hitam memiliki peran penting dalam bidang pengobatan dan telah digunakan dalam kerangka pengobatan tradisional baik dalam budaya Arab maupun Yunani. Tanaman jintan hitam mulanya berasal dari daerah Eropa Selatan yang dikenal sebagai tanaman rempah yang kemudian mulai ditumbuhkan pada daerah daerah Timur Tengah (Setiawati, 2018).



Gambar 1. Tanaman Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.)

Tanaman yang dikenal sebagai jintan hitam, juga disebut sebagai biji hitam dalam bahasa Inggris dan habatussauda dalam bahasa Arab, termasuk dalam kategori tanaman berbunga majemuk. Jintan hitam, meskipun berasal dari wilayah Mediterania, telah dibudidayakan di berbagai lokasi global, termasuk Afrika

Utara, Arab Saudi, dan beberapa wilayah Asia (Hosseinzadeh, 2017). Tanaman ini dapat mencapai tinggi 20-30 cm, ditandai dengan daun hijau lonjong, yang memiliki ujung dan pangkal runcing, tepi bergerigi, dan urat menyirip. Dedaunan tanaman jintan hitam menunjukkan bentuk lonjong, yang berpuncak pada ujung runcing. Bunganya menunjukkan morfologi koral majemuk, dihiasi dengan benang sari kuning. Klasifikasi tanaman jintan meliputi:

Kingdom : *Plantae*
Super Divisi : *Spermatophyta*
Divisi : *Magnoliophyta*
Class : *Magnoliopsida*
Ordo : *Ranunculales*
Famili : *Ranunculaceae*
Genus : *Nigella*
Spesies : *Nigella sativa* L.

Kandungan dan Manfaat Tanaman Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.)

Jintan hitam menonjol sebagai tanaman yang sangat menarik, diteliti secara ekstensif karena sifat fotokimia dan farmakologisnya. Ekstrak jintan hitam telah digunakan secara luas dalam mengatasi berbagai penyakit yang berhubungan dengan manifestasi perut, seperti diare, ketidaknyamanan perut, dan perut kembung. Sebuah penelitian yang dilakukan oleh Muhtasib pada tahun 2016 menjelaskan bahwa jintan hitam menunjukkan berbagai khasiat yang bermanfaat, termasuk efek anti inflamasi, anti bakteri, anti kanker, anti parasit, anti jamur, dan anti hipertensi. Selain aplikasinya di sektor pengobatan herbal dan tradisional, jintan hitam bermanfaat dalam industri penghancuran buah, serta dalam produksi

kecap dan berbagai bumbu masak (Balittri, 2019).

Jintan hitam memiliki komposisi yang kompleks dan beragam, meliputi asam amino, karbohidrat, serta minyak atsiri dan minyak atsiri. *Timokuinon* (TQ) merupakan salah satu senyawa bioaktif yang terdapat dalam jintan hitam. Minyak atsiri mengandung TQ, yang dianggap sebagai komponen aktif yang bertanggung jawab atas berbagai efek farmakologis, seperti sifat anti inflamasi dan anti bakteri, antara lain. Manfaat yang diberikan oleh jintan hitam pada dasarnya terkait dengan rangkaian senyawa yang terdapat dalam bijinya. Komposisi rumit biji jintan hitam meliputi berbagai minyak atsiri, minyak campuran, protein, dan asam amino, seperti *albumin, globulin, lisin, leusin, isoleusin, valin, glisin, alanin, fenilalanin, arginin, asparagin, sistin*, asam glutamat, asam aspartat, prolin, triptofan, dan tirosin. Selain itu, jintan hitam mengandung gula pereduksi, cairan kental, alkaloid, asam organik, tanin, resin, glukosida toksik, metarbine, melatin, bersama dengan berbagai mineral dan vitamin termasuk asam askorbat, *tiamin, niasin, piridoksin*, dan asam folat (Salem, 2020).

Jintan hitam mengandung berbagai asam lemak, seperti asam linoleat, asam oleat, asam palmitat, asam stearat, asam linolenat, dan asam miristat. Analisis asam amino dan asam lemak menunjukkan bahwa jintan hitam memiliki profil nutrisi yang sangat tinggi. Jintan hitam mengandung delapan jenis dari sepuluh asam amino esensial dan tujuh jenis dari sepuluh asam amino nonesensial. Selain itu, jintan hitam memiliki konsentrasi asam lemak esensial yang signifikan, terutama asam linoleat dan linolenat, yang sangat penting dalam sintesis prostaglandin E1, sehingga membantu dalam keseimbangan dan fortifikasi sistem kekebalan tubuh (Badary, 2019).

Perbanyakan Tanaman Kultur Jaringan

Perkembangan teknik kultur jaringan dapat ditelusuri hingga tahun 1838, ketika Sachwan dan Schleiden memperkenalkan teori totipotensi, yang menyatakan bahwa sel memiliki kapasitas bawaan untuk beregenerasi secara otonom menjadi tanaman lengkap. Usulan yang disajikan menjadi dasar dugaan Harbeland pada awal abad ke-20, yang menyatakan bahwa jaringan tanaman dapat diisolasi dengan mengubah kondisi lingkungan dan faktor nutrisi (Zulkarnain, 2019).

Metodologi yang terkait dengan perbanyakan tanaman melalui teknik kultur jaringan meliputi formulasi media dan fase inisiasi, yang memerlukan ekstraksi eksplan dari wilayah tertentu tanaman yang dibudidayakan. Sterilisasi berkelanjutan mengharuskan semua prosedur dalam kultur jaringan dilakukan dalam lingkungan steril atau Laminar Air Flow Cabinet, dengan menggunakan instrumen steril. Fase berikutnya memerlukan perbanyakan, khususnya metode penambahan jumlah tanaman prospektif dengan menempatkan eksplan dalam media pertumbuhan. Prosedur ini dilakukan di dalam Kabinet Aliran Udara Laminar untuk mengurangi risiko kontaminasi yang dapat menghambat keberhasilan kemajuan eksplan. Tahap perakaran ditandai dengan munculnya pertumbuhan akar di eksplan, yang menandakan bahwa proses kultur jaringan berjalan secara efektif. Tahap akhir aklimatisasi melibatkan pemindahan eksplan dari lingkungan aseptik ke bedengan yang telah ditentukan. Pemindahan dilakukan dengan perhatian yang cermat dan pendekatan bertahap, khususnya dengan menerapkan penutup (Armini *et al.*, 2017).

Media Kultur

Pentingnya media kultur dalam proses kultur sel dan kultur jaringan tidak dapat dilebih-lebihkan. Media kultur yang bermutu terdiri dari kombinasi makronutrien dan mikronutrien yang seimbang, disajikan dalam kadar dan rasio tertentu, dilengkapi dengan sumber energi yang dapat mengandung satu atau dua jenis zat pengatur tumbuh dan vitamin. Media Murashige dan Skoog, yang dikembangkan oleh Toshio Murashige pada tahun 1962, sering digunakan dalam bidang kultur jaringan. Sebuah penelitian yang dilakukan oleh Sukmadjaja (2021) menunjukkan bahwa, secara umum, media MS yang diperkaya dengan BAP menunjukkan respons yang baik dalam perkembangan embrio somatik, mencapai tingkat 71,4%.

Eksplan

Pemilihan bahan eksplan yang sesuai merupakan faktor penting yang berdampak signifikan terhadap keberhasilan kultur jaringan. Sistem kultur jaringan baru yang mencakup berbagai spesies dan kultivar sering kali memerlukan penyelidikan sistematis terhadap kemampuan intrinsik eksplan yang diperoleh dari setiap jenis jaringan tertentu. Tiga elemen penting yang perlu dipertimbangkan saat memilih bahan eksplan adalah genotipe, usia, dan kondisi fisiologis bahan tersebut. Pemilihan sumber eksplan berdampak besar pada hasil kultur, yang memerlukan upaya cermat untuk menegakkan lingkungan aseptik melalui sterilisasi berbagai bahan kimia.

Dalam bidang kultur jaringan, seseorang dapat melihat munculnya dua jenis kalus yang berbeda: kalus embriogenik dan kalus non-embriogenik. Kalus embriogenik memiliki kapasitas untuk berkembang menjadi tanaman melalui

mekanisme organogenesis atau embriogenesis. Kalus non-embriogenik menunjukkan bentuk kalus yang tidak memiliki kemampuan untuk berkembang menjadi tanaman kecil, yang dibedakan oleh struktur seperti remah yang berdekatan dengan eksplan, yang bebas dari keberadaan embrio somatik. Kalus ini ditandai dengan sifatnya yang basah dan padat, dengan warna hitam kecokelatan yang menunjukkan bahwa ia tidak dapat berkembang lebih lanjut. Warna kalus embriogenik biasanya berwarna putih atau kekuningan, ditandai dengan tekstur yang rapuh (Rusdianto dan Indrianto, 2017).

Pemotongan horizontal menunjukkan kapasitas yang lebih unggul untuk menginduksi pembentukan kalus dibandingkan dengan pemotongan vertikal. Metode pemotongan eksplan horizontal, atau membagi dua eksplan, memfasilitasi kontak yang lebih substansial dengan media dibandingkan dengan pendekatan vertikal. Akibatnya, hal ini meningkatkan penyerapan nutrisi dari media ke dalam eksplan. Eksplan mengandung hormon yang dipadukan dengan kandungan ZPT yang disediakan. Sementara itu, eksplan yang tidak menghasilkan kalus diyakini dipengaruhi oleh perubahan fisiologis, yang menyebabkan penekanan perkembangan kalus. Penghambatan pembentukan kalus dari eksplan dapat dikaitkan dengan ketidakseimbangan konsentrasi ZPT. Ketika kandungan ZPT tidak memadai, hal itu tidak secara efektif mendorong pembentukan kalus (Mellisa dan Febliza, 2018).

Subkultur merupakan fase kritis dalam kerangka strategis kultur jaringan, yang berfungsi sebagai metode yang dijalankan di antara berbagai tahap kultivasi. Konsep subkultur dapat dipahami sebagai pemindahan benda langit kecil dari media tradisional ke media kontemporer dalam batasan Laminar Air Flow

Cabinet, yang tujuan utamanya adalah untuk memotong, memisahkan, dan memperbanyak eksplan ke dalam lingkungan media baru. Proses subkultur dilakukan untuk memastikan bahwa eksplan yang ditanam menerima nutrisi yang cukup yang penting untuk pertumbuhannya (Gunawan, 2018).

Peranan 2,4-D dan BAP

Pentingnya zat pengatur tumbuh dalam teknik kultur jaringan telah menjadi faktor penting yang membentuk lintasan pertumbuhan tanaman budidaya. Efektivitas teknik kultur jaringan bergantung pada pemanfaatan zat pengatur tumbuh (ZPT). Integrasi media dasar dan zat pengatur tumbuh tanaman akan meningkatkan perkembangan eksplan, karena zat pengatur ini memiliki kapasitas untuk merangsang atau menekan proses fisiologis dalam tanaman.

Pentingnya zat pengatur tumbuh dalam kultur jaringan tidak dapat dilebih-lebihkan, karena tidak adanya ZPT dapat menyebabkan pertumbuhan eksplan berkurang drastis atau terhenti sama sekali. Bidang metodologi kultur jaringan mencakup pemanfaatan zat pengatur tumbuh tanaman eksogen, terutama auksin dan sitokinin. *2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D)* merupakan zat pengatur tumbuh tanaman yang tergolong dalam kelompok auksin, yang sering dimanfaatkan dalam teknik kultur jaringan tanaman karena kestabilannya dan ketahanannya terhadap degradasi akibat cahaya atau panas selama prosedur sterilisasi. BAP merupakan zat pengatur tumbuh tanaman yang tergolong dalam kelompok sitokinin, yang berfungsi untuk meningkatkan pembelahan sel, mendorong proliferasi tunas, dan membantu morfogenesis tunas (Indria *et al.*, 2016).

Pemanfaatan *2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetat)* berfungsi sebagai zat pengatur tumbuh tanaman dalam media kultur jaringan, sehingga mendorong

stimulasi perkembangan dan pertumbuhan kalus. Penggabungan 2,4-D ke dalam media pertumbuhan akan mendorong pembelahan dan perluasan sel dalam eksplan, sehingga meningkatkan integritas struktural dan perkembangan kalus (Rahayu *et al.*, 2018).

2,4-D berfungsi sebagai pengatur auksin yang poten dalam perkembangan gugus yang dapat mempengaruhi pembentukan kalus, serta perkembangan akar atau pucuk, sehingga meningkatkan proses morfogenesis kalus dan memperlancar interaksi dalam embriogenesis, sekaligus berpotensi mempengaruhi stabilitas genetik sel tanaman (Santoso dan Nursandi, 2023). Berdasarkan hasil penelitian Triana (2020), pembentukan kalus awal teramati pada media yang mengandung 2,4-D pada konsentrasi 0,5 mg/l, 1 mg/l, dan 1,5 mg/l, terjadi pada 7 jam setelah subkultur. Hal ini berdasarkan hasil pengamatan bahwa media 2,4-D merupakan lingkungan yang paling mendukung untuk induksi pembentukan kalus pada jaringan daun binahong. Dalam kultur kalus pegagan, konsentrasi rendah 2,4-D sudah cukup, karena telah diamati bahwa berat basah kalus rata-rata berkurang dengan konsentrasi 2,4-D yang tinggi (khususnya pada 3 mg/l dan 5 mg/l). Perkembangan kalus pegagan yang kuat dicapai melalui penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D pada konsentrasi rendah (0,1 mg/l- 1 mg/l). Penelitian Nazza (2013) menunjukkan bahwa media yang diperkaya dengan 2 mg/l optimal untuk induksi kalus pegagan yang cepat, mencapai hal ini dalam waktu sekitar 1,25 hari.

Fungsi 2,4-D dalam media kultur jaringan memfasilitasi proliferasi dan pembelahan sel dalam eksplan, sehingga memulai proses pembentukan kalus. Konfigurasi zat pengatur tumbuh dapat memengaruhi besarnya kalus yang akan

beregenerasi selama perkembangan tunas. 2,4-D dikenal sebagai auksin sintetis yang banyak digunakan dalam kultur jaringan tanaman, meningkatkan pembelahan dan pemisahan sel melalui penyatuan protein. Khususnya, konsentrasi 2,4-D yang diberikan berkorelasi terbalik dengan jumlah kalus yang terbentuk (Rahardja, 2017).

Kehadiran 2,4-D dalam media kultur jaringan menimbulkan respons awal yang ditandai dengan pembentukan kalus, yang merupakan proses dedifferensiasi. Kalus merupakan agregasi sel yang kompleks yang dimulai sebagai jaringan yang dirancang untuk menutupi luka, di mana sel-sel awalnya mengalami dedifferensiasi. Pengenalan nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam media kultur jaringan dapat merangsang sel tanaman, yang biasanya bersifat autotrofik, untuk bertransisi ke keadaan heterotrofik, yang mengakibatkan pembelahan sel yang tidak terduga yang mengarah pada pembentukan massa sel atau kalus yang tidak teratur (Nurdiansyah, 2019). Sitokinin merupakan kategori zat pengatur tumbuh yang memainkan peran penting dalam memulai proses pembelahan sel.

Kategori sitokinin yang sering digunakan dalam kultur jaringan meliputi 2-*Ip* (*Isopentenyl adenine*), BA (*Benzyl Adenine*) atau BAP (*Benzyl Amino Purine*), zeatin, dan kinetin. Meskipun demikian, BAP muncul sebagai pilihan yang dominan, karena aksesibilitasnya, efikasi yang lebih unggul dibandingkan sitokinin lainnya, dan sifat yang konsisten. BAP merupakan pengatur pertumbuhan tanaman yang berasal dari kelompok sitokinin, yang sering digunakan dalam media kultur *in vitro*. Kategori sitokinin ini memainkan peran penting dalam proses pembelahan sel dan mendorong proliferasi tunas. Pemberian BAP pada konsentrasi yang tepat akan meningkatkan proses pembentukan sel.

Efektivitas konsentrasi BAP menunjukkan variasi yang cukup besar dalam kemampuannya untuk menginduksi pembentukan dan pertumbuhan kalus di berbagai spesies tanaman yang tumbuh secara *in vitro*. BAP menunjukkan kemiripan struktural dengan kinetin dan, di luar pengaruhnya terhadap pertumbuhan tunas, berkontribusi secara signifikan terhadap pertumbuhan dan proliferasi kalus (Lailana dan Paramita, 2023).

Penelitian yang dilakukan oleh Rosyidah *et al.* (2018) menunjukkan bahwa kombinasi 2,4-D pada konsentrasi 1 mg/l dan BAP pada 1 mg/l memiliki dampak signifikan pada waktu induksi kalus daun melati (*Jasminum sambac*) secara *in vitro*, dengan pertumbuhan kalus optimal diamati pada hari keenam induksi. Investigasi Mahadi (2016) mengungkapkan bahwa peningkatan 2,4-D menjadi 2 mg/l, bersama dengan BAP pada 2 mg/l, menghasilkan hasil yang paling baik dalam kalus yang dikultur. Aplikasi 2,4-D 2 mg/l bersama dengan BAP pada konsentrasi 1 dan 2 mg/l menghasilkan kalus remah visual yang jauh lebih baik dibandingkan dengan pilihan perawatan lainnya. Integrasi 2,4-D dan BAP ke dalam media secara nyata meningkatkan laju pertumbuhan kalus.

Peningkatan konsentrasi 2,4-D menunjukkan korelasi positif dengan laju pertumbuhan kalus yang diamati. Pemberian auksin sangat penting untuk plastisitas dan perkembangan dinding sel, karena mendorong pelepasan ion H⁺ ke dalam dinding sel. Masuknya ion H⁺ menyebabkan penurunan pH dinding sel, yang selanjutnya mengakibatkan pelonggaran struktur dinding. Perubahan ini meningkatkan plastisitas dan memfasilitasi pertumbuhan. pH rendah memfasilitasi pelonggaran dinding sel dengan mengaktifkan enzim yang memecah ikatan di antara polisakarida pembatas yang ada di dinding sel.

Hipotesis Penelitian

1. Ada pengaruh konsentrasi 2,4-D yang diuji terhadap induksi kalus tanaman jintan hitam secara *in vitro*
2. Ada pengaruh konsentrasi BAP yang diuji terhadap induksi kalus tanaman jintan hitam secara *in vitro*
3. Ada pengaruh interaksi dari kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP yang diuji terhadap induksi kalus tanaman jintan hitam secara *in vitro*

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di laboratorium kultur jaringan Pusat Penelitian Pertanian Alifa (ALIFA-ARC) yang berlokasi di Jl. Brigjend Katamso No.454/51C, Kelurahan Kampung Baru, Kecamatan Medan Maimun, Kota Medan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli hingga September tahun 2024.

Bahan dan Alat

Penelitian ini memanfaatkan daun jintan hitam (*Nigella sativa* L.), alkohol, ZPT auksin berupa *2,4-Diklorofenoksiasetat* (2,4-D), ZPT Sitokinin berupa *Benzyl Amino Purine* (BAP), agar, aquades steril, larutan stok 1,2,3,4 sebagai *Murashige and Skoog* (MS) sebagai media kultur, asam askorbat, aluminium foil, plastic wrap, detergen, klorox sebagai bahan sterilisasi eksplan, tween 20 %, *myo-Inositol* , HCL, NaOH, tisu, kapas, betadine, fungisida, bakterisida, sarung tangan karet dan masker.

Peralatan yang digunakan antara lain gelas ukur, cawan petri, botol kultur, pipet volumetrik, bohlam, gelas kimia, tabung ukur, peralatan pembedahan (pinset, pisau bedah), Laminar Air Flow Cabinet, autoklaf, cangkir, pisau, pembakar Bunsen, penyemprot alkohol, pH meter, bungkus plastik, koran, neraca analitik, pipet tetes, panci pemanas, kompor gas, spatula, pengaduk magnetik, kertas label, kamera, dan alat tulis.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial, dengan dua faktor dan tiga kali ulangan, yaitu:

1. Faktor perlakuan berbagai konsentrasi 2,4-D (D) dengan 4 taraf, yaitu:

D₀ : Tanpa hormon (Kontrol)

D₁ : 1 mg/l

D₂ : 2 mg/l

D₃ : 3 mg/l

2. Faktor perlakuan berbagai konsentrasi BAP (B) dengan 4 taraf, yaitu:

B₀ : Tanpa hormon (Kontrol)

B₁ : 1 mg/l

B₂ : 2 mg/l

B₃ : 3 mg/l

Jumlah kombinasi perlakuan adalah $4 \times 4 = 16$ kombinasi perlakuan, yaitu:

D ₀ B ₀	D ₁ B ₀	D ₂ B ₀	D ₃ B ₀
D ₀ B ₁	D ₁ B ₁	D ₂ B ₁	D ₃ B ₁
D ₀ B ₂	D ₁ B ₂	D ₂ B ₂	D ₃ B ₂
D ₀ B ₃	D ₁ B ₃	D ₂ B ₃	D ₃ B ₃

Jumlah Kombinasi Perlakuan : 16 Kombinasi

Jumlah Ulangan : 3 Ulangan

Jumlah Eksplan per perlakuan : 2 Eksplan

Jumlah eksplan seluruhnya : 96 Eksplan

Metode Analisis Data

Data penelitian ini dianalisa melalui analisis variansi, selanjutnya dilakukan uji beda rata-rata Duncan, sesuai dengan model matematika linier faktorial RAL (Complete Randomized Design) sebagaimana diuraikan berikut ini:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_j + \alpha_k + (\beta\alpha)_{jk} + \epsilon_{ijk}$$

Y_{ijk}	: Hasil pengamatan pada ulangan ke i dengan perlakuan faktor D taraf ke-j dan perlakuan faktor B taraf ke- k.
μ	: Nilai tengah umum
β_j	: Pengaruh perlakuan faktor D taraf ke- j.
α_k	: Pengaruh perlakuan faktor B taraf ke- k.
$(\beta\alpha)_{jk}$: Pengaruh interaksi perlakuan faktor D taraf ke- j dan perlakuan faktor B taraf ke- k
ϵ_{ijk}	: Pengaruh eror ulangan ke-i dengan perlakuan faktor B taraf ke- j dan perlakuan faktor D taraf ke- k.

Teknik metode analisis data ini didapatkan dari pengamatan observasi secara langsung (Rahmawati, 2020).

Pelaksanaan Penelitian

Sterilisasi Alat dan Bahan

Instrumen penelitian yang terdiri dari seperangkat alat pembedahan (pinset, pisau bedah, dan pisau), cawan, dan cawan petri, menjalani proses pembersihan menyeluruh yang melibatkan deterjen, diikuti dengan pembilasan dengan air mengalir. Selanjutnya, instrumen tersebut menjalani proses pelapisan dengan plastik tahan panas dan diautoklaf pada suhu 121°C selama satu jam. Bahan penelitian berupa air suling steril ditempatkan ke dalam botol kultur, yang kemudian ditutup rapat dengan plastik dan aluminium foil. Selanjutnya, diautoklaf pada suhu 121°C selama satu jam.

Pembuatan Larutan Stok

Larutan stok diformulasikan secara cermat dengan mengukur secara tepat bahan kimia, makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan zat pengatur tumbuh

tanaman yang dibutuhkan sesuai dengan komposisi media MS yang telah ditetapkan. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam 100 ml air suling steril dan kemudian diaduk hingga campuran seragam tercapai, menggunakan pengaduk magnetik untuk mendapatkan konsistensi yang optimal. Larutan yang dihasilkan kemudian dimasukkan ke dalam botol, yang diberi label dengan cermat sesuai dengan perlakuan yang ditentukan. Untuk memformulasi larutan stok hormon 2,4-D dan BAP, ukur 0,1 gram masing-masing hormon dan larutkan dalam 100 ml air suling steril. Aduk larutan hingga mencapai konsistensi homogen, lalu pindahkan ke dalam botol berlabel yang sesuai untuk disimpan di lemari es.

Pembuatan Media

Media MS disiapkan dengan mencampurkan komposisi yang ditentukan, yang mencakup larutan stok yang dibutuhkan 1, 2, 3, dan 4 sebagaimana diperlukan. Untuk memulai, masukkan 20 ml larutan stok 1, diikuti dengan 0,2 ml larutan stok 2, dan selanjutnya tambahkan masing-masing 2 ml larutan stok 3 dan 4. Lanjutkan dengan mencampurkan larutan ZPT, 2,4-D, dan BAP sesuai dengan dosis perlakuan yang ditentukan. Selanjutnya, gunakan gelas ukur untuk mengukur 0,02 gram myo-Inositol, 6 gram sukrosa, dan 0,7 gram agar. Selanjutnya, gabungkan myo-Inositol dan sukrosa dalam gelas kimia, gunakan hotplate untuk mengaduk hingga terjadi pembubaran lengkap, diikuti dengan mengukur pH untuk mencapai nilai 5,6. Selanjutnya, pindahkan larutan dari gelas kimia ke dalam panci pemanas, campurkan agar yang telah diukur sebelumnya, dan panaskan hingga mendidih sebelum dituang ke dalam botol. Setelah dingin, tutup dengan plastik dan karet, kemudian sterilkan dalam autoklaf pada tekanan 17,5 Psi dan suhu 121°C selama 15 menit. Media yang diautoklaf disimpan

dengan saksama di ruang kultur sebelum digunakan dalam budidaya eksplan.

Penyediaan Eksplan

Penelitian ini memanfaatkan daun kedua dan ketiga tanaman jintan hitam (*Nigella sativa* L.) sebagai eksplan. Daun yang dipilih mematuhi kriteria tertentu, ditandai dengan permukaan daun yang lebar, rona hijau muda, dan penampilan yang kuat dan sehat. Usia tanaman jintan hitam yang digunakan adalah sekitar 5 bulan.

Sterilisasi dan Penanaman Eksplan

Sejumlah daun jintan hitam dibersihkan dengan teliti menggunakan deterjen cair, dengan menggosok permukaan daun secara hati-hati, diikuti dengan tiga kali pembilasan menyeluruh di bawah air mengalir. Selanjutnya, rendam 0,5 gram dalam 250 ml air suling yang telah diinfus dengan fungisida selama 30 menit. Setelah itu, tambahkan 2 tetes betadine, dan bilas hingga bersih dengan air mengalir. Selanjutnya, rendam dalam larutan alkohol 70% selama 2 menit, lalu lanjutkan dengan membilasnya dengan air suling sekali lagi. Selanjutnya, rendam dalam larutan yang mengandung 25% kloroks dan dua tetes tween 20% selama 20 menit. Selanjutnya, bilas dua kali dengan air suling steril. Selanjutnya, rendam sekali lagi dalam larutan kloroks 10% selama satu menit, diikuti dengan tiga kali pembilasan menyeluruh dengan air suling steril. Eksplan steril dipotong dengan cermat menjadi dimensi 1x1 cm dalam cawan petri yang berisi asam askorbat, setelah itu daun dikeringkan dengan hati-hati pada jaringan. Satu eksplan ditempatkan dalam satu cawan. Cawan yang berisi tanaman dibungkus dengan aluminium foil, dengan tepinya disegel dalam plastik pembungkus, dan kemudian ditempatkan di ruang kultur yang aman.

Pemeliharaan

Eksplan diletakkan pada rak kultur, menerima aplikasi alkohol 70% setiap hari untuk memastikan lingkungan yang steril sekaligus memudahkan pengamatan pertumbuhannya. Jika eksplan terkontaminasi oleh jamur atau bakteri, sangat penting untuk segera menggantinya dengan spesimen baru guna mengurangi risiko kontaminasi lebih lanjut.

Parameter Pengamatan

Persentase Eksplan Terkontaminasi (%)

Rasio eksplan yang terkontaminasi dinilai dengan menghitung tanaman yang terinfeksi pada interval 2, 4, 6, dan 8 MST, yang dilakukan setiap dua minggu. Penentuan persentase kontaminasi dilakukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ terkontaminasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan terkontaminasi} \times 100\%}{\text{Jumlah eksplan yang dikultur}}$$

Persentase Eksplan Tumbuh Berkalus (%)

Pengamatan dilakukan pada saat munculnya kalus. Pembentukan kalus berfungsi sebagai indikator pertumbuhan yang signifikan dalam kultur in vitro.

$$\text{Persentase terbentuknya kalus} = \frac{\text{Jumlah kalus yang terbentuk}}{\text{Jumlah Eksplan yang dikultur}} \times 100 \%$$

Hari Muncul Kalus (Hari)

Setelah munculnya kalus, pengamatan sistematis dilakukan setiap hari pada setiap cawan kultur, yang bertujuan membantu penelitian dalam menentukan hari yang tepat pembentukan atau pertumbuhan kalus.

Warna Kalus

Penilaian warna kalus dilakukan pada akhir periode pengamatan hari ke-45 HST dengan fokus pada variasi rona setiap kalus. Parameter warna kalus ditentukan oleh rona kalus yang terbentuk, seperti Putih Kehijauan (PH), Putih Kekuningan (PK), Hijau Kecokelatan (HC), Kuning Kecokelatan (KC), dan Cokelat (C). Warna kalus menunjukkan kesehatannya; kalus yang sehat ditandai dengan rona tertentu, sedangkan kalus yang berwarna cokelat menunjukkan keadaan pencoklatan. Fenomena pencoklatan pada jaringan merupakan tantangan yang sering dihadapi dalam bidang kultur tanaman (Mufidahtuniswah, 2017).

Tekstur Kalus

Tekstur kalus dapat dilihat secara visual, yang memperlihatkan tiga jenis kalus yang berbeda: rapuh, padat, dan intermediet, yang terlihat pada akhir periode pengamatan. Kalus kompak terdiri dari sel-sel yang kuat, sedangkan kalus rapuh terdiri dari sel-sel yang dapat dipisahkan dengan mudah; kalus intermediet memiliki kombinasi dari kedua tekstur tersebut.

Berat Basah Kalus (g)

Pada akhir penelitian dilakukan pencatatan hasil pengamatan, khususnya 8 MST yang ditentukan dengan mengukur berat kalus dengan neraca analitik dalam satuan gram.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Eksplan Tumbuh Berkalus (%)

Keberhasilan eksplan hidup tanaman jintan hitam menunjukkan adanya peningkatan tumbuh berkalus pada setiap minggunya namun tidak sepenuhnya membentuk kalus menjadi 100 % dikarenakan adanya eksplan yang memiliki perlakuan tanpa ZPT yaitu D₀B₀ yang dapat dilihat pada Tabel.1

Tabel 1. Persentase Eksplan Tumbuh Berkalus Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.)

Perlakuan	Minggu Setelah Tanam (MST)			
	2	4	6	8
Tumbuh	12,5	81,2	82,3	85,4
Terkontaminasi	0	0	0	0

Tabel 1 menunjukkan bahwa semua eksplan yang dibudidayakan dalam empat kombinasi media perlakuan yang berbeda berhasil menghasilkan kalus, mencapai persentase 85,4% pada umur kalus 8 MST. Gambar 1 menunjukkan eksplan tanaman jintan hitam.



Gambar 2. Eksplan Tanaman Jintan Hitam umur 8 MST

Gambar 2 mengilustrasikan bahwa pembentukan kalus pada eksplan jintan hitam bergantung pada konsentrasi ZPT yang digunakan. Hal ini sejalan dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Arianto et al. (2013) bahwa 2,4-D memiliki potensi yang cukup besar sebagai auksin dalam budidaya kalus, yang

menunjukkan bahwa variasi konsentrasi 2,4-D, baik yang berkurang maupun meningkat, tidak mempengaruhi pertumbuhan kalus. Tingkat pembentukan kalus berfungsi sebagai ukuran responsivitas eksplan terhadap perlakuan yang diberikan. Dengan demikian, konsentrasi zat pengatur tumbuh yang terlalu tinggi tidak mendorong pertumbuhan; sebaliknya, menghambatnya. Perkembangan eksplan kalus jantan hitam pada interval 2, 4, 6, dan 8 MST digambarkan dalam Lampiran 6. Eksplan yang tidak berhasil mengembangkan kalus mengalami perubahan warna dari hijau menjadi coklat, yang akhirnya mengakibatkan kematiannya. Fenomena ini berkaitan dengan pelepasan senyawa fenolik yang berasal dari eksplan itu sendiri. Oleh karena itu, sangat penting bagi eksplan untuk memiliki sifat-sifat yang diperlukan agar sel-selnya dapat merespons sinyal yang diberikan oleh zat pengatur tumbuh yang dimasukkan dengan tepat, sehingga memudahkan perkembangan sel atau jaringan eksplan secara bertahap menjadi pembentukan kalus.

Persentase Terkontaminasi (%)

Kultur jaringan merupakan suatu teknik canggih untuk perbanyak tanaman, yang melibatkan pembudidayaan jaringan tanaman secara cermat dalam lingkungan yang steril dan terkendali. Proses kultur jaringan memerlukan lingkungan yang terkendali, khususnya laboratorium yang steril, dan tidak dilakukan di lokasi yang sembarangan. Laboratorium yang steril sangat penting untuk mengurangi risiko kontaminasi dalam media kultur. Di samping lingkungan yang steril, fase sterilisasi bahan tanam merupakan elemen penting lain yang memengaruhi kontaminasi (Khairan *et al.*, 2021). Data yang disajikan dalam Tabel 1 mengenai persentase eksplan yang terkontaminasi menunjukkan tidak adanya kontaminasi sama sekali di

semua perlakuan (0%). Hasil ini menunjukkan bahwa protokol sterilisasi yang diterapkan untuk peralatan, eksplan, dan media tanam dalam proses kultur jaringan dijalankan dengan presisi dan efektif. Eksplan yang digunakan dalam media kultur harus bebas dari patogen; hal ini dapat dicapai melalui penggunaan peralatan steril dan kepatuhan ketat terhadap protokol untuk mengurangi kemungkinan kontaminasi. Dalam pelaksanaan kegiatan kultur, penting untuk mempertimbangkan standar kebersihan personel yang terlibat dalam perbanyakan kultur *in vitro*. Bila pekerja bekerja dalam kondisi aseptik, kemungkinan terjadinya kontaminasi berkurang secara signifikan. Pekerja yang menunjukkan tingkat praktik aseptik yang lebih rendah dapat mempermudah terjadinya kontaminasi. Dalam konteks perbanyakan kultur *in vitro*, sterilitas pekerja sangat penting untuk memastikan keberhasilan proses penanaman. Lingkungan harus selalu menjaga sterilitas, dengan aplikasi alkohol 70% setiap minggu. Semua peralatan kultur, termasuk alat bedah dan wadah, memerlukan sterilisasi menyeluruh untuk mencegah kontaminasi, dan media kultur juga harus menjalani sterilisasi melalui autoklaf (Citra *et al.*, 2024).

Hari Muncul Kalus (Hari)

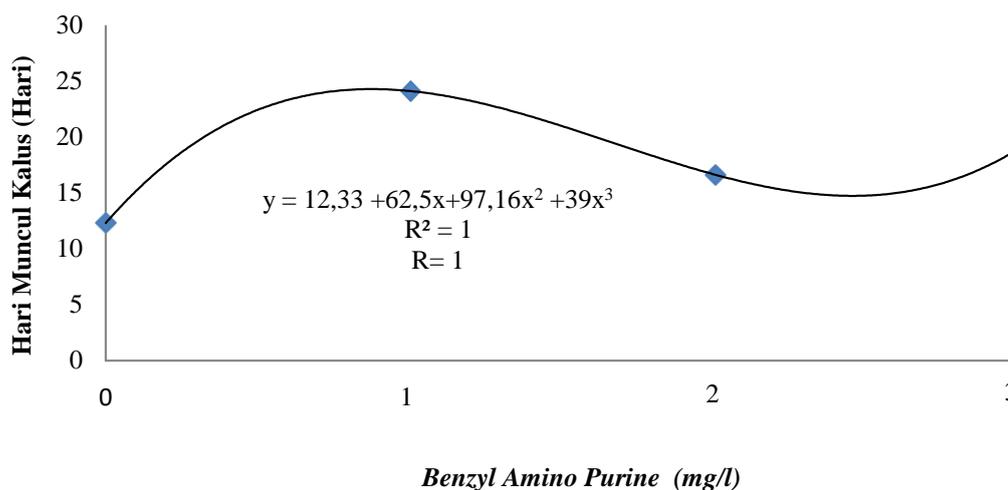
Data mengenai hari munculnya kalus untuk eksplan jintan hitam, beserta analisis variansnya, disajikan dalam Lampiran 4. Perlakuan 2,4-D tidak memberikan dampak signifikan pada waktu munculnya kalus; namun, baik perlakuan BAP maupun interaksi antara kedua perlakuan menunjukkan dampak signifikan pada aspek ini. Tabel 2 menyajikan hari rata-rata munculnya kalus.

Tabel 2. Hari Muncul Kalus Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) pada Perlakuan Konsentrasi 2,4-D dan Konsentrasi BAP

Perlakuan Konsentrasi BAP	Konsentrasi 2,4-D				Rataan B
	D ₀ (Kontrol)	D ₁ (1 mg/l)	D ₂ (2 mg/l)	D ₃ (3 mg/l)	
Hari					
B ₀ (Kontrol)	0,00d	31,33a	14,00c	16,33c	12,33c
B ₁ (1 mg/l)	16,00c	18,33bc	16,67c	21,67bc	24,17a
B ₂ (2 mg/l)	17,33c	26,33ab	18,33bc	19,67bc	16,67b
B ₃ (3 mg/l)	16,00c	20,67bc	17,67c	18,67bc	19,08b
Rataan D	15,42	18,17	20,42	18,25	

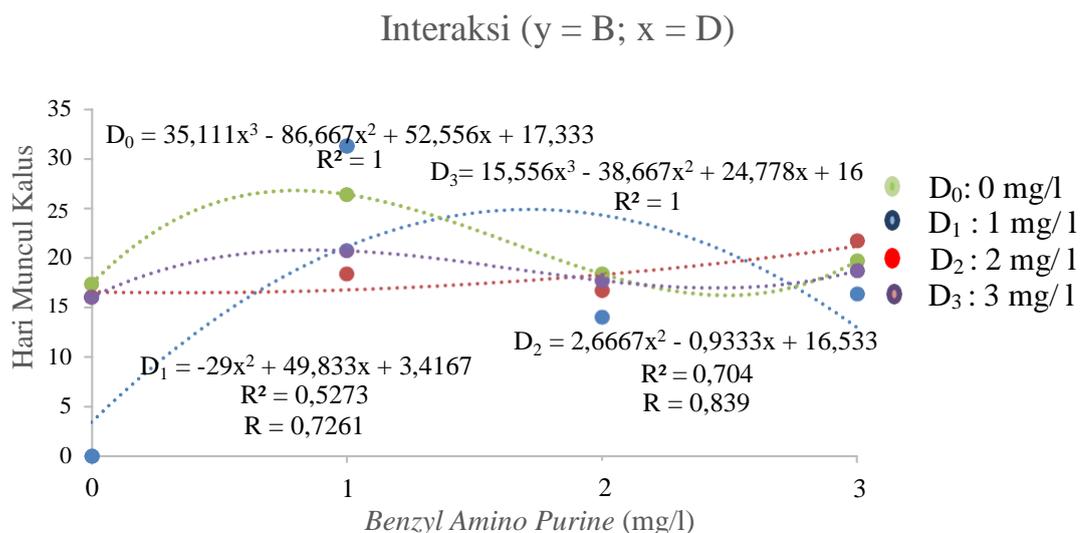
Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang tidak sama pada kolom serta pada baris dan kolom yang sama berbeda nyata menurut uji Duncan 5%

Analisis Tabel 2 menunjukkan bahwa perlakuan 2,4-D tidak menghasilkan efek yang signifikan, sedangkan perlakuan BAP menunjukkan dampak yang nyata. Dalam perlakuan BAP, nilai puncak diamati pada konsentrasi B₁ (1 mg/l), yang mencatat 24 hari, yang secara signifikan berbeda dari B₂ (16,67 hari), B₃ (19,08 hari), dan B₀ (12,33 hari). Interaksi antara perlakuan 2,4 D dan BAP menghasilkan efek yang nyata, menghasilkan nilai tertinggi pada D₁B₀ (31,33 hari), yang secara signifikan berbeda dari D₀B₀ (0 hari) dan D₁B₁ (18,33 hari).



Gambar 3. Hubungan Hari Muncul Kalus pada Eksplan Tanaman Jintan hitam dengan Perlakuan BAP (hari)

Gambar 3 menunjukkan bahwa munculnya kalus jantan hitam yang dipengaruhi oleh pemberian BAP menunjukkan hubungan kubik positif. Persamaan tersebut dinyatakan sebagai $y = 39x^3 - 97,167x^2 + 62,5x + 12,333$, dengan nilai R^2 sebesar 1. Munculnya kalus bagian atas pada jantan hitam menunjukkan peningkatan optimal dengan pemberian 1 mg/l, diikuti penurunan pada 2 mg/l, dan peningkatan berikutnya pada 3 mg/l. Dihipotesiskan bahwa pemberian BAP yang tepat dapat mempercepat munculnya kalus; namun, peningkatan konsentrasi BAP berpotensi menghambat perkembangan kalus. Hal ini sejalan dengan pernyataan Sudarmadji (2018) bahwa konsentrasi BAP yang tidak tepat dapat menyebabkan keterlambatan munculnya kalus, yang selanjutnya berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan. Tidak adanya pembentukan kalus tidak semata-mata disebabkan oleh media yang digunakan; sebaliknya, hal itu juga dapat dipengaruhi oleh variabel eksternal seperti spesies tanaman, umurnya, suhu, atau intensitas cahaya. Faktor-faktor ini dapat berinteraksi dengan keseimbangan hormon auksin dan sitokinin, yang pada akhirnya menghambat induksi pertumbuhan kalus.



Gambar 4. Hubungan Hari Muncul Kalus pada Eksplan Tanaman jantan hitam dengan Kombinasi Perlakuan 2,4-D dan BAP.

Berdasarkan Gambar 4, nilai optimal yang dicapai pada perlakuan BAP pada konsentrasi 1 mg/l adalah 19,75 hari, sedangkan nilai minimum yang tercatat adalah 3,41 hari. Interaksi antara perlakuan 2,4-D dan BAP menghasilkan interaksi yang signifikan. Hubungan kubik positif ditetapkan dalam persamaan $D_0 = 35,111x^3 - 86,667x^2 + 52,556x + 17,333$ dan $D_3 = 15,556x^3 - 38,667x^2 + 24,778x + 16$, dengan nilai R^2 sebesar 1. Munculnya kalus bagian atas pada kalus jintan hitam menunjukkan peningkatan optimal dengan aplikasi 1 mg/l, diikuti oleh penurunan pada 2 mg/l, dan kemudian peningkatan sekali lagi pada 3 mg/l. Nilai kombinasi yang paling signifikan dicapai melalui interaksi 2,4-D pada 1 mg/l dan BAP pada 0 mg/l (D_1B_0), yang mengarah ke durasi terpanjang untuk munculnya kalus, tercatat pada 31 hari. Kombinasi 2,4-D pada 2 mg/l dan BAP pada 0 mg/l (D_2B_0) menghasilkan kemunculan kalus paling cepat, terjadi dalam waktu 14 hari. Sebaliknya, perlakuan D_0B_0 menunjukkan tidak adanya pertumbuhan kalus sama sekali pada tanaman jintan hitam. Hal ini menunjukkan bahwa tanpa adanya konsentrasi BAP, konsentrasi 2,4-D sebesar 2 mg/l sudah cukup untuk merangsang pertumbuhan kalus. Hal ini menunjukkan bahwa BAP tidak memberikan pengaruh yang substansial terhadap pertumbuhan kalus. Penggabungan 2,4-D dan BAP menunjukkan nilai perlakuan minimal, khususnya D_0B_0 (0 hari). Fenomena ini diperkirakan muncul dari peningkatan konsentrasi BAP, yang kemudian menyebabkan penekanan pertumbuhan kalus. Ramanta (2018) berpendapat bahwa peningkatan konsentrasi auksin relatif terhadap sitokinin mendorong pembentukan kalus pada eksplan, sedangkan dominasi sitokinin mendorong perkembangan tunas. Pembentukan kalus secara signifikan dipengaruhi oleh interaksi antara hormon endogen yang ditemukan

dalam eksplan dan penambahan zat pengatur tumbuh eksogen ke dalam media. Pemanfaatan zat pengatur tumbuh yang beragam akan menimbulkan respons yang berbeda dari setiap eksplan tertentu. Interaksi ini akan mendorong pemindahan zat pengatur tumbuh yang ditemukan dalam media tanam ke dalam jaringan tanaman, khususnya melalui pangkal eksplan yang telah rusak akibat sayatan. Lebih jauh, zat pengatur tumbuh yang diserap akan merangsang pembelahan sel, khususnya pada sel-sel yang terletak di pangkal yang mengelilingi lokasi cedera eksplan.

Warna Kalus

Warna kalus merupakan penanda penting pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro*, yang memberikan wawasan berharga tentang atribut visualnya dan memungkinkan penilaian apakah kalus terdiri dari sel-sel yang aktif membelah atau telah berhenti berfungsi. Jaringan kalus yang dihasilkan dari eksplan biasanya menampilkan berbagai warna.



Gambar 5. Indikator warna kalus terbaik hijau cerah
Sumber :Latunra *dkk.*, 2017.

Latunra *et al.* (2017) menegaskan bahwa pewarnaan kalus berfungsi sebagai indikator keberadaan klorofil dalam jaringan tanaman; rona yang lebih cerah berkorelasi dengan kandungan klorofil yang lebih tinggi, seperti yang diilustrasikan pada Gambar 5. Rona cerah atau pucat mungkin menunjukkan bahwa keadaan kalus tetap relatif baik. Klorofil merupakan bagian integral dari proses pertumbuhan kalus; kandungan klorofil yang tinggi dapat secara signifikan meningkatkan laju pembelahan sel, sehingga mendorong perkembangan kalus yang kuat dan sehat. Meskipun demikian, kalus menunjukkan rona cokelat, fenomena yang dikenal sebagai pencoklatan, yang merupakan transformasi adaptif dalam jaringan tanaman. Ini terjadi sebagai respons terhadap berbagai rangsangan, seperti cedera yang dialami oleh eksplan, yang menyebabkan oksidasi senyawa fenolik yang disintesis sebagai akibat dari kerusakan jaringan.



Gambar 6. Warna kalus eksplan daun jintan hitam (*Nigella sativa* L.) Umur 8 MST

Gambar 6 mengilustrasikan beragam warna kalus yang dihasilkan dalam penelitian ini, termasuk putih transparan (P), putih kehijauan (PH), hijau kecoklatan (HC), kuning kecoklatan (KC), putih kekuningan (PK), dan coklat (C).

Tabel 4. Warna Kalus Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.)

Perlakuan	Ulangan 1		Ulangan 2		Ulangan 3	
	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 1	Sampel 2
D ₀ B ₀	-	-	-	-	-	-
D ₀ B ₁	-	PK	HC	HC	HC	-
D ₀ B ₂	HC	HC	HC	HC	HC	HC
D ₀ B ₃	HC	HC	HC	HC	HC	HC
D ₁ B ₀	PK	-	HC	HC	HC	HC
D ₁ B ₁	PK	PK	HC	HC	HC	KC
D ₁ B ₂	KC	KC	KC	KC	KC	KC
D ₁ B ₃	HC	HC	HC	HC	HC	HC
D ₂ B ₀	KC	KC	HC	KC	KC	KC
D ₂ B ₁	HC	HC	HC	HC	HC	HC
D ₂ B ₂	PK	PK	PK	PK	PK	KC
D ₂ B ₃	PH	PH	KC	KC	PH	KC
D ₃ B ₀	KC	-	KC	P	KC	KC
D ₃ B ₁	KC	KC	-	PK	KC	KC
D ₃ B ₂	HC	HC	-	HC	HC	-
D ₃ B ₃	KC	KC	KC	PK	KC	KC

Keterangan : Warna Kalus Putih Kekuningan (PK), Hijau Kecoklatan (HC), Kuning Kecoklatan (KC), Putih Kehijauan (PH), Putih Transparan (P), Tidak terbentuk (-).

Gambar 6 mengilustrasikan spektrum warna yang diamati pada kalus jintan hitam, mulai dari putih transparan (P) hingga nuansa hijau kecokelatan (HC) dan kuning kecokelatan (KC). Menurut Tabel 4, warna kalus yang diamati bervariasi dari hijau kecokelatan hingga kuning kecokelatan. Variasi warna kalus menandakan tingkat perkembangan kalus yang berbeda. Hampir semua perlakuan menunjukkan bahwa warna kalus yang dominan dihasilkan adalah rona hijau kecokelatan (HC). Penelitian yang dilakukan oleh Wahyuni *et al.*, (2020) menunjukkan bahwa penambahan sitokinin, khususnya BAP, pada konsentrasi tinggi dikaitkan dengan manifestasi rona hijau cerah yang berkepanjangan pada kalus. Rona hijau kalus dapat dikaitkan dengan pengaruh sitokinin dalam sintesis klorofil. Sementara itu, perlakuan 2,4-D pada 2 mg/l yang dikombinasikan dengan BAP pada 3 mg/l (D₂B₃) menghasilkan warna kalus putih kehijauan. Warna kalus yang lebih gelap, khususnya coklat, menunjukkan penurunan laju pertumbuhannya. Penelitian ini menghasilkan

kalus hijau kecokelatan (HC) dalam media yang dilengkapi dengan konsentrasi 2,4-D yang relatif lebih tinggi. Warna kalus kecokelatan, yang disebut browning, muncul dari proses metabolisme yang melibatkan senyawa fenol beracun, yang sering kali diaktifkan oleh prosedur sterilisasi eksplan. Fenomena ini dapat menghambat pertumbuhan kalus atau, dalam beberapa kasus, menyebabkan kematian jaringan tanaman.

Tekstur Kalus

Tekstur kalus berfungsi sebagai indikator penting dalam metodologi kultur jaringan untuk mengevaluasi kualitas kalus. Setiap eksplan menunjukkan tekstur kalus yang berbeda. Temuan mengenai tekstur kalus, setelah penerapan berbagai konsentrasi 2,4-D dan BAP pada induksi kalus dari eksplan jintan hitam, disajikan dalam Tabel 5.

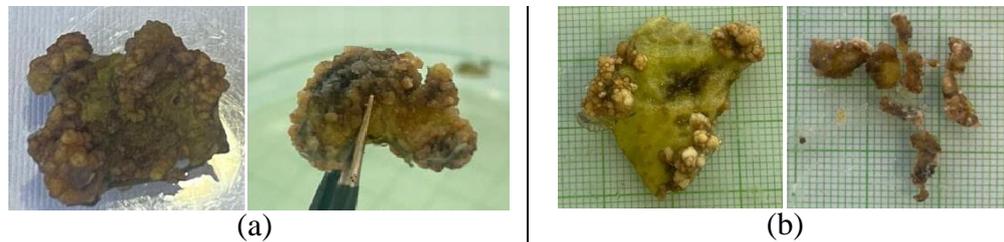
Tabel 5. Tekstur Kalus Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) dengan konsentrasi 2,4-D dan BAP

Perlakuan	Ulangan 1		Ulangan 2		Ulangan 3	
	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 1	Sampel 2
D ₀ B ₀	-	-	-	-	-	-
D ₀ B ₁	-	Remah	Remah	Remah	Remah	-
D ₀ B ₂	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
D ₀ B ₃	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
D ₁ B ₀	Remah	-	Remah	Remah	Remah	Remah
D ₁ B ₁	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
D ₁ B ₂	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
D ₁ B ₃	Remah	Remah	Remah	Remah	Remah	Remah
D ₂ B ₀	Remah	Remah	Remah	Remah	Remah	Remah
D ₂ B ₁	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
D ₂ B ₂	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
D ₂ B ₃	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak
D ₃ B ₀	Remah	-	Remah	Remah	Remah	Remah
D ₃ B ₁	Kompak	Kompak	-	Kompak	Kompak	Kompak
D ₃ B ₂	Kompak	Kompak	-	Kompak	Kompak	-
D ₃ B ₃	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak	Kompak

Keterangan : Tidak terbentuk Kalus (-).

Data pada Tabel 5 menunjukkan bahwa tekstur kalus kompak lebih mendominasi dari tekstur kalus remah. Dalam keseluruhan 96 eksplan tanaman

jintan hitam terdapat 57 eksplan memiliki kalus bertekstur kompak, 26 eksplan memiliki kalus bertekstur kalus remah dan 13 eksplan yang tidak terbentuk kalus.



Gambar 7. Tekstur kalus jintan hitam (*Nigella sativa* L.) Umur 8 MST
Keterangan : (a) kalus kompak (b) kalus remah

Setelah mengamati tekstur kalus yang diilustrasikan pada Gambar 7, serangkaian tekstur muncul, terutama tidak rapuh (padat) dan rapuh (remuk). Kalus yang baik dan cocok untuk produksi metabolit sekunder menunjukkan tekstur yang kompak, dibedakan dengan karakteristiknya yang kuat dan ulet. Komposisi kalus yang rumit dianggap bermanfaat karena kemampuannya untuk menyimpan metabolit sekunder dalam jumlah yang lebih besar. Nurokhman *et al.*, (2019) menyoroti bahwa kalus yang rapuh memiliki atribut fisik yang menunjukkan sifatnya, terutama tekstur yang lembut yang dihasilkan dari adanya ruang antar sel. Kalus kompak menunjukkan sifat fisik yang berbeda, ditandai dengan tekstur yang lebih padat dan lebih keras yang dihasilkan dari struktur seluler yang tersusun rapat.

Berat Basah Kalus (g)

Pengukuran berat basah kalus dilakukan pada akhir masa pengamatan, yaitu 8 Minggu Setelah Tanam (56 Hari), dengan menggunakan neraca analitik. Hasil pengamatan kalus jintan hitam yang dipengaruhi oleh berbagai konsentrasi 2,4-D dan BAP terhadap berat basahnya disajikan pada Tabel 6.

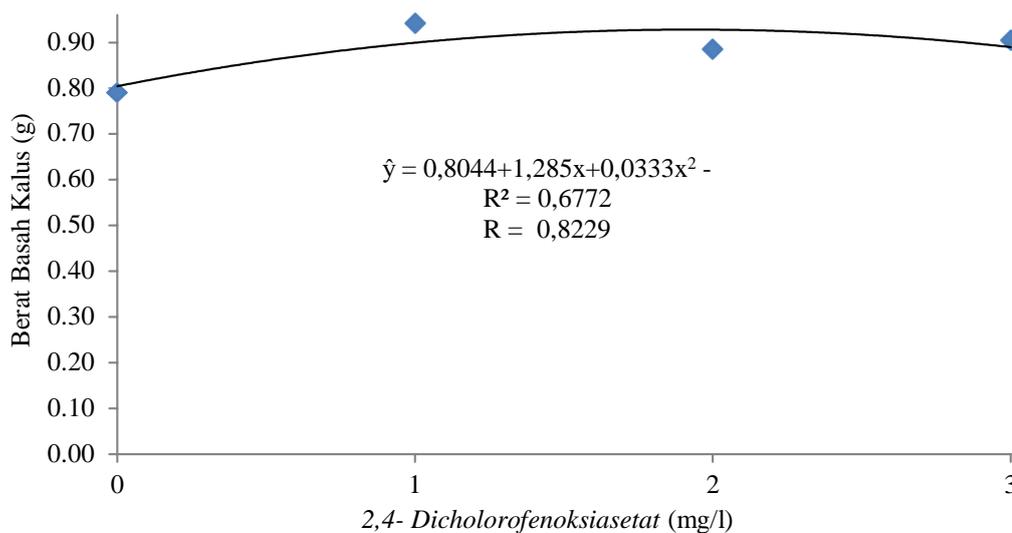
Tabel 6. Berat Basah Kalus Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) Konsentrasi 2,4-D dan BAP

Perlakuan	8 Minggu Setelah Tanam (MST)
gram.....
Konsentrasi 2,4-D	
D ₀ (Kontrol)	0,79b
D ₁ (1 mg/l)	0,94a
D ₂ (2 mg/l)	0,89ab
D ₃ (3 mg/l)	0,90a
Konsentrasi BAP	
B ₀ (Kontrol)	0,76b
B ₁ (1 mg/l)	0,89a
B ₂ (2 mg/l)	0,96a
B ₃ (3 mg/l)	0,90a

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang tidak sama pada kolom yang sama berbeda nyata menurut uji Duncan 5%

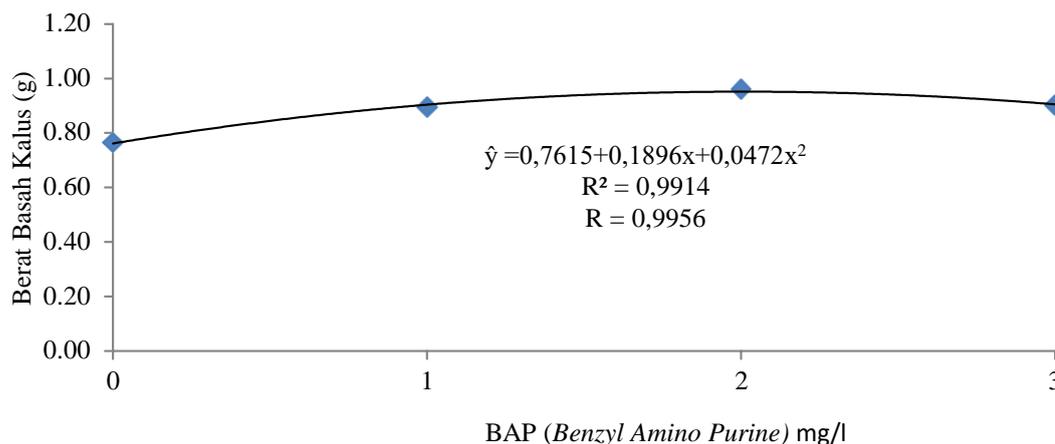
Menurut Tabel 6, kadar 2,4-D dan BAP memberikan pengaruh yang nyata terhadap berat basah kalus. Aplikasi BAP B2 pada konsentrasi 2 mg/l menghasilkan berat basah kalus rata-rata paling besar, yakni 0,96 gram. Sebaliknya, perlakuan dengan BAP B₀ pada 0 mg/l menghasilkan berat basah rata-rata paling kecil, yakni 0,76 gram.

Ilustrasi yang menggambarkan korelasi antara berat basah kalus eksplan jintan hitam dan konsentrasi 2,4-D disajikan pada (Gambar 8).



Gambar 8. Hubungan Berat Basah Kalus pada Eksplan Tanaman Jintan hitam dengan Perlakuan 2,4-D 8 MST.

Berdasarkan Gambar 8, berat basah kalus per eksplan tanaman jintan hitam yang diberi perlakuan 2,4-D menunjukkan hubungan kuadrat positif, dengan konsentrasi optimal 1,9 mg/l. Pada konsentrasi ini, 2,4-D mencapai nilai maksimum 0,92 gram mengenai berat basah kalus pada 8 MST, menunjukkan korelasi kuat sebesar 82% antara 2,4-D dan berat basah kalus pada titik waktu spesifik ini. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pada konsentrasi D_1 (1 mg/l) menghasilkan berat basah kalus terbesar pada tanaman jintan hitam. Marthani (2016) mengemukakan bahwa ZPT 2,4-D memengaruhi perkembangan seluler, karena auksin memiliki kapasitas untuk meningkatkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel, merangsang sintesis protein, dan membantu plastisitas dan pembentukan dinding sel. Peningkatan berat kalus terkait erat dengan kadar air, laju pembelahan sel, dan proses perluasan sel. Fenomena pembesaran sel menyebabkan peningkatan kuantitas dan dimensi sel, yang pada akhirnya berkontribusi pada peningkatan berat kalus.



Gambar 9. Hubungan Berat Basah Kalus pada Eksplan Tanaman Jintan hitam dengan Perlakuan BAP 8 MST.

Berdasarkan Gambar 9. berat basah kalus per eksplan tanaman jintan hitam dengan perlakuan BAP membentuk kuadrat positif dengan pemberian 2 mg/l, BAP menunjukkan nilai maksimum sebesar 0,95 gram terhadap berat basah kalus pada umur 8 MST dengan korelasi yang erat sebesar 99% antara BAP dengan berat basah kalus pada 8 MST. Temuan tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi B2 sebesar 2 mg/l menghasilkan berat basah kalus tertinggi pada tanaman jintan hitam, yaitu sebesar 0,96 gram. Partisipasi BAP dalam proses pembentukan kalus merangsang pembelahan jaringan meristematik. Hal ini sejalan dengan pernyataan bahwa sitokinin berperan langsung dalam proses transkripsi dan translasi RNA yang merupakan bagian integral dari sintesis protein selama tahap interfase. Protein yang disintesis melalui proses enzimatik sangat penting untuk pemanjangan untai DNA dan perbaikan ketidaksesuaian dalam urutan basa nitrogen, sehingga memfasilitasi pembelahan sel yang berhasil.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Aplikasi 2,4-D menunjukkan dampak yang nyata pada berat basah kalus khususnya pada perlakuan D₁, menghasilkan berat 0,96 gram pada konsentrasi 1 mg/l, yang melampaui hasil D₂ pada 0,90 gram dan D₃ pada 0,89 gram.
2. Aplikasi BAP (*Benzyl Amino Purine*) secara nyata memengaruhi waktu kemunculan kalus, yang tercatat pada rata-rata 12,33 hari, serta berat basah kalus pada perlakuan B₂ (2 mg/l), yang terukur 0,96 gram.
3. Interaksi antara kombinasi 2,4-D dan BAP secara nyata memengaruhi waktu kemunculan kalus, khususnya yang diamati pada perlakuan D₂B₀ (2 mg/l 2,4-D dan 0 mg/l BAP), yang terjadi selama rentang waktu 14 hari.

Saran

Temuan penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa hasil optimal untuk induksi kalus jintan hitam dapat dicapai dengan menggunakan 2,4-D pada konsentrasi 2 mg/l. Pada kombinasi disarankan konsentrasi sitokinin tidak lebih banyak daripada auksin karena tidak akan mempengaruhi pertumbuhan kalus dengan cepat, namun penggunaan arang aktif disarankan agar mencegah kalus mengalami browning (pencoklatan).

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiana, D. W. 2019. Teknik Pemberian *Benzyl Amino Purine* untuk Memacu Pertumbuhan Kalus dan Tunas pada Kotiledon Melon (*Cucumis melo* L.). *Buletin Teknik Pertanian*. 14(2): 50-53.
- Arianto, D.,Z, Basri., dan M. U. Bustami. 2013. Induksi Kalus Dua Klon Kakao (*Theobroma cacao* L.) Unggul Sulawesi pada Berbagai Konsentrasi 2, 4 *Dichlorophenoxy Acetic Acid* secara *in vitro*. Skripsi. Universitas Tadulako.
- Armini, A. M., T. Wijayanti, dan N. Duakaju. 2017. Perbanyak Tanaman Bioteknologi Tanaman Laboratorium Kultur Jaringan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Pusat antar Universitas Bioteknologi: Institut Pertanian Bogor.
- Ashar, J. A. Farhanah, dan H. Pratiwi. 2023. Pengantar Kultur Jaringan Tanaman. PT. Widina Media Utama : Jawa Barat.
- Badary, O. 2019. Efek Penghambatan *Thymoquinone* terhadap Induksi 20- *MethylCholanthrene* dan *Fibrosarcoma Tumorigenesis*. *Jurnal Pendekteksi Kanker*. 25(1):362-368.
- Balitri, 2019. Pengantar Fisiologi Tumbuhan . PT. Gramedia : Jakarta.
- Citra, U. D., R. N. M. R. Ridwan, P. Indriani ., dan U, Haniyah. 2024. Etika Dalam Penanganan Eksplan Kultur Jaringan Pisang Barangan (*Musa acuminata* L.) yang Terkontaminasi: Perspektif Keamanan Pangan dan Kesehatan Masyarakat. *Jurnal Biogenerasi*, 9(2), 1148-1154.
- Gunawan, G. 2018. Pengaruh Interaksi antara Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Tunas (BAP, IBA, GA3, *Myo-inositol* dan Mineral) dan Umur Kultur terhadap Pertumbuhan Tanaman *Macodes petola* secara *in vitro*. Universitas Islam Negeri Sunan Gunung Djati, Bandung.
- Hossenzaideh, K. 2017. Pemanfaatan Biji *Nigella sativa* dalam Terapi Penyembuhan Kanker dan Gangguan Metabolisme. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kesehatan*, 1(1):1-101.
- Indria, W. Mansyur dan A. Husni. 2016. Pengaruh Pemberian Zat Pengatur Tumbuh 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Induksi Kalus dan Penambahan Zat Pengatur Tumbuh *Benzyl Adenine* (BA) terhadap Induksi Kalus Embriogenik Rumput Gajah Varietas Hawaii (*Pennisetum purpureum* cv. Hawaii) (*In vitro*). *Jurnal Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik*. 2(2): 1-12.
- Kementrian Perdagangan Republik Indonesia. 2017. Warta Ekspor Obat Tradisional Indonesia. Jakarta.

- Khairan, K., B. M, Bustam.,R, Meilinda., dan R, Muna. 2021. Pengaruh Komposisi 2, 4-D dan BAP terhadap Pembentukan Kalus Eksplan Pucuk Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) secara *In vitro* dengan Pemotongan Horizontal dan Vertikal. *Biotropic: The Journal of Tropical Biology*, 5(1), 9-20.
- Lailana, Z. dan C. Paramita. 2023. Pengaruh Penambahan BAP terhadap Induksi Kalus Tanaman Porang secara *in vitro*. *Jurnal Kingdom*. 9(1): 45-55.
- Latunra, A. I. 2017. Induksi Kalus Pisang Barangan Merah *Musa acuminata* Colla dengan Kombinasi Hormon 2,4-D dan BAP secara *in vitro*. *Jurnal Ilmu alam dan lingkungan*, 8(1).
- Mahadi, I. 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.
- Marthani, Q. 2016. Kalogenesis Eksplan Setengah Biji Koro Benguk secara *in vitro* Menggunakan BAP dan NAA. *Skripsi*. Semarang: FMIPA Unnes
- Mellisa, dan A. Febliza.2018. Pengaruh Hormon NAA dan IBA pada Eksplan Nibung (*O. Tiggilarium*) terhadap Umur Muncul Kalus (hari). *Jurnal Bioterdidik*. 6(1):1-6.
- Mufidahtuniswah, S. 2017. Induksi Kalus Embriogenik Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) dengan Kombinasi Konsentrasi 2,4-D (*Dichlorophenoxyaxetic Acid*) dan NAA. Universitas Islam Negeri Maulana Malik.
- Muhtasib, H. G. 2016. Potensi Medis Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) dan Beberapa Bagianya. *Molekul Produk Alam: Bumi Aksara*. Jakarta.
- Nazza, Y. 2013. Induksi Kalus Pegagan (*Centella asiatica*) pada Media MS dengan Penambahan Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D yang Dikombinasi dengan Air Kelapa. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Nurdiansyah, U. 2019. Pengaruh Konsentrasi 2,4-D (*Dichlorophenoxyaxetic Acid*) dan BAP (*Benzyl Amino Purine*) pada Media MS terhadap Induksi Kalus Daun Afrika (*Vernonia amygdalina*). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Medan. Medan.
- Nurokhman, A., H, Faizah., Sugiharto, E. S. W, Utami. and Y.S. W, Manuhara. 2019. Effect of Plant Growth Regulator and Explant Types on *in vitro* Callus Induction of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. *Research Journal of Biotechnology*, 14 (9) :102– 107.

- Rahardja, F. 2017. Pengaruh Pemberian Konsentrasi 2,4-D dan NAA terhadap Multiplikasi Tunas Pucuk Jeruk Kanci (*Citrus sp.*) secara *in vitro*. *Jerami*.
- Rahayu, F. B. Solichatun dan Endang. 2018. Pengaruh Asam 2,4-D terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan *Flavonoid* Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Biofarmasi* 1(1).
- Rahmawati, A. S. 2020. Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan Uji Anova Dua Jalur. *Optika: Jurnal Pendidikan Fisika*, 4(1), 54-62.
- Ramanta, S. S. 2018. Induksi Kalus Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) pada Beberapa Konsentrasi 2,4-D secara *in-vitro*. Skripsi. Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang.
- Rasud, Y., Z, Basri., N, Sahiri. 2019. Induksi Kalus Cengkeh dari Ekspan Daun Menggunakan 2,4-D secara *in vitro*. *JPEN Borneo: Jurnal Ilmu Pertanian*. 2(2): 1-10.
- Rosyidah., Muchuriyah., E. Ratnasari., dan Y. Rahayu. 2018. Induksi Kalus Daun Melati (*Jaminum sambac*) dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) dan Benzil Amino Purine (BAP) pada Media MS secara *in vitro*. *Lentera Bio*. 3, 1-4.
- Rusdianto, F dan Indrianto. 2017. Induksi Kalus Embriogenik pada Wortel (*Daucas carota* L.) Menggunakan 2,4-D. *Bionature* 13(2): 136-140.
- Salem, M. L. 2020. Sifat Imunomodulator dan Terapi dari Komponen Jintan Hitam (*Nigella sativa*L.) .*Biofarmasi* 1(1): 1749-1770.
- Santoso dan Nursandi. 2023. Kultur Jaringan Tanaman, Malang; UMM Press.
- Setiawati, E. A. Kurniawati dan Winarso. 2018. Pertumbuhan Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) pada Tingkat Naungan dan Pemupukan Nitrogen yang berbeda. *Jurnal Agronomi Indonesia*. 46(2): 202-207.
- Setiawati, R. 2018. Prospek dan Kandungan Farmakologi Jintan Hitam. *Biofarmasi* 2(1): 36-39.
- Sudarmadji. 2018. Penggunaan *Benzyl Amino Purine* pada Pertumbuhan Kalus Kapas secara *in vitro*. *Buletin Teknik Pertanian*. 8(1).
- Sukmadjaja, D. 2021. Embriogenesis Somatik Langsung pada Tanaman Cendana. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. 10(1):1-6.
- Triana, F. 2020. Induksi Kalus pada Eksplan Daun Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia*) secara *in vitro* dengan Konsentrasi 2,4-D dan BAP yang Berbeda. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

- Wahyuni, A., B, Satria., dan A, Zainal. 2020. Induksi Kalus Gaharu dengan NAA dan BAP secara *in vitro*. *Agrosains: Jurnal Penelitian Agronomi*, 22(1), 39-44.
- Widoretno, W. Biologi Reproduksi Tumbuhan Perbanyak Vegetatif Tanaman. Media Brawijaya: Malang.
- Wiratmaja, I. W. 2017. Zat PengaturTumbuh Auksin dan Cara Penggunaannya dalam Bidang Pertanian. Fakultas Pertanian: Universitas Udayana, Bali.
- Zulkarnain, A. 2019. Kultur Jaringan Tanaman; PT. Bumi Aksara . Jakarta.

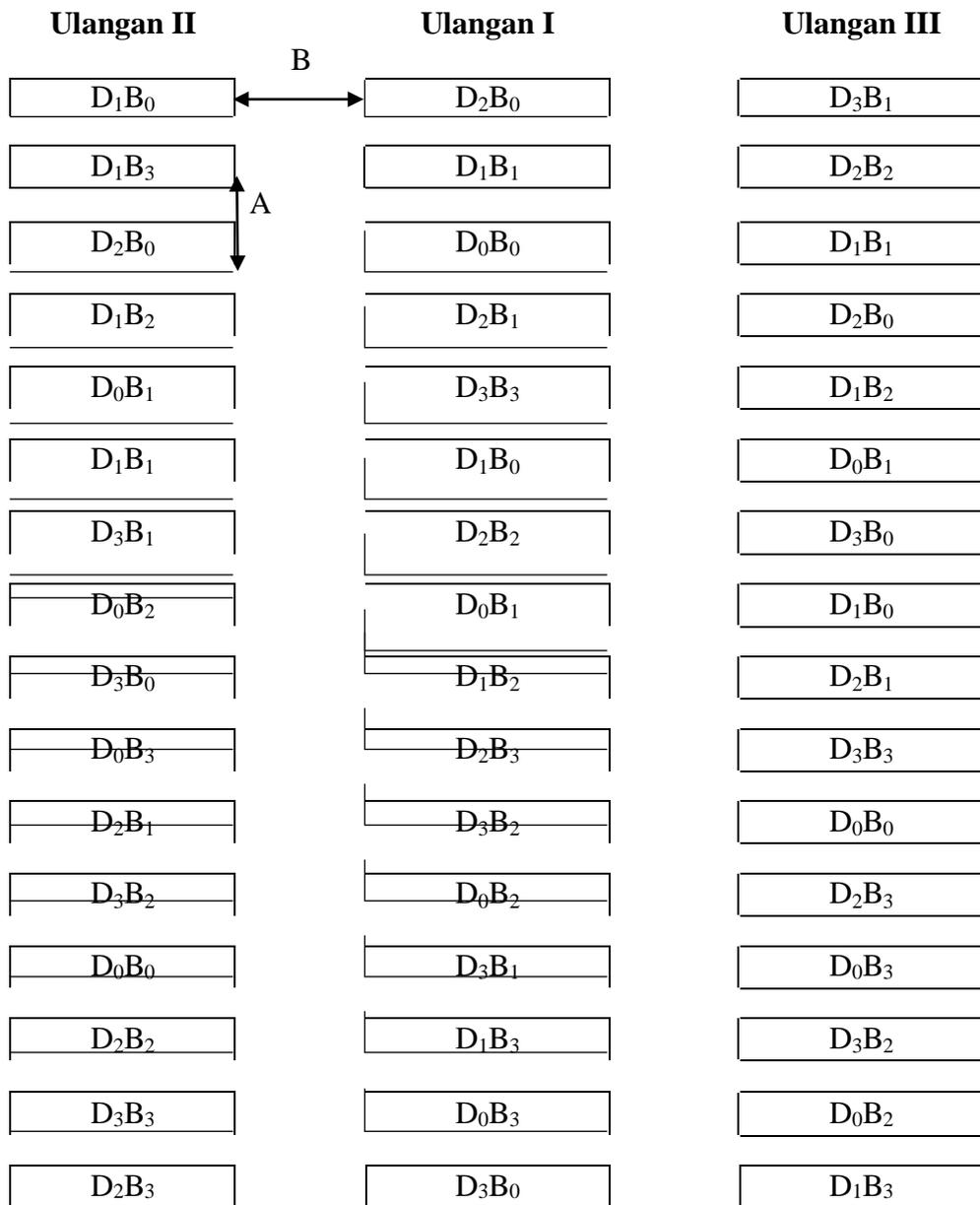
LAMPIRAN

Lampiran1. Komposisi Media *Murashige* dan *Skoog*

No.	Element	1 x (mgL ⁻¹)	gL ⁻¹	Note
1	Macroelements		10x	Stock solution kept in freezer at 4°C
	Calcium Chloride <i>CaCl₂</i>	332.02	3.3202	
	Potassium Dihydrogen Phosphate <i>KH₂PO₄</i>	170.00	1.7	
	Potassium Nitrate <i>KNO₃</i>	1900.00	19	
	Magnesium Sulfate <i>MgSO₄</i>	180.00	1.8	
	Ammonium Nitrate <i>NH₄NO₃</i>	1650.00	16.5	
2	Microelements		1000x	Stock solution kept in freezer at 4°C
	Cobalt Chloride <i>CoCl₂·6H₂O</i>	0.025	0.025	
	Cuprum Sulfate <i>CuSO₄·5H₂O</i>	0.025	0.025	
	Boric Acid H₃BO₃	6.20	6.2	
	Potassium Iodide KI	0.83	0.83	
	Manganese Sulfate <i>MnSO₄·4H₂O</i>	16.90	16.9	
	Sodium Molybdate <i>Na₂MoO₄·2H₂O</i>	0.25	0.25	
	Zinc Sulfate <i>ZnSO₄·7H₂O</i>	8.60	8.6	
3	Vitamins		100x	Kept in freezer at 4°C and stock solution placed in dark bottle
	Glycine <i>C₂H₅NO₂</i>	2.00	0.2	
	Nicotinic Acid <i>C₆H₅NO₂</i>	0.50	0.05	
	Pyridoxine <i>C₈H₁₁NO₃</i>	0.50	0.05	
	Thiamine <i>C₁₂H₁₇ClN₄O₅</i>	0.10	0.01	
4	Iron		100x	Stock solution kept in freezer at 4°C
	Disodium Ethylenediaminetetraacetic Acid <i>Na₂EDTA</i>	37.25	3.725	
	Ferrous Sulfate <i>FeSO₄·7H₂O</i>	27.85	2.785	
5	Other			Add each time when making medium
	<i>Myo-inositol</i>	100	0.1	
	Sucrose	30,000	30	

Sumber: *Murashige* dan *Skoog* 1962

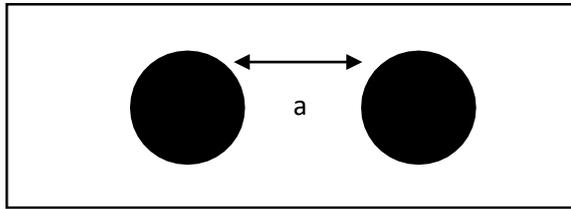
Lampiran 2. Bagan Penelitian

**Keterangan**

A: Jarak antarkultur 5 cm

B : Jarak antar eksplan sampel 5 cm

Lampiran 3. Bagan Plot Penelitian



Keterangan:

a :Jarak antar kultur 5 cm

● :Eksplan sekaligus sampel eksplan

Lampiran 4. Data Rataan Pengamatan Hari Muncul Kalus (Hari)

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
D ₀ B ₀	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D ₀ B ₁	26,00	23,00	45,00	94,00	31,33
D ₀ B ₂	15,00	13,00	14,00	42,00	14,00
D ₀ B ₃	18,00	16,00	15,00	49,00	16,33
D ₁ B ₀	15,00	16,00	17,00	48,00	16,00
D ₁ B ₁	17,00	16,00	22,00	55,00	18,33
D ₁ B ₂	16,00	16,00	18,00	50,00	16,67
D ₁ B ₃	22,00	19,00	24,00	65,00	21,67
D ₂ B ₀	20,00	18,00	14,00	52,00	17,33
D ₂ B ₁	24,00	26,00	29,00	79,00	26,33
D ₂ B ₂	22,00	14,00	19,00	55,00	18,33
D ₂ B ₃	23,00	14,00	22,00	59,00	19,67
D ₃ B ₀	18,00	16,00	14,00	48,00	16,00
D ₃ B ₁	30,00	15,00	17,00	62,00	20,67
D ₃ B ₂	17,00	18,00	18,00	53,00	17,67
D ₃ B ₃	18,00	19,00	19,00	56,00	18,67
Jumlah	301,00	259,00	307,00	867,00	
Rataan	18,81	16,19	19,19		18,06

Keterangan : Data ditransformasikan dengan $\sqrt{x} + 0,5$

Lampiran 5. Data Sidik Ragam Pengamatan Hari Muncul Kalus (Hari)

Perlakuan	DB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel 0,5}
2,4-D (D)	3	151,06	50,35	2,76 tn	2,90
<i>D</i> _{Linier}	1	69,34	69,34	3,80 tn	4,15
<i>D</i> _{Kuadratik}	1	72,52	72,52	3,97 tn	4,15
<i>D</i> _{Kubik}	1	9,20	9,20	0,50 tn	4,15
Benzyl Amino Purine (B)	3	876,90	292,30	16,02 *	2,90
<i>D</i> _{Linier}	1	97,54	97,54	5,34 *	4,15
<i>D</i> _{Kuadratik}	1	266,02	266,02	14,58 *	4,15
<i>D</i> _{Kubik}	1	513,34	513,34	28,13 *	4,15
Interaksi (D × B)	9	844,85	93,87	5,14 *	2,19
Galat	32	584,00	18,25		
Jumlah	47	2.456,81			

Keterangan :

- tn : tidak nyata
- * : nyata
- KK : 23,65%

Lampiran 6. Data Rataan Pengamatan Berat Basah Kalus (g) 8 MST.

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rataan
	I	II	III		
D ₀ B ₀	0,71	0,71	0,71	2,12	0,71
D ₀ B ₁	0,73	0,89	0,71	2,33	0,78
D ₀ B ₂	0,91	0,87	0,84	2,62	0,87
D ₀ B ₃	0,80	0,88	0,73	2,41	0,80
D ₁ B ₀	0,87	0,75	0,75	2,37	0,79
D ₁ B ₁	1,12	1,09	0,94	3,15	1,05
D ₁ B ₂	0,82	1,14	1,14	3,10	1,03
D ₁ B ₃	0,92	0,92	0,84	2,69	0,90
D ₂ B ₀	0,71	0,73	0,74	2,18	0,73
D ₂ B ₁	0,88	1,04	0,74	2,66	0,89
D ₂ B ₂	0,87	0,96	1,07	2,90	0,97
D ₂ B ₃	0,89	0,98	1,00	2,87	0,96
D ₃ B ₀	0,71	0,74	1,04	2,50	0,83
D ₃ B ₁	0,92	0,87	0,81	2,59	0,86
D ₃ B ₂	1,25	0,75	0,91	2,90	0,97
D ₃ B ₃	0,84	1,00	1,01	2,85	0,95
Jumlah	13,97	14,32	13,98	42,26	
Rataan	0,87	0,89	0,87		0,88

Keterangan : Data ditransformasikan dengan $\sqrt{x} + 0,5$

Lampiran 7. Data Sidik Ragam Pengamatan Berat Basah Kalus (g) 8 MST

Perlakuan	DB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel 0,5}
2,4-D (D)	3	0,15	0,05	3,76 *	2,90
<i>D_{Linier}</i>	1	0,05	0,05	3,64 tn	4,15
<i>D_{Kuadrat}</i>	1	0,05	0,05	3,99 tn	4,15
<i>D_{Kubik}</i>	1	0,05	0,05	3,64 tn	4,15
Benzyl Amino Purine (B)	3	0,25	0,08	6,14 *	2,90
<i>D_{Linier}</i>	1	0,14	0,14	10,27 *	4,15
<i>D_{Kuadrat}</i>	1	0,11	0,11	8,01 *	4,15
<i>D_{Kubik}</i>	1	0,00	0,00	0,16 tn	4,15
Interaksi (D × B)	9	0,08	0,01	0,68 tn	2,19
Galat	32	0,43	0,01		
Jumlah	47	0,91			

Keterangan:

- tn : tidak nyata
- * : nyata
- KK : 13,14%

Lampiran 8. Perkembangan Kalus Tanaman Jintan Hitam Umur 2, 4, 6 dan 8 MST



Kalus Tanaman Jintan Hitam Umur 2 MST



Kalus Tanaman Jintan Hitam Umur 4 MST



Kalus Tanaman Jintan Hitam Umur 6 MST



Kalus Tanaman Jintan Hitam Umur 8 MST