

**INDUKSI KALUS DAN EMBRIOGENESIS
TANAMAN GAHARU
(*Aquilaria malaccensis* Lamk)
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagian Syarat Guna
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si.)
dalam Ilmu Biologi



Diajukan Oleh:

SITI NUR HASANAH

NIM : 1908016019

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG
2023**

**INDUKSI KALUS DAN EMBRIOGENESIS
TANAMAN GAHARU
(*Aquilaria malaccensis* Lamk)
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagian Syarat Guna
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si.)
dalam Ilmu Biologi



Diajukan Oleh:

SITI NUR HASANAH

NIM : 1908016019

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG
2023**

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Siti Nur Hasanah

NIM : 1908016019

Jurusan : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

**“INDUKSI KALUS DAN EMBRIOGENESIS TANAMAN
GAHARU (*Aquilaria malaccensis Lamk*) SECARA IN
VITRO”**

Secara keseluruhan adalah hasil penelitian/karya saya sendiri, kecuali bagian tertentu yang dirujuk sumbernya.

Semarang, 19 Juli 2023

Pembuat Pernyataan




Siti Nur Hasanah

NIM. 1908016019



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
Jl. Prof. Dr. Hamka Ngaliyan Semarang
Telp.024-7601295 Fax.7615387

PENGESAHAN

Naskah skripsi berikut ini:

Judul : **INDUKSI KALUS DAN EMBRIOGENESIS TANAMAN GAHARU (*Aquilaria malaccensis* Lamk) SECARA *IN VITRO***
Penulis : **Siti Nur Hasanah**
NIM : 1908016019
Jurusan : Biologi

Telah diujikan dalam sidang tugas akhir oleh Dewan Penguji Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo dan dapat diterima sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana dalam Ilmu Biologi.

Semarang, 05 Oktober 2023

DEWAN PENGUJI

Penguji I,

Hafidha Asni Akmalia, M.Sc.
NIP: 198908212019032014

Penguji II,

Chusnul Adib Achmad, M.Si.
NIP: 198712312019031018

Dosen Pembimbing I,

Dosen Pembimbing II,

Dr. Baiq Farhatul Wahidah, M.Si.
NIP: 197502222009122002



Betalini Widhi Hapsari, M.Si.
NIP: 19810528 200502 2 001

NOTA DINAS 1

Semarang, 17 Juli 2023

Kepada
Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Walisongo di Semarang

Assalamu'alaikum. wr. wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : INDUKSI KALUS DAN EMBRIOGENESIS
TANAMAN GAHARU (*Aquilaria malaccensis*
Lamk) SECARA *IN VITRO*

Penulis : **Siti Nur Hasanah**

NIM : 1908016019

Jurusan : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang *Munaqasyah*.

Wassalamu'alaikum. wr. wb.

Pembimbing I,



Dr. Baiq Farhatul Wahidah, M.Si.

NIP. 197502222009122002

NOTA DINAS 2

Bogor, 14 Juli 2023

Kepada
Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Walisongo di Semarang

Assalamu'alaikum. wr. wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : INDUKSI KALUS DAN EMBRIOGENESIS
TANAMAN GAHARU (*Aquilaria malaccensis*
Lamk) SECARA *IN VITRO*

Penulis : **Siti Nur Hasanah**

NIM : 1908016019

Jurusan : Biologi

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam Sidang *Munaqasyah*.

Wassalamu'alaikum. wr. wb.

Pembimbing II,



Betalini Widhi Hapsari, M.Si.

NIP.19810528 200502 2 001

MOTTO

“Berusaha tenang dalam kondisi apapun, karena ketenangan dapat memberimu kekuatan.”

ABSTRAK

Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) merupakan salah satu tanaman yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Seringnya terjadi kegiatan eksploitasi secara berlebihan dan penebangan pohon secara liar menyebabkan tanaman gaharu masuk ke dalam salah satu tanaman yang terancam punah dan masuk ke dalam daftar CITES Appendix II. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi 2,4-D dan TDZ terhadap proses pembentukan kalus serta pengaruh kombinasi BAP, 2,4-D dan penambahan 500 mg/L *casein hydrolysate* terhadap somatik embriogenesis. Eksplan yang digunakan merupakan daun muda gaharu. Data dianalisis menggunakan analisis ANOVA dan dilanjutkan uji lanjutan (*Post hoc*) dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%. Hasil penelitian menunjukkan penambahan konsentrasi 0,5 ppm dan 1 ppm 2,4-D pada media berpengaruh tidak signifikan terhadap waktu munculnya kalus dan persentase eksplan berkalus, sedangkan pada proses induksi kalus gaharu menunjukkan pada perlakuan D2T0,5 (2 ppm 2,4-D dan 0,5 TDZ) dan D2T1 (2 ppm 2,4-D dan 1 ppm TDZ) memberikan tekstur meremah dan warna putih kekuningan. Pemberian BAP, 2,4-D, dan penambahan 500 mg/L *casein hydrolysate* mampu menghasilkan kalus yang embriogenik yang hampir mendekati proses embriogenesis.

Kata kunci: Gaharu, Kalus, Kultur Jaringan, Zat Pengatur Tumbuh

ABSTRACT

Agarwood (Aquilaria malaccensis Lamk) is a plant that has high economic value. Over-exploitation and illegal logging of trees often occur, so that agarwood is one of the endangered plants and included in the CITES Appendix II. The purpose of this study was to determine the effect of various concentrations of 2,4-D and TDZ on the process of callus formation and the effect of the combination of BAP, 2,4-D and the addition of 500 mg/L casein hydrolysate on somatic embryogenesis. The explants used are young agarwood leaves. Data were analyzed using ANOVA and continued with post hoc tests with the Duncan Multiple Range Test (DMRT) at 5% level. The results showed that the addition of concentrations of 0.5 ppm and 1 ppm 2,4-D in the media had no significant effect on the time of callus emergence and the percentage of explants with callus. Whereas in the process of induction of agarwood callus showed that in the treatment of D2T0.5 (2 ppm 2,4-D and 0.5 TDZ) and D2T1 (2 ppm 2,4-D and 1 ppm TDZ) it gave a crumbly texture and a yellowish white color. Administration of BAP, 2,4-D, and the addition of 500 mg/L casein hydrolysate were able to produce embryogenic calluses that were almost close to the process of embryogenesis.

Keywords: *Agarwood, Callus, Tissue Culture, Plant Growth Regulator*

TRANSLITERASI ARAB-LATIN

Penulisan transliterasi huruf-huruf Arab Latin dalam skripsi ini berpedoman pada SKB Menteri Agama dan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan R.I. Nomor : 158/1987 dan Nomor : 0543b/U/1987. Penyimpangan penulisan kata sandang [al-] disengaja secara konsisten supaya sesuai teks Arabnya.

| | | | |
|---|----|---|----|
| ا | A | ط | t} |
| ب | B | ظ | z} |
| ت | T | ع | ' |
| ث | s\ | غ | g |
| ج | J | ف | F |
| ح | H} | ق | Q |
| خ | Kh | ك | K |
| د | D | ل | L |
| ر | z\ | م | M |
| ر | R | ن | N |
| ز | Z | و | W |
| س | S | ه | H |
| | | ا | |
| ش | Sy | ء | ' |
| ص | s} | ي | Y |
| ض | d} | | |

Bacaan Madd :

a > = a panjang

i > = i panjang

u > = u panjang

Bacaan Diftong :

au = °و |

ai = °ي |

I = °ي |

KATA PENGANTAR

Ucapan syukur alhamdulillah, penulis panjatkan kepada Allah Swt. yang telah melimpahkan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya, sehingga peneliti dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Shalawat dan salam, peneliti haturkan kepada Nabi Muhammad saw., keluarga-Nya, para sahabat-Nya, dan tabiin-Nya dengan harapan semoga mendapatkan syafaat-Nya di hari akhir nanti. Aamiin.

Tak lupa, peneliti mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah berjasa dalam membantu, baik dalam penelitian maupun dalam penulisan skripsi ini. Ucapan terima kasih ini, peneliti sampaikan kepada:

1. Bapak dan Ibuku tercinta, Bapak Sutik dan Ibu Sumilah yang selalu memberi semangat, kasih sayang, nasihat, ridho, dan doanya dalam setiap langkah perjalanan hidupku.
2. Prof. Dr. H. Imam Taufiq, M.Ag., selaku Rektor UIN Walisongo Semarang.
3. Dr. H. Ismail, M.Ag., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang.
4. Dr. Baiq Farhatul Wahidah, M.Si., selaku Ketua Prodi Biologi dan Dosen Pembimbing I Skripsi yang senantiasa memberikan bimbingan dan arahan.

5. Betalini Widhi Hapsari, M.Si., selaku pembimbing II yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan dan pengarahan kepada peneliti.
6. Dr. Dyah Retno Wulandari, M.Si., selaku Ketua Kelompok Riset Rekayasa Selular Metabolit Tanaman , Pusat Riset Rekayasa Genetika ORHL BRIN beserta tim peneliti.
7. Bapak K.H. Fadlolan Musyaffa', Lc. MA. dan Ibu Nyai Hj. Fenty Hidayah, S.Pd., selaku pengasuh Pondok Pesantren Fadhlul Fadhlun Semarang yang selalu mendoakan dan memberi semangat kepada santrinya untuk selalu menuntut ilmu ke jenjang berikutnya (S2 di luar negeri).
8. Abah Misbahul Munir dan Budhe Mustaqimah, selaku guru ngaji di rumah yang selalu mendoakan dan memberikan restu untuk menuntut ilmu.
9. Kakak-kakak perempuanku Isti Darojatul Aliyah, S.Pd., dan Nurul Khasanah, S.Pd., adik laki-laki kesayanganku Zumarudin, kakak-kakak iparku Muhammad Zainudin dan Ahmad Ulinnuha, S.Pd., serta adik keponakanku Azriel Rahandika Alfariq dan Najla Tusamma Salsabila yang selalu memberi semangat dan motivasi hingga terselesainya studiku.
10. Keluarga besar Alm. Simbah Tawiyo bin Simbah Salidin dan keluarga besar Alm. Simbah Ruslan yang selalu

mendoakan dan memberikan restu untuk kesuksesan anak cucunya.

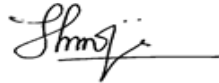
11. Rekan satu perjuangan, Dian Putri Rahmawati dan Fiyya Millatit Thoyyibah yang selalu menemani, menyemangati, dan mendengarkan keluh kesahku selama melakukan penelitian tugas akhir di BRIN Kawasan Dr. Ir. Soekarno, Cibinong Bogor.
12. Para Teknisi dan Asisten Peneliti Lab Kultur Jaringan, Mas Ajat, Mas Asep, dan Kak Aina, Adzra, Chike, Syarla, dkk., yang selalu membantu, memberi ilmu, dan menghiburku selama melakukan penelitian.
13. Sahabat-sahabatku, Siti Cholifatul Ma'rifah, Nur Khannah Khoirun Nada, Ines Indiana, yang selalu menasihati dan menyemangatiku.
14. Sahabat-sahabat Biologi 2019, yang telah mengisi memori kenanganku di UIN Walisongo Semarang.
15. Anggota KKN MIT-14 Kelompok 14 UIN Walisongo Semarang yang selalu dramatis dan menghiburku selama KKN.
16. Semua pihak yang telah membantu terselesainya penulisan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Hanya ucapan terima kasih yang dapat peneliti sampaikan dan semoga Allah Swt. membalas semua kebaikan

mereka. Pembaca yang budiman, kritik dan saran yang membangun selalu peneliti harapkan demi sempurnanya skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat, khususnya bagi peneliti. Aamiin.

Semarang, 19 Juli 2023

Peneliti

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Siti Nur Hasanah', with a horizontal line extending to the right.

Siti Nur Hasanah

NIM. 1908016019

DAFTAR ISI

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| PERNYATAAN KEASLIAN | iv |
| PENGESAHAN..... | v |
| NOTA DINAS 1..... | iv |
| NOTA DINAS 2..... | v |
| MOTTO | vi |
| ABSTRAK..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| TRANSLITERASI ARAB-LATIN..... | ix |
| KATA PENGANTAR..... | x |
| DAFTAR ISI | xiv |
| DAFTAR TABEL | xviii |
| DAFTAR GAMBAR..... | xxi |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xxiii |
| BAB I PENDAHULUAN | 24 |
| A. Latar Belakang Masalah | 24 |
| B. Rumusan Masalah..... | 30 |
| C. Tujuan Penelitian..... | 30 |

| | |
|---|-----------|
| D. Manfaat Penelitian | 31 |
| BAB II LANDASAN PUSTAKA | 33 |
| A. Kajian Teori | 33 |
| 1. Tanaman Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) | 33 |
| 2. Pembentukan Senyawa Aromatik pada Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) | 35 |
| 3. Teknik <i>In Vitro</i> Tanaman Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) | 38 |
| 4. Induksi Kalus Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) | 41 |
| 5. Media Kultur | 44 |
| 6. Zat Pengatur Tumbuh | 48 |
| B. Kajian Penelitian Yang Relevan | 53 |
| C. Kerangka Berpikir | 55 |
| D. Hipotesis Penelitian | 56 |
| BAB III METODE PENELITIAN | 57 |
| A. Jenis dan Pendekatan Penelitian | 57 |
| B. Tempat dan Waktu Penelitian | 57 |
| C. Alat dan Bahan | 58 |
| D. Populasi dan Sampel Penelitian | 59 |
| E. Parameter Penelitian | 61 |
| F. Prosedur Kerja | 62 |

| | |
|---|-----------|
| 1. Sterilisasi Alat | 62 |
| 2. Pembuatan Media Perlakuan | 62 |
| 3. Sterilisasi dan Inisiasi Eksplan | 63 |
| 4. Induksi Kalus..... | 66 |
| G. Rancangan Penelitian | 67 |
| 1. Induksi Kalus terhadap Waktu Munculnya Kalus dan Persentase Eksplan Berkalus pada Tanaman Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk)..... | 67 |
| 2. Induksi Kalus Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) terhadap Diameter, Struktur, Warna, serta Berat Basah dan Kering Kalus..... | 68 |
| 3. Proses Embriogenesis | 69 |
| H. Teknik Analisis Data | 70 |
| 1. Induksi Kalus terhadap Waktu Munculnya Kalus dan Persentase Eksplan Berkalus Tanaman Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk)..... | 70 |
| 2. Induksi Kalus Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) terhadap Diameter, Struktur, Warna, serta Berat Basah dan Kering Kalus..... | 71 |
| 3. Proses Embriogenesis | 72 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 73 |

| | |
|---|------------|
| A. Pengaruh 2,4-D terhadap Waktu Munculnya Kalus dan Persentase Eksplan Berkalus | 73 |
| 1. Waktu Munculnya Kalus..... | 73 |
| 2. Persentase Eksplan Berkalus | 79 |
| B. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi 2,4-D dengan TDZ terhadap Induksi Kalus Tanaman Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) | 84 |
| 1. Diameter Kalus | 85 |
| 2. Tekstur Kalus | 90 |
| 3. Warna Kalus | 93 |
| 4. Berat Basah dan Berat Kering Kalus | 110 |
| C. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi BAP dan 2,4-D Terhadap Somatik Embriogenesis | 115 |
| BAB V SIMPULAN DAN SARAN | 122 |
| A. Simpulan..... | 122 |
| B. Saran..... | 123 |
| DAFTAR PUSTAKA | 124 |
| LAMPIRAN..... | 136 |
| RIWAYAT HIDUP | 153 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Judul | Halaman |
|--------------|---|----------------|
| Tabel 2.1 | Kombinasi media MS (Murashige & Skoog 1962) | 47 |
| Tabel 2.2 | Kajian penelitian yang relevan | 53 |
| Tabel 3.1 | Parameter penelitian | 61 |
| Tabel 3.2 | Jenis eksplan daun gaharu dan konsentrasi 2,4-D terhadap proses inisiasi | 68 |
| Tabel 3.3 | Kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan TDZ terhadap induksi kalus (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) | 69 |
| Tabel 3.4 | Kombinasi konsentrasi ZPT BAP dan 2,4-D terhadap proses embriogenesis | 70 |
| Tabel 4.1 | Uji <i>One-Way Analysis of Variance</i> (ANOVA) rata-rata waktu munculnya kalus | 76 |
| Tabel 4.2 | Waktu kediniian munculnya kalus pada berbagai konsentrasi 2,4-D dan jenis eksplan | 77 |
| Tabel 4.3 | Uji <i>One-Way Analysis of Variance</i> (ANOVA) rata-rata persentase eksplan berkalus | 81 |

| Tabel | Judul | Halaman |
|--------------|--|----------------|
| Tabel 4.4 | Rata-rata persentase eksplan berkalus pada jenis eksplan daun gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) | 82 |
| Tabel 4.5 | Uji <i>One-Way Analysis of Variance</i> (ANOVA) rata-rata panjang diameter kalus gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) setelah diinduksi selama delapan minggu | 85 |
| Tabel 4.6 | Rata-rata panjang diameter kalus gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) setelah diinduksi selama delapan minggu | 86 |
| Tabel 4.7 | Tekstur kalus gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) setelah diinduksi selama delapan minggu | 91 |
| Tabel 4.8 | Warna kalus gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) setelah diinduksi selama delapan minggu | 94 |
| Tabel 4.9 | Uji <i>One-Way Analysis of Variance</i> (ANOVA) rata-rata berat basah kalus | 110 |
| Tabel 4.10 | Uji <i>One-Way Analysis of Variance</i> (ANOVA) rata-rata berat kering kalus | 111 |

| Tabel | Judul | Halaman |
|--------------|--|----------------|
| Tabel 4.12 | Rata-rata berat basah dan berat kering kalus gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) setelah diinduksi selama delapan minggu | 112 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Judul | Halaman |
|---------------|---|----------------|
| Gambar 2.1 | Bibit tanaman gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) | 35 |
| Gambar 2.2 | Tanaman gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) | 35 |
| Gambar 2.3 | Struktur kimia 2,4-D | 50 |
| Gambar 2.4 | Struktur kimia TDZ | 51 |
| Gambar 2.5 | Struktur Kimia BAP | 52 |
| Gambar 3.1 | Daun muda gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) | 59 |
| Gambar 4.1 | Eksplan daun gaharu | 75 |
| Gambar 4.2 | Kalus gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk) | 79 |
| Gambar 4.3 | Diameter kalus | 87 |
| Gambar 4.4 | Tesktur kalus | 92 |
| Gambar 4.5 | Morfologi dan warna kalus pada media D0T0 | 98 |
| Gambar 4.6 | Morfologi dan warna kalus pada media D0T0,5 | 99 |
| Gambar 4.7 | Morfologi dan warna kalus pada media D0T1 | 100 |
| Gambar 4.8 | Morfologi dan warna kalus pada media D1T0 | 101 |

| Gambar | Judul | Halaman |
|---------------|--|----------------|
| Gambar 4.9 | Morfologi dan warna kalus pada media D1T0,5 | 102 |
| Gambar 4.10 | Morfologi dan warna kalus pada media D1T1 | 103 |
| Gambar 4.11 | Morfologi dan warna kalus pada media D2T0 | 104 |
| Gambar 4.12 | Morfologi dan warna kalus pada media D2T0,5 | 105 |
| Gambar 4.13 | Morfologi dan warna kalus pada media D2T1 | 106 |
| Gambar 4.14 | Morfologi dan warna kalus pada media D3T0 | 107 |
| Gambar 4.15 | Morfologi dan warna kalus pada media D3T0,5 | 108 |
| Gambar 4.16 | Morfologi dan warna kalus pada media D3T1 | 109 |
| Gambar 4.17 | Penampilan kalus yang terbentuk pada penambahan BAP dan 2,4-D serta 500 mg/L <i>casein hydrolysate</i> selama 4 minggu | 116 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Judul | Halaman |
|-----------------|--|----------------|
| Lampiran 1 | Surat Izin Penelitian | 136 |
| Lampiran 2 | Perhitungan dan Pengambilan Larutan Stok Zat Pengatur Tumbuh | 137 |
| Lampiran 3 | Hasil <i>Uji Analysis of Variance</i> (ANOVA) | 140 |
| Lampiran 4 | Hasil <i>Uji Duncan Multiple Range Test</i> (DMRT) Pada Taraf 5% | 145 |
| Lampiran 5 | Gambar Pengambilan Eksplan | 150 |
| Lampiran 6 | Gambar Sterilisasi Eksplan | 150 |
| Lampiran 7 | Gambar Mikroskop | 151 |
| Lampiran 8 | Gambar Pengamatan di Mikroskop | 151 |
| Lampiran 9 | Gambar Penimbangan Kalus | 152 |

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Tingkat keanekaragaman jenis pohon di negara Indonesia tergolong sangat tinggi. Salah satu contohnya adalah tanaman gaharu. Tanaman gaharu merupakan salah satu contoh tanaman hutan yang memiliki nilai ekonomi tinggi karena terdapat banyak manfaat yang dimilikinya, diantaranya adalah dapat digunakan sebagai bahan kosmetik, minyak wangi, dupa, obat-obatan, dan sebagai pencegah stres. Besarnya peran dan manfaat pohon tersebut dalam kehidupan sehari-hari menyebabkan sering terjadinya kegiatan eksploitasi secara berlebihan dan penebangan pohon secara liar sehingga berdampak pada kualitas lingkungan. (Sumarna, 2012).

Bagian tanaman yang memiliki nilai ekonomi sangat tinggi adalah gubal yang terletak di bagian batang tanaman tersebut, sehingga pemanfaatannya harus dengan menebang tegakan pohon yang ada. Pohon yang berisi gubal gaharu dan yang tidak bergubal sering kali tidak dapat dilihat langsung, harus dengan menebang batang pohon tersebut sehingga penebangan liar banyak terjadi, dan ketika dalam pohon tersebut tidak terdapat gubal,

pohon yang sudah ditebang ditinggalkan begitu saja oleh para pencari gubal (Kodey *et al.*, 2021). Hal ini yang menyebabkan keberadaan tanaman ini menjadi terancam dan sejak tahun 2001 tanaman gaharu masuk ke dalam daftar tanaman terancam kepunahan berdasarkan CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) kategori APPENDIX II. Banyaknya manfaat tanaman gaharu tersebut, seharusnya menjadikan Indonesia lebih giat dalam budidaya sehingga dapat meningkatkan pelestarian plasma nutfah gaharu dan menambah devisa negara (Sumarna, 2012).

Populasi tanaman gaharu yang semakin menurun disebabkan oleh kegiatan eksploitasi secara berlebihan dan tidak bijaksana. Tingkat permintaan konsumen yang relatif tinggi dan tidak diimbangi dengan produksi yang tinggi juga dapat menyebabkan semakin punahnya populasi tanaman gaharu. Untuk mengatasi hal tersebut, perlu diadakan peningkatan budidaya tanaman gaharu terutama pada bibit tanaman tersebut (Wahyuni, Satria, & Zainal, 2020).

Dalam penelitian ini eksplan yang digunakan merupakan bibit tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) yang berumur sekitar kurang lebih 2 tahun yang berada di *polybag*. Bibit tersebut berasal dari kota

Bengkulu. Pemilihan pohon ini dipilih karena bibit tersebut berasal dari pohon indukan yang sudah berusia sekitar 80 tahun dan seluruh batangnya mengandung gubal gaharu, tetapi karena cara pemanenan yang mereka lakukan tidak dengan penebangan, hanya dengan menyayat kulit pohonnya setiap 2-3 bulan sekali, sampai saat ini tanamannya masih ada dan dijadikan indukan untuk bibit perbanyak tanaman dengan menggunakan bijinya. Tingkat penyebaran tanaman gaharu di Bengkulu juga tergolong sangat rendah, hal tersebut dibuktikan dengan jarak tegakan pohon gaharu antara satu kelompok sangat berjauhan. Budidaya tanaman gaharu di Bengkulu juga belum terlaksana dengan maksimal. Sehingga diperlukan cara budidaya tanaman gaharu secara efisien (Wiriadinata *et al.*, 2010).

Salah satu cara budidaya tanaman gaharu dapat dilakukan secara generatif dengan menggunakan biji. Perbanyak melalui biji memiliki tingkat kematian yang cukup tinggi. Hal tersebut dikarenakan daya perkecambahan pada biji relatif rendah yaitu 47% sehingga menyebabkan kelangsungan hidupnya rendah (Wahyuni, Satria, & Zainal, 2020). Selama ini perbanyak tanaman gaharu dengan menggunakan biji sulit dilakukan mengingat biji tanaman gaharu ini bersifat rekalsitran

(Wahyuni, Satria, & Zainal, 2020). Budidaya secara vegetatif juga tidak menghasilkan hasil yang maksimal. Hal tersebut dikarenakan semakin bertambahnya usia tanaman mengakibatkan cepat hilangnya kemampuan berakar pada tanaman, sehingga menghasilkan bibit dengan skala terbatas dan juga membutuhkan waktu yang sangat lama.

Salah satu cara alternatif dalam budidaya tanaman gaharu adalah dengan teknik kultur jaringan. Teknik kultur jaringan merupakan salah satu metode untuk memperbanyak diri dan regenerasi menjadi suatu tanaman yang utuh kembali dengan cara menumbuhkan bagian tanaman yang diisolasi seperti protoplasma, sel, jaringan, atau organ, pada kondisi yang aseptik. Kelebihan dari teknik ini adalah menghasilkan bibit dalam jumlah yang lebih besar dalam waktu yang relatif singkat, bebas penyakit, tidak tergantung pada iklim dan cuaca, sehingga mendapatkan bahan tanam yang bebas dari patogen. Dalam pembibitan teknik ini juga tidak membutuhkan lahan yang luas dan dapat memperbanyak tanaman tertentu yang secara konvensional sulit untuk diperbanyak (Piter & Ziraluo, 2021).

Penggunaan teknik kultur jaringan semakin penting dalam konservasi plasma nutfah tanaman dan

dalam menjaga produk-produk berharga dari kepentingan obat dan komersial. Hal tersebut, dapat membantu dalam mengurangi eksploitasi berlebihan yang tidak terkendali dari spesies pohon yang terancam punah, sehingga dapat memberikan kesempatan penting untuk melestarikan tanaman tersebut (Saikia, Shrivastava, & Singh, 2012).

Dalam penulisan skripsi ini, penulis juga berlandaskan salah satu firman Allah yaitu surah At- Thaha ayat 53, sebagai berikut.

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ
أَنْوَاجًا مِنْ تَنْبَاتٍ شَتَّى

“(Tuhan) yang telah menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu, dan menjadikan jalan-jalan di atasnya bagimu, dan yang menurunkan air (hujan) dari langit. Kemudian kami tumbuhkan dengannya (air hujan itu) berjenis-jenis aneka macam tumbuh-tumbuhan.” (QS. At-Thaha ayat : 53)

Berdasarkan Al-Quran surah At-Thaha ayat 53 tersebut, Allah menunjukkan kekuasaan-Nya salah satunya dengan penciptaan bumi yang disertai dengan penciptaan berbagai tumbuhan yang beraneka ragam. Tumbuhan yang beraneka ragam tersebut diantaranya adalah tanaman gaharu, dimana tanaman gaharu merupakan tumbuhan

yang memiliki keanekaragaman yang tinggi dan melimpah di alam.

Salah satu keunggulan perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan adalah untuk perbanyakan vegetatif tanaman yang mempunyai permintaan tinggi karena laju perbanyakan secara konvensional memiliki tingkat keberhasilan yang rendah (Hapsari *et al.*, 2019). Keberhasilan kultur jaringan melalui penggandaan tunas, organogenesis maupun embriogenesis somatik tergantung dari beberapa faktor, meliputi faktor eksternal dan faktor internal. Salah satu faktor eksternal yang mempengaruhi proses pertumbuhan eksplan adalah pemberian zat pengatur tumbuh. Dalam penelitian ini zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk menginduksi kalus adalah *2,4-Dichlorophenoxy acid* (2,4-D) dan *Thidiazuron* (TDZ). Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan zat pengatur tumbuh jenis auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi kalus dari berbagai jaringan tumbuhan (Rudiyanto *et al.*, 2016). Pemberian TDZ dengan konsentrasi rendah lebih cepat menginduksi kalus daripada konsentrasi yang tinggi (Restanto *et al.*, 2018).

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka dilakukan penelitian dengan judul “Inisiasi dan Induksi Kalus Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)

secara *In Vitro*". Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi 2,4-D terhadap proses inisiasi dan untuk mengetahui kombinasi variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh (2,4-D dan TDZ) terhadap induksi kalus tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk).

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh ZPT 2,4-D terhadap waktu munculnya kalus dan persentase eksplan berkalus pada tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)?
2. Bagaimana pengaruh kombinasi variasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan TDZ terhadap diameter, struktur, warna, serta berat basah dan berat kering kalus pada tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)?
3. Bagaimana pengaruh kombinasi variasi konsentrasi ZPT BAP dan 2,4-D serta penambahan *casein hydrolysate* terhadap proses embriogenesis pada kalus tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh ZPT 2,4-D terhadap waktu munculnya kalus dan persentase eksplan berkalus pada tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk).
2. Untuk mengetahui pengaruh kombinasi variasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan TDZ terhadap diameter, struktur, warna, serta berat basah dan berat kering kalus pada tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk).
3. Untuk mengetahui pengaruh kombinasi variasi konsentrasi ZPT BAP dan 2,4-D serta penambahan *casein hydrolysate* terhadap proses embriogenesis pada kalus tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk).

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk berbagai pihak, diantaranya sebagai berikut:

1. Manfaat Teoritis

Memberikan sumber pengetahuan dan informasi secara teoritis tentang perbanyakan tanaman gaharu secara *in vitro* dan sebagai salah satu alternatif dalam perbanyakan tanaman gaharu yang didapatkan dalam waktu relatif singkat dan seragam melalui teknik *in vitro*.

2. Manfaat Praktis

a. Bagi Prodi

Penelitian ini diharapkan dapat menambah referensi untuk perpustakaan keilmuan Biologi secara nasional maupun perpustakaan regional di wilayah UIN Walisongo Semarang terutama berkaitan dengan penelitian perbanyakan tanaman gaharu secara *in vitro*.

b. Bagi Peneliti

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai salah satu rujukan dalam penelitian selanjutnya, menambah pengalaman dan wawasan, serta mengembangkan keterampilan dalam melakukan penelitian induksi kalus tanaman gaharu secara *in vitro*.

c. Bagi Wirausaha

Bagi para pengusaha gubal tanaman gaharu, dapat dijadikan sebagai alternatif untuk memperbanyak koleksi sumber bibit tanaman gaharu yang seragam dan mendapatkannya dalam waktu yang relatif singkat.

BAB II

LANDASAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

1. Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)

Di Indonesia Produk Hasil Hutan Bukan Kayu (HHBK) tergolong sangat melimpah, komoditi gaharu merupakan salah satu diantaranya yang berpotensi untuk dikembangkan dan bernilai komersial tinggi. Dalam perdagangan internasional gaharu dikenal dengan sebutan *agarwood*, *aloeswood*, atau *eaglewood*. Tanaman gaharu merupakan salah satu kelompok tumbuhan penghasil aromatik bernilai komersial tinggi dalam bentuk gubal gaharu dan kemedangan.

Populasi jenis pohon penghasil gaharu di hutan alam semakin berkurang, khususnya jenis *Aquilaria* sp. dan *Gyrinops* sp. Hal tersebut menyebabkan pada 20 tahun terakhir terjadi penurunan ekspor gaharu. *Aquilaria malaccensis* Lamk dan *Gyrinops* yang merupakan jenis penghasil gaharu berkualitas terbaik. Jenis gaharu tersebut, saat ini sangat sulit ditemukan di hutan alam Sumatera dan Kalimantan (Usuliddin, Burhanuddin, & Addurrani, 2018).

Salah satu karakteristik dari tanaman gaharu yang menonjol adalah aromanya yang harum. Gubal yang dihasilkan oleh tanaman gaharu tersebut dapat menghasilkan bau yang wangi. Gubal merupakan respons dari adanya patogen yang masuk ke dalam jaringan dan menginfeksi pohon penghasil gaharu, hal tersebut dapat terjadi secara sengaja maupun tidak sengaja. Respons dari pohon yang terinfeksi tersebut akan menghasilkan suatu senyawa yang disebut dengan senyawa fitoaleksin. Senyawa fitoaleksin merupakan senyawa yang berfungsi sebagai pertahanan penyakit atau patogen (Sitepu *et al.*, 2011).

Klasifikasi dan gambar tanaman gaharu *Aquilaria malaccensis* Lamk adalah sebagai berikut.

Kingdom : Plantae
Phylum : Tracheophyta
Class : Magnoliopsida
Order : Malvales
Family : Thymelaeaceae
Genus : *Aquilaria*
Spesies : *Aquilaria malaccensis* Lamk.
(GBIF, 2019)



Gambar 2.1 Bibit Tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) (Dokumen Penelitian, 2022)



Gambar 2.2 Tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) (A) Pohon, (B) Bunga, (C) Buah, (D) Biji belum matang dan matang (Kharnainor, S & Shiny C T, 2021)

2. Pembentukan Senyawa Aromatik pada Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)

Gubal gaharu (*aromatic resin*) berasal dari pohon atau bagian dari pohon penghasil gaharu yang

tumbuh secara alami sebagai akibat dari proses infeksi yang terjadi baik secara alami atau buatan (inokulasi mikroba) pada pohon tersebut. Terbentuknya gubal gaharu sebagai akibat pohon terluka dan terinfeksi oleh penyakit. Mekanisme pembentukan gubal gaharu dimulai saat mikroba atau cendawan pembentuk gubal masuk ke dalam batang kayu gaharu. Masuknya mikroba tersebut ke dalam gubal akan memanfaatkan cairan sel dalam kayu, sehingga lama kelamaan kayu akan berwarna gelap dan pohon akan mati. Pohon gaharu yang terinfeksi oleh mikroba yang tidak sesuai tidak akan menghasilkan gubal gaharu. Menurut Gusmalawati (2017), pada saat pohon penghasil gubal gaharu terinfeksi penyakit maka secara biologis penyakit akan masuk melalui luka patahan cabang, selanjutnya energi hara dari sel-sel pada jaringan kayu akan dikonsumsi cendawan dan mengakibatkan pohon akan mati dan akan membentuk damar wangi (resin) dalam kayu tersebut. Apabila damar wangi (resin) tersebut terbakar maka akan menghasilkan bau yang harum. Zat yang berbau harum tersebut terjadi pada tanaman gaharu yang sakit dan tidak terdapat pada pohon yang sehat.

Pembentukan gubal gaharu tersebut, dapat menghasilkan senyawa *phytalyosin* yang berfungsi sebagai pertahanan terhadap stres serangan hama/penyakit pada tanaman gaharu *Aquilaria malaccensis* Lamk. Senyawa *phytalyosin* tersebut dapat berupa resin berwarna coklat dan beraroma harum, serta menumpuk di pembuluh xilem dan floem untuk mencegah meluasnya luka ke jaringan lain (Winarsih *et al.*, 2014). Zat ekstraktif yang terdapat pada gubal gaharu disebut sebagai metabolit sekunder. Bau harum dari gubal gaharu dikarenakan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, terpena, fenol, alkaloid, sterol, lilin, lemak, tanin, gula, gum, suberin, dan asam resin (Herawati *et al.*, 2015). Dalam kondisi *in vitro*, senyawa tersebut dapat diinduksi melalui kultur tunas atau kalus/suspensi dengan perlakuan hifa/filtrat cendawan atau senyawa kimia tertentu. Kultur kalus gaharu yang ditumbuhkan pada media semi padat diduga juga menghasilkan senyawa metabolit sekunder jika diinduksi cendawan patogen penginduksi resin, *Fusarium* sp. Kultur suspensi sel tanaman juga sangat berguna untuk mempelajari biosintesis dari metabolit sekunder (Leksonowati, 2016).

3. Teknik *In Vitro* Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)

Salah satu jenis tanaman penghasil gubal gaharu berkualitas baik adalah *Aquilaria malaccensis* Lamk. Gaharu tersebut memiliki nilai sosial, budaya, dan ekonomi yang cukup tinggi sehingga tidak salah banyak yang tertarik untuk memanfaatkannya. Perkembangan pemanfaatan tanaman tersebut saat ini telah meluas, padahal keberadaan tanaman ini di alam sudah semakin jarang sehingga harus dilakukan budidaya terhadap tanaman tersebut. Sejauh ini upaya yang dilakukan dalam budidaya masih menemui banyak kendala, maka perlu dilakukan upaya alternatif lain dalam mengatasi masalah ini, salah satunya dengan menggunakan teknik kultur jaringan. Kultur jaringan merupakan cara yang efektif untuk menghasilkan bibit tanaman dalam jumlah banyak, dalam waktu relatif singkat dan hasil yang seragam (Samanhudi *et al.*, 2022).

Teori totipotensi sel (*cellular totipotency*) merupakan teori yang mendasari kultur jaringan tanaman. Teori tersebut menyatakan bahwa setiap sel tanaman memiliki kapasitas untuk beregenerasi membentuk tanaman secara utuh. Tanaman baru yang

dihasilkan dengan teknik ini bersifat identik dengan induknya, dan hasil tanaman kultur jaringan yang sudah memiliki tunas, batang, daun, dan akar disebut planlet (Dwiyani, 2015).

Metode perbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan dapat menghasilkan jumlah tanaman baru tidak hanya satu, tapi bisa puluhan hingga ratusan (dari satu bahan tanam atau eksplan). Metode perbanyak dengan teknik tersebut tergolong dalam perbanyak vegetatif, maksudnya tidak melibatkan adanya fertilisasi antara sel telur dan sel kelamin jantan seperti halnya pembentukan biji pada tanaman, hal tersebut yang menyebabkan planlet yang dihasilkan identik dengan induknya. Perbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan disebut juga mikropropagasi atau perbanyak mikro. Kata “mikro” mengacu pada bahan tanam awal yang digunakan yaitu eksplan yang berukuran kecil (*micro*=kecil), bahkan dapat mencapai kurang lebih sama dengan 1 mm pada kultur meristem (Dwiyani, 2015).

Bahan tanam awal yang digunakan dalam mikropropagasi disebut dengan eksplan. Eksplan dapat berupa sel (kultur sel), protoplas (kultur protoplas), epidermis, empulur (kultur jaringan),

meristem apikal dan lateral (kultur meristem), tunas apikal maupun lateral (kultur tunas), serta irisan batang, daun maupun akar (kultur organ). Jika melihat dari bahan tanam yang digunakan dalam mikropropagasi, istilah “kultur *in vitro*” lebih sesuai digunakan jika dibandingkan dengan “kultur jaringan” hal tersebut dikarenakan bahan tanam yang dikulturkan sangat beranekaragam, bukan hanya jaringan. Kata *in vitro* berasal dari bahasa Latin yang berarti “di dalam gelas” (dalam bahasa Inggris “*in glass*”), yang menggambarkan suatu proses dalam biologi yang berlangsung di dalam tabung gelas atau botol kultur, di luar tubuh makhluk hidup (Dwiyani, 2015).

Eksplan yang ditanam pada media dapat berubah warna menjadi coklat yang disebabkan oleh peran enzim *polifenol oksidase* yang mengoksidasi senyawa fenol yang keluar dari irisan eksplan. Penyebab *browning* lainnya juga dikarenakan adanya pelukaan akibat pemotongan dan eksplan yang digunakan terlalu muda. Hal ini juga dapat mengalami kematian pada jaringan eksplan. Pencoklatan eksplan disebut juga dengan *browning*. Pada beberapa literatur lain ada yang menyebutnya dengan istilah *staining*.

Eksplan yang mengalami *browning* dapat mengeluarkan senyawa fenoliknya ke dalam media yang dapat menghambat pertumbuhan eksplan lainnya yang tidak mengalami *browning*, oleh karena itu eksplan harus dipindah ke media baru. Istilah pada pemindahan kultur ke media baru disebut dengan subkultur. Sebelum menjadi planlet eksplan akan membentuk bentuk baru yang disebut dengan propagul. Propagul dapat berupa kalus, dan organ (tunas, akar). Kumpulan sel yang tidak terorganisir inilah yang disebut dengan kalus.

Teknik *in vitro* tanaman gaharu dapat dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya pembentukan tunas adventif dan lateral untuk memperbanyak bibit tanaman gaharu, suspensi sel dan kultur kalus untuk menghasilkan metabolit sekunder dan pembentukan tanaman melalui embrio somatik dan organogenesis, dan kultur protoplas untuk meningkatkan keragaman genetik tanaman (Sukmadjaja *et al.*, 2017)

4. Induksi Kalus Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)

Kalus merupakan kumpulan sel yang belum terdiferensiasi. Bagian irisan/luka dari organ yang

dikulturkan akan membentuk kalus, tetapi kalus juga dapat terbentuk pada bagian sebelah dalam (interior) pada beberapa spesies tanaman. Dediferensiasi merupakan kalus yang terbentuk dari eksplan berupa organ tanaman yang sudah terdiferensiasi seperti daun, batang, tunas, dan akar. Organ tanaman tersebut yang sel-selnya sudah terdiferensiasi dikembalikan lagi menjadi terdiferensiasi. Jika nanti kalus-kalus ini kembali membentuk tunas, disebut mengalami diferensiasi (Dwiyani, 2015).

Induksi kalus merupakan langkah pertama dalam menghasilkan dan memperbanyak sel kalus secara massal dalam teknik kultur *in vitro*. Setiap sel pada tanaman mempunyai kemampuan dapat membentuk individu baru sehingga kalus merupakan sumber bahan tanam yang penting dalam regenerasi tanaman. Dalam rangka mendapatkan bibit gaharu dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang relatif singkat strategi kultur jaringan melalui induksi kalus sangat efektif karena kalus dapat diinisiasi dari bagian tanaman mana pun (Rasud, 2020).

Struktur kalus yang kompak dapat dimanfaatkan untuk organogenesis, sedangkan kalus meremah lebih cocok dimanfaatkan untuk

embriogenesis (Wahyuni *et al.*, 2017). Embriogenesis somatik merupakan salah satu metode regenerasi yang mempunyai tahapan perkembangan fase globular, hati, torpedo, dan planlet (Rineksane *et al.*, 2012).

Embriogenesis somatik merupakan metode kultur jaringan tanaman yang digunakan paling luas dalam sistem mikropropagasi komersial dan tujuan konservasi (Science, 2020). Embriogenesis somatik adalah suatu proses embrio dari eksplan yang berupa sel-sel somatik yang telah mengalami dediferensiasi. Sel-sel somatik yang telah mengalami dediferensiasi selanjutnya ditransfer ke dalam medium yang sesuai dan jika proses induksi dediferensiasinya benar, maka gen-gen yang bertanggung jawab terhadap totipotensi akan berfungsi, pembelahan sel-selnya menjadi terkendali, dan akhirnya terbentuk embrio. Embrio yang terbentuk akan tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh melalui proses embriogenesis (Rusdianto & Ari, 2012).

Sebagian sel-sel kalus yang terbentuk bersifat embrionik, yaitu kalus hanya memiliki kemampuan untuk terus membelah (proliferasi) menghasilkan sel-sel kalus yang baru, sebagian lagi bersifat embriogenik yaitu kalus yang dapat berkembang menjadi embrio

somatik setelah kalus tersebut ditransfer ke dalam medium yang sesuai. Embrio somatik dapat terbentuk melalui dua jalur, yaitu secara langsung maupun tidak langsung (melewati fase kalus). Keberhasilan akan tercapai apabila kalus atau sel yang digunakan bersifat embriogenik yang dicirikan oleh sel yang berukuran kecil, sitoplasma padat, inti besar, vakuola kecil-kecil dan mengandung butir pati (Rusdianto & Ari, 2012).

5. Media Kultur

Salah satu faktor keberhasilan teknik kultur jaringan terdapat pada media. Media kultur merupakan suatu medium buatan yang digunakan untuk sel atau organ tanaman yang mengandung sumber energi dan garam anorganik yang berfungsi sebagai pendukung pertumbuhan sel yang berada di dalam botol kultur. Jenis media pada kultur jaringan terdiri dari beraneka ragam yang digunakan sesuai kegunaan pada penelitian (Istiqhomah & Mukaromah, 2019).

Ketepatan dalam menentukan komposisi media yang akan digunakan sebagai media tanam merupakan salah satu faktor berhasilnya kegiatan kultur jaringan. Komposisi media terutama kebutuhan zat pengatur tumbuh akan mempengaruhi

pertumbuhan eksplan (Wardatutthoyyibah *et al.*, 2015). Eksplan diletakkan dan dipelihara dalam media padat dalam keadaan steril. Penggunaan media harus sesuai atau cocok pada eksplan yang digunakan agar eksplan dapat berkembang dengan baik dalam pembentukan kalus, tunas dan akar (Karlinda *et al.*, 2013).

Media Murashige dan Skoog (MS) (1962) merupakan media yang digunakan dalam penelitian ini. Media MS adalah media dasar yang paling luas penggunaannya dibanding media dasar lainnya, terutama pada mikropropagasi tanaman dikotil dengan hasil yang menentukan. Kelebihan dari media MS adalah memiliki kandungan nitrat, kalium, dan amonium yang tinggi sehingga sangat baik digunakan untuk pertumbuhan tanaman. Biasanya media MS digunakan sebagai media dasar dikarenakan tidak mengandung zat aditif, seperti zat pengatur tumbuh atau zat organik lainnya.

Media Murashige dan Skoog merupakan perbaikan komposisi media Skoog, terutama kebutuhan garam anorganik yang mendukung pertumbuhan optimum tanaman. Meskipun tanaman gaharu merupakan tanaman pohon, untuk induksi

kalus sendiri digunakan media MS. Hal tersebut dikarenakan penggunaan media kalus untuk induksi kalus lebih cepat terjadi pada media MS. Media MS memiliki kandungan garam-garam yang lebih tinggi daripada media lain, dan kandungan nitrat dalam MS adalah 39,4 mM. kandungan nitrat yang tinggi tersebut berfungsi dalam mendorong diferensiasi sel dan dibantu oleh zat pengatur tumbuh (Saikia, Shrivastava and Sureshkumar Singh, 2012). Media kultur ini umumnya disterilisasi pada suhu 121°C, tekanan 15 psi, selama 20 menit, dan diinkubasi selama kurang lebih 3 hari sebelum digunakan. Berikut merupakan tabel komposisi media MS.

Tabel 2.1 Komposisi Media MS (Murashige & Skoog 1962)

| Bahan/larutan Baku | mg/L |
|--|-------------|
| NH ₄ NO ₃ | 1650 |
| KNO ₃ | 1900 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
| CaCl ₂ .H ₂ O | 440 |
| FeEDTA | |
| a. KI | 27,85 |
| b. Na ₂ EDTA.2H ₂ O | 37,25 |
| <hr/> | |
| Hara mikro | |
| a. KI | 0,83 |
| b. H ₃ BO ₃ | 6,2 |
| c. MnSO ₄ .4H ₂ O | 22,3 |
| d. ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,6 |
| e. Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,25 |
| f. CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,025 |
| g. CoCl ₂ .6H ₂ O | 30000 |
| <hr/> | |
| Sukrosa | 100 |
| <i>Myo-inositol</i> | 100 |
| <i>Nicotinic acid</i> | 0,5 |
| <i>Pyridoxine acid</i> | 0,5 |
| <i>Thiamine HCl</i> | 0,1 |
| <i>Glycine</i> | 2,0 |

6. Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan senyawa yang mempengaruhi proses fisiologi tanaman dan dapat mendorong ataupun menghambat proses fisiologi tanaman. Zat pengatur tumbuh dapat mendukung pertumbuhan tanaman dalam kegiatan pembudidayaan tanaman. Umumnya, ZPT aktif pada konsentrasi yang rendah. Hal tersebut dikarenakan pada konsentrasi rendah zat pengatur tumbuh dapat memacu atau menghambat pertumbuhan atau diferensiasi pada berbagai macam sel-sel tumbuhan dan dapat mengendalikan perkembangan bagian-bagian organ yang berbeda pada tumbuhan. Sedangkan ZPT pada konsentrasi yang tinggi dapat mengakibatkan kematian pada tanaman (Wahidah & Hasrul, 2017).

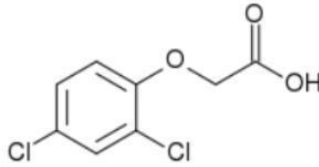
a. *2,4-Dichlorophenoxyacetid acid (2,4-D)*

Pembentukan dan pertumbuhan kalus dapat dipicu dengan pemakaian ZPT 2,4-D dan sering pula dikombinasikan dengan sitokinin. Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin sintetik kuat yang berfungsi memacu pertumbuhan kalus, pemanjangan/pertumbuhan sel, inisiasi akar dan

induksi embriogenesis somatik (Waryastuti, Setyobudi and Wardiyati, 2017).

Pada produksi kultur embriogenik, auksin 2,4-D paling efektif digunakan dibandingkan dengan golongan auksin IAA. Hal tersebut dikarenakan sifat dari 2,4-D yang tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel tanaman ataupun oleh pemanasan pada proses sterilisasi. Pemberian 2,4-D dalam media dapat merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus (Indah, 2013).

Kisaran konsentrasi 2,4-D yang baik digunakan untuk menginduksi kalus adalah antara 0,5-2 mg/L. Hal ini dikarenakan pemberian konsentrasi 2,4-D yang tinggi dapat menyebabkan penghambatan pada pertumbuhan eksplan. Pada proses oksidasi senyawa flavons dan quinons yang terdapat di dalam vakuola berikatan dengan oksigen sehingga menghasilkan *brown polimers* yang menyebabkan pencoklatan pada eksplan. Pemberian 2,4-D yang berlebihan dapat mengubah fungsinya dari ZPT menjadi herbisida (Indah, 2013).



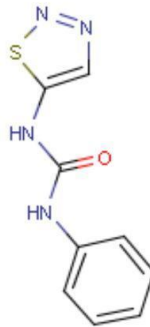
Gambar 2.3 Struktur Kimia 2,4-D (Rasiska *et al.*, 2017)

b. Thidiazuron (TDZ)

Thidiazuron (TDZ) merupakan zat pengatur tumbuh sejenis sitokinin yang dapat memacu pertumbuhan tunas pada kalus. Pemberian sitokinin TDZ juga dapat menginduksi kalus. TDZ merupakan sitokin yang bersifat merangsang multiplikasi pucuk dalam konsentrasi rendah. Pemberian TDZ dengan konsentrasi rendah lebih cepat menginduksi kalus daripada pada konsentrasi yang tinggi. TDZ dapat mendorong multiplikasi pucuk lebih baik dibandingkan dengan IBA (Restanto *et al.*, 2018).

Menurut Hayati *et al.* (2010), rasio auksin dan sitokinin yang seimbang dapat mempengaruhi induksi pembentukan kalus, untuk mendapatkan induksi pembentukan kalus yang optimal

memerlukan kombinasi antara rasio auksin dan sitokinin yang tepat pula.

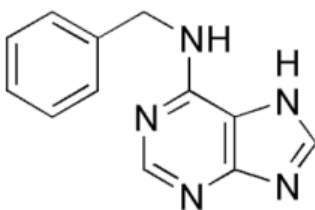


Gambar 2.4 Struktur Kimia TDZ (Windujati, 2011)

c. **6-Benzyl Amino Purine (BAP)**

Zat pengatur tumbuh sangat berpengaruh terhadap keberhasilan perbanyakan kalus. BAP merupakan salah satu ZPT golongan sitokinin yang berperan dalam menstimulasi pematangan sel dan proliferasi kalus (Juliana, Isda, & Iriani, 2019).

Struktur yang terdapat pada BAP sama dengan kinetin, akan tetapi BAP lebih efektif bila dibandingkan dengan kinetin, karena di dalam BAP terdapat gugus *benzil*. berfungsi untuk untuk memacu produksi tunas *in vitro* maupun induksi kalus secara *in vitro*.



Gambar 2.5 Struktur Kimia BAP (Zulkarnain, 2009)

B. Kajian Penelitian Yang Relevan

Dalam kajian pustaka ini, peneliti mencantumkan beberapa penelitian yang dianggap relevan dengan jenis penelitian yang akan dilakukan (Tabel 1.1).

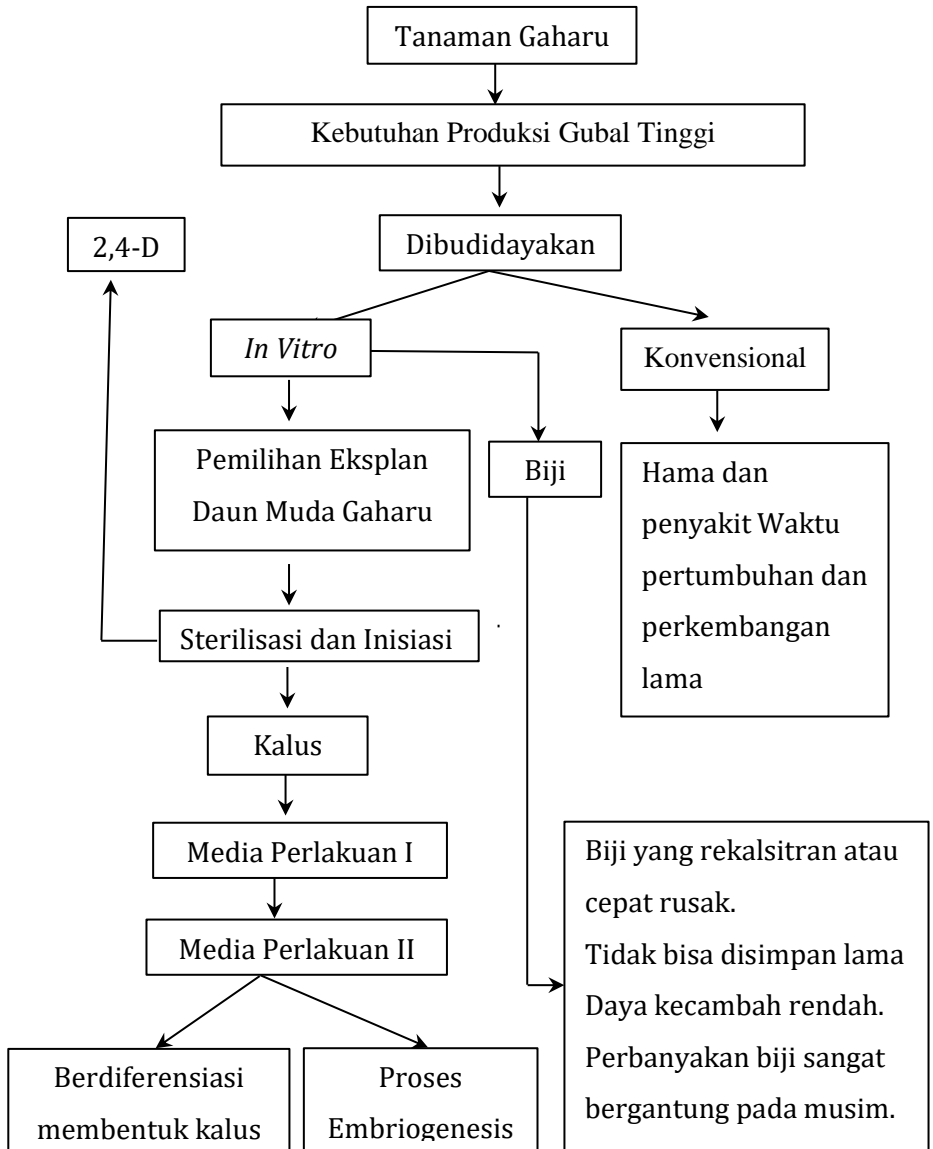
Tabel 2.2 Kajian penelitian yang relevan

| Penelitian | Hasil | Research gap |
|--|---|--|
| <i>An Efficient Protocol for Callus Induction in Aquilaria malaccensis Lam. Using Leaf Explants at Varied Concentrations of Sucrose</i> (Saikia, Shrivastava, & Singh, 2012) | Hasil penelitian menunjukkan media untuk mendapatkan biomassa kalus maksimum. | Belum diketahui diameter, struktur, dan warna kalus. |
| Interaksi antar Biak Suspensi Sel Gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i> Lamk.) dan <i>Fusarium</i> sp. dalam menghasilkan Senyawa Seskuiterpene (Leksonowati, 2016) | Penelitian ini menunjukkan bahwa kalus dapat diinduksi dari semua perlakuan auksin tunggal maupun auksin-sitokinin. | Belum ada pengaplikasian kombinasi pada ZPT auksin dengan sitokinin. |

Tabel 2.2 Lanjutan

| Penelitian | Hasil | Research gap |
|--|---|---|
| <i>Embryogenic Callus Induction of Aquilaira Malaccensis Lamk. and Aquilaria Subintegra Ding Hou</i> (Salam, Awal, & Abdullah., 2019) | Kombinasi 2,4-D dan <i>Benzyl Amino Purine</i> (BAP) dengan media Murashige Skoog (MS) telah berhasil menginduksi kalus dan proses embriogenesis pada tanaman gaharu <i>Aquilaria malaccensis</i> dan <i>Aquilaria subintegra</i> . | Belum ada pengaplikasian kombinasi pada ZPT auksin (2,4-D) dengan sitokinin yang berbeda (TDZ) dengan variasi dan konsentrasi yang berbeda. |
| Induksi Kalus Gaharu dengan NAA dan BAP Secara <i>In Vitro</i> (Wahyuni, Satria, & Zainal, 2020) | Pemberian kombinasi zat pengatur tumbuh NAA dan BAP mempunyai pengaruh terhadap induksi kalus tanaman gaharu. Kalus yang dihasilkan berpeluang dimanfaatkan untuk organogenesis. | Kalus yang dihasilkan baru berpeluang untuk organogenesis belum untuk embriogenesis. |
| <i>Agarwood (Aquilaria malaccensis) diversity conservation by in vitro culture with IAA and yeast extract</i> (Samanhudi <i>et al.</i> , 2022) | Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi IAA dan yeast extract yang tepat untuk pertumbuhan gaharu secara <i>in vitro</i> . | Hanya menggunakan zat pengatur tumbuh auksin saja, belum ada pengkombinasian dengan sitokinin. |

C. Kerangka Berpikir



D. Hipotesis Penelitian

1. H_A: Terdapat pengaruh dalam penambahan berbagai konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap inisiasi daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) secara *in vitro*.

H₀: Tidak terdapat pengaruh dalam penambahan berbagai konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap inisiasi daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) secara *in vitro*.

2. H_A: Terdapat pengaruh dalam penambahan kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan TDZ terhadap induksi kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) secara *in vitro*.

H₀: Tidak terdapat pengaruh dalam penambahan kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan TDZ terhadap induksi kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) secara *in vitro*.

3. H_A: Terdapat pengaruh dalam penambahan kombinasi konsentrasi ZPT BAP dan 2,4-D serta penambahan *casein hydrolysate* 500 mg/L terhadap proses embriogenesis.

H₀: Tidak terdapat pengaruh dalam penambahan kombinasi konsentrasi ZPT BAP dan 2,4-D *casein hydrolysate* 500 mg/L terhadap proses embriogenesis.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Pendekatan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian campuran. Jenis penelitian campuran merupakan penelitian yang menggabungkan antara metode penelitian kualitatif dan kuantitatif. Pendekatan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah pendekatan penelitian eksperimental murni, dikarenakan pada penelitian ini menggunakan pengontrolan variabel, pemberian perlakuan, dan dilakukan adanya pengujian hasil. Metode penelitian ini bersifat validasi atau menguji, yaitu menguji pengaruh satu atau lebih variabel terhadap variabel lain, variabel yang memberi pengaruh dikelompokkan sebagai variabel bebas (*Independent variable*), sedangkan variabel yang dipengaruhi dikelompokkan sebagai variabel terikat (*dependent variable*).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Pusat Riset Rekayasa Genetika, Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan BRIN, mulai pada bulan Oktober 2022 sampai Juli 2023 di Laboratorium Kultur Jaringan Non-GMO Gedung Genomik

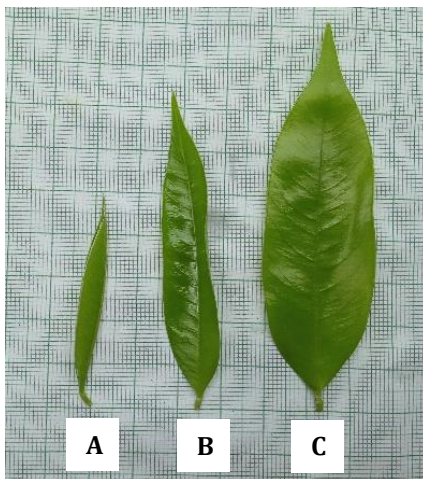
Kawasan Sains dan Teknopark Dr. Ir. Soekarno BRIN Cibinong yang terletak di Jalan Raya Jakarta-Bogor Km. 46, Cibinong, Kecamatan Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

C. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan merupakan alat dan bahan yang umum digunakan di laboratorium kultur jaringan. Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Laminar Air Flow* (LAF), otoklaf, timbangan analitik, pinset, gunting, *magnetic stirrer*, *hot plate*, scalpel, erlenmeyer, gelas ukur 1000 ml, gelas ukur 100 ml, botol kultur besar, botol kultur kecil, bunsen, korek api, petri dish, rak kultur, *hand sprayer*, *pH meter*, mikropipet, alat tulis, dan kamera.

Bahan yang digunakan sebagai eksplan yaitu daun muda gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) yang berada di bagian pucuk tanaman. Daun tersebut terdiri dari tiga jenis, diantaranya daun muda gaharu masih menutup, daun muda yang belum membentang sempurna, dan daun muda yang sudah membentang sempurna. Pemilihan daun tersebut digunakan untuk mengetahui pengaruh perbedaan keadaan umur daun terhadap proses sterilisasi dan inisiasi eksplan dalam membentuk kalus. Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya MS, 2,4-D, TDZ, BAP, *casein hydrolysate* 500 mg/L, sukrosa, agar

(gellex), alkohol 70% dan 96%, akuades, akuades steril, HgCl (0,05%), larutan 15% NaClO (bayclin 15 ml ditambahkan air hingga volumenya 100 ml), sunlight, larutan HCl, larutan NaOH, kertas aluminium foil, spirtus, tisu, dan *plastic wrap*.



Gambar 3.1 Daun muda gaharu *Aquilaria malaccensis* Lamk. A: Daun muda gaharu masih menutup, B: Daun muda gaharu belum membentang sempurna, C: Daun muda gaharu membentang sempurna.

D. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini berupa daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk). Daun gaharu diambil dari bibit gaharu yang berada di *polybag* yang berumur sekitar dua tahun. Bibit tersebut merupakan bibit yang berasal dari Bengkulu. Eksplan yang digunakan pada penelitian ini berupa eksplan daun gaharu yang dipotong persegi tanpa

tulang daun berukuran 1 cm × 1 cm dan dibuang bagian ujung serta pangkal daun. Kriteria daun yang digunakan sebagai eksplan merupakan daun gaharu yang masih muda, sehingga dalam pengambilan eksplan daun tersebut dibedakan menjadi daun muda yang masih menutup, daun muda yang belum membentang sempurna, dan daun muda yang sudah membentang sempurna. Daun muda seringkali digunakan untuk inisiasi pembentukan kalus, hal tersebut dikarenakan daun muda memiliki kemampuan regenerasi yang lebih baik dibandingkan dengan daun dewasa. Selain itu, daun muda juga mengandung hormon tumbuh yang lebih tinggi dibandingkan dengan daun dewasa, sehingga lebih mudah untuk merangsang pertumbuhan kalus (Rahmadi *et al.*, 2021).

E. Parameter Penelitian

Parameter yang akan diamati adalah sebagai berikut.

Tabel 3.1 Parameter Penelitian

| Variabel | Sub Variabel | Parameter | Instrumen Pengukuran |
|-----------------------------------|-------------------------|---|---|
| Pembentukan somatik embriogenesis | Terbentuknya kalus | Waktu munculnya kalus dan persentase eksplan berkalus | Dihitung berapa hari yang dibutuhkan untuk munculnya kalus pada eksplan dan berapa persen eksplan yang dapat berkalus |
| | Diameter kalus | Terjadi proses pertumbuhan kalus | Diameter kalus diukur menggunakan <i>software ImageJ</i> |
| | Tekstur dan warna kalus | Terjadi pembentukan pada tekstur dan warna kalus | Mengamati bagaimana tekstur dan warna kalus yang didapatkan |
| | Berat Kalus | Terjadi penambahan massa kalus | Menimbang kalus dengan menggunakan timbangan analitik |
| | Fase SE | Terjadi proses pembentukan SE | Mengamati terbentuknya fase globular, jantung, torpedo, dan fase kotiledon |

F. Prosedur Kerja

1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi peralatan dapat dilakukan dengan menggunakan autoklaf. Peralatan seperti botol kultur, cawan petri, pinset, scalpel, dan gunting sebelum digunakan harus terlebih dahulu dicuci dengan sabun, dikeringkan, dan dibungkus menggunakan kertas hvs atau koran, setelah itu dimasukkan ke dalam plastik khusus yang tahan terhadap suhu tinggi kecuali botol kultur tidak perlu dibungkus dengan kertas maupun plastik. Setelah peralatan tersebut dibungkus, selanjutnya disterilkan di dalam otoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 17,5 psi selama 15 menit.

2. Pembuatan Media Perlakuan

Media dasar yang akan digunakan dalam melakukan penelitian ini adalah media MS (*Murashige Skoog*) (*Cassion*) sebanyak 4,43 g/L yang ditambah dengan sukrosa 30 g/L, dan agar 3 gr/l. Bahan-bahan tersebut ditambahkan dengan zat pengatur tumbuh auksin 2,4-D (0; 1,0; 2,0; 3,0 ppm) dan TDZ (0; 0,5; 1,0 ppm). Larutan tersebut ditambahkan dengan akuades. Kemudian, larutan diaduk menggunakan pengaduk magnetik (*magnetic stirrer*) hingga menjadi larutan

yang homogen. Setelah itu, digunakan *pH meter* untuk mengukur *pH* larutan hingga mencapai nilai 5,8 dengan menambahkan larutan HCl jika *pH* larutan kurang dari *pH* yang diinginkan atau larutan NaOH jika *pH* larutan lebih dari *pH* yang diinginkan. Kemudian larutan dimasak di atas *hot plate* hingga mendidih. Larutan dimasukkan ke dalam botol kultur berukuran dengan ketebalan masing-masing ± 1 cm/botol, sedangkan untuk yang menggunakan petri, media di tuang dalam petri dengan ketebalan masing-masing $\pm 0,5$ cm/petri di dalam LAF. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 17,5 Psi selama 20 menit.

3. Sterilisasi dan Inisiasi Eksplan

Pada penelitian ini eksplan yang digunakan berasal dari luar laboratorium (di *Lath House*), sehingga perlu dilakukan sterilisasi di luar maupun di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) dikarenakan memiliki tingkat kontaminasi yang relatif besar. Berikut langkah-langkah sterilisasi dan Inisiasi eksplan di luar maupun di dalam LAF.

a. Sterilisasi di luar LAF

Sterilisasi diawali dengan mengambil eksplan daun gaharu yang akan digunakan dengan

menggunting daun yang masih muda dan memasukkannya ke dalam botol berdasarkan jenis daunnya yaitu daun muda yang masih menutup, daun muda yang belum membentang sempurna, dan daun muda yang sudah membentang sempurna. Setelah itu dicuci bersih setiap helai daunnya dengan air dan detergen, kemudian eksplan daun tersebut dibiarkan di air yang mengalir \pm 30 menit.

b. Sterilisasi di dalam LAF

Sterilisasi diawali dengan menyalakan LAF, kemudian dinyalakan sinar UV sesuai *timer* (minimal 30 menit) pada LAF. Setelah UV mati, nyalakan blower dan lampu. Kemudian dimasukkan alat dan bahan yang akan digunakan dan botol yang berisi eksplan dari luar diganti dengan botol yang steril. Selanjutnya, eksplan yang berada di botol steril direndam dengan larutan alkohol 70% selama \pm 1 menit, kemudian ditiriskan dan dibilas dengan akuades yang steril. Kemudian, eksplan direndam dalam larutan NaClO 15% (bayclin 15 ml ditambahkan air hingga volumenya 100 ml). Waktu perendaman untuk daun muda gaharu yang masih menutup selama 5 menit, daun

muda gaharu belum membentang sempurna 10 menit, dan daun muda gaharu membentang sempurna 15 menit sambil dikocok supaya larutan mengenai semua bagian eksplan. Selanjutnya, dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali. Setiap pembilasan dengan akuades dibutuhkan waktu sekitar 1 menit untuk menghilangkan sisa larutan NaClO dari eksplan. Selanjutnya, eksplan direndam dalam larutan HgCl₂ 0,05%. Lama waktu perendaman 3 menit untuk daun muda gaharu masih menutup, 5 menit untuk daun muda gaharu belum membentang sempurna, dan 7 menit untuk daun muda gaharu membentang sempurna dan sambil dikocok secara homogen, kemudian, daun dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali. Selanjutnya botol wadah eksplan diganti dengan botol yang steril. Terakhir, setelah proses sterilisasi selesai kegiatan dilanjutkan dengan proses inisiasi eksplan.

c. Inisiasi

Inisiasi dilakukan di LAF dan diawali dengan diletakkan helaian daun diatas cawan petri steril yang sudah dialasi dengan tisu. Potong ujung pangkal daun dan ujung lainnya dengan pisau

skalpel. Apabila ukuran daun cukup lebar maka tulang daun dihilangkan dengan membuang bagian tulang daun tersebut dan dipotong menjadi bagian-bagian kecil sekitar $5 \times 5 \text{ mm}^2$ hingga $10 \times 10 \text{ mm}^2$. Selanjutnya, permukaan adaksial (permukaan atas) daun disayat atau ditusuk-tusuk dengan skalpel agar nutrisi pada media mudah terserap masuk ke dalam daun. Setelah daun siap, sebanyak 2 sampai 3 daun diletakkan di atas media kultur padat dengan sisi adaksial menghadap ke bawah (daun terbalik). Terakhir, botol media yang berisi eksplan daun diberikan label yang berisi keterangan tanggal inisiasi, nomor botol (ulangan), nama spesies, dan kode jenis daun.

4. Induksi Kalus

Kalus yang telah tumbuh pada inisiasi daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk), selanjutnya diinduksi pada media optimum yang didapatkan pada perlakuan inisiasi sebelumnya. Selanjutnya, kalus diinduksi pada media MS dengan penambahan berbagai kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan TDZ dengan total 12 perlakuan. Penanaman eksplan dilakukan dengan cara diambil kalus pada petri menggunakan pinset, lalu ditanamkan ke dalam media perlakuan induksi kalus.

Hal ini, dilakukan di *Laminar Air Flow* dan dilakukan di dekat api bunsen pada setiap langkahnya untuk mengurangi resiko terjadinya kontaminasi.

Kalus yang telah diinduksi dengan media kombinasi 2,4-D dan TDZ selanjutnya di subkultur dengan media kombinasi BAP dan 2,4-D. Setelah itu, disubkultur dengan media perlakuan embriogenesis (Tabel 3.4).

G. Rancangan Penelitian

1. Induksi Kalus terhadap Waktu Munculnya Kalus dan Persentase Eksplan Berkalus pada Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)

Rancangan penelitian yang digunakan dalam perlakuan inisiasi adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK). Faktor perlakuan dalam penelitian ini faktor jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D. Jenis eksplan yang digunakan yaitu daun muda gaharu masih tertutup, daun muda gaharu belum terbuka sempurna, dan daun muda gaharu sudah terbuka sempurna, sedangkan konsentrasi 2,4-D yang digunakan adalah 0,5 ppm dan 1 ppm (Tabel 3.2).

Tabel 3.2 Jenis eksplan daun gaharu dan konsentrasi ZPT 2,4-D terhadap proses inisiasi

| Jenis Eksplan Daun Gaharu | Konsentrasi 2,4-D (ppm) |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Daun muda masih tertutup | 0,5 1 |
| Daun muda belum terbuka sempurna | 0,5 1 |
| Daun muda terbuka sempurna | 0,5 1 |

Pada Tabel 3.2 menunjukkan bahwa jumlah perlakuan dalam penelitian ini sebanyak 6 perlakuan dan setiap perlakuan akan diulang sebanyak 10 kali, sehingga terdapat 60 satuan percobaan dan setiap satuan percobaan terdiri dari 1 eksplan daun.

2. Induksi Kalus Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) terhadap Diameter, Struktur, Warna, serta Berat Basah dan Kering Kalus

Rancangan penelitian yang digunakan dalam perlakuan induksi kalus adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Faktor dalam perlakuan ini adalah kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan TDZ (Tabel 3.3).

Pada Tabel 3.3 menunjukkan bahwa jumlah perlakuan dalam penelitian ini sebanyak 12 perlakuan, setiap perlakuan akan diulang sebanyak 3 kali, sehingga terdapat 36 satuan percobaan dan setiap satuan percobaan terdiri dari 4 eksplan kalus.

Tabel 3.3 Kombinasi konsentrasi ZPT 2,4-D dan TDZ terhadap induksi kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)

| Kombinasi Konsentrasi ZPT | | TDZ (ppm) | | |
|------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| | | 0 | 0,5 | 1 |
| 2,4-D (ppm) | 0 | D ₀ T ₀ | D ₀ T _{0,5} | D ₀ T ₁ |
| | 1 | D ₁ T ₀ | D ₁ T _{0,5} | D ₁ T ₁ |
| | 2 | D ₂ T ₀ | D ₂ T _{0,5} | D ₂ T ₁ |
| | 3 | D ₃ T ₀ | D ₃ T _{0,5} | D ₃ T ₁ |

Keterangan.

D₀T₀ = 2,4-D (0 ppm) + TDZ (0 ppm)

D₁T₀ = 2,4-D (1,0 ppm) + TDZ (0 ppm)

D₂T₀ = 2,4-D (2,0 ppm) + TDZ (0 ppm)

D₃T₀ = 2,4-D (3,0 ppm) + TDZ (0 ppm)

D₀T_{0,5} = 2,4-D (0 ppm) + TDZ (0,5 ppm)

D₁T_{0,5} = 2,4-D (1,0 ppm) + TDZ (0,5 ppm)

D₂T_{0,5} = 2,4-D (2,0 ppm) + TDZ (0,5 ppm)

D₃T_{0,5} = 2,4-D (3,0 ppm) + TDZ (0,5 ppm)

D₀T₁ = 2,4-D (0 ppm) + TDZ (1,0 ppm)

D₁T₁ = 2,4-D (1,0 ppm) + TDZ (1,0 ppm)

D₂T₁ = 2,4-D (2,0 ppm) + TDZ (1,0 ppm)

D₃T₁ = 2,4-D (3,0 ppm) + TDZ (1,0 ppm)

3. Proses Embriogenesis

Rancangan penelitian yang digunakan dalam perlakuan induksi kalus adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Faktor dalam perlakuan ini adalah kombinasi konsentrasi ZPT BAP dan 2,4-D dan ditambahkan *casein hydrolysate* 500 mg/L (Tabel 3.4).

Tabel 3.4 Kombinasi konsentrasi ZPT BAP dan 2,4-D terhadap proses embriogenesis

| Kombinasi Konsentrasi ZPT | | 2,4-D (ppm) | | |
|------------------------------|-----|-------------|-----|---|
| | | 0,1 | 0,5 | 1 |
| BAP (ppm) | 0,5 | A | B | C |
| | 1 | D | E | F |

Keterangan.

A= 0,5 ppm BAP + 0,1 ppm 2,4-D

B= 0,5 ppm BAP + 0,5 ppm 2,4-D

C= 0,5 ppm BAP + 1 ppm 2,4-D

D= 1 ppm BAP + 0,1 ppm 2,4-D

E= 1 ppm BAP + 0,5 ppm 2,4-D

F= 1 ppm BAP + 1 ppm 2,4-D

Pada Tabel 3.4 menunjukkan bahwa perlakuan dalam penelitian ini sebanyak 6 perlakuan, setiap perlakuan akan diulang sebanyak 3 kali, sehingga terdapat 18 satuan percobaan dan setiap satuan percobaan terdiri dari 9 eksplan kalus.

H. Teknik Analisis Data

1. Induksi Kalus terhadap Waktu Munculnya Kalus dan Persentase Eksplan Berkalus Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)

Metode yang digunakan pada percobaan inisiasi daun adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan dua faktor yaitu jenis eksplan dan variasi konsentrasi 2,4-D pada media perlakuan.

Analisis data yang sudah diperoleh pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan analisis ragam *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh jenis eksplan yang digunakan dan variasi konsentrasi 2,4-D terhadap waktu tumbuhnya kalus dan persentase eksplan berkalus. Jika terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan-perlakuan tersebut, maka analisis akan dilakukan uji lanjutan (*Post hoc*) dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% dengan menggunakan *software* R.

2. Induksi Kalus Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) terhadap Diameter, Struktur, Warna, serta Berat Basah dan Kering Kalus

Data yang diperoleh berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa tekstur dan warna kalus, sedangkan data kuantitatif berupa diameter kalus, berat basah kalus, dan berat kering kalus. Metode yang akan digunakan pada percobaan ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor tunggal yaitu kombinasi variasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ dalam media MS. Penelitian ini menggunakan analisis *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) untuk menganalisis data yang diperoleh,

adakah pengaruh perlakuan terhadap diameter, berat basah kalus, dan berat kering kalus. Jika terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan-perlakuan tersebut, maka analisis akan dilakukan uji lanjutan (*Post hoc*) dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% dengan menggunakan *software* R.

3. Proses Embriogenesis

Data yang diperoleh dalam perlakuan ini adalah data kualitatif deskriptif. Data kualitatif berupa fase dari proses embriogenesis seperti fase globular, jantung, torpedo, dan fase kotiledon.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pengaruh 2,4-D terhadap Waktu Munculnya Kalus dan Persentase Eksplan Berkalus

1. Waktu Munculnya Kalus

Penelitian ini diawali dengan proses sterilisasi eksplan. Eksplan yang digunakan merupakan eksplan daun muda gaharu yang berasal dari bibit dalam polybag di *lath house*. Selanjutnya, daun muda pada bibit tanaman gaharu tersebut dibedakan menjadi 3 jenis daun diantaranya, daun muda masih menutup, daun muda belum membentang sempurna, dan daun muda sudah membentang sempurna, setelah daun tersebut dipisahkan, dilanjutkan dengan proses sterilisasi dan inisiasi. Proses ini, bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis eksplan yang digunakan dan pengaruh 2,4-D terhadap waktu kediniannya munculnya kalus dan persentase eksplan membentuk kalus (Kumianjani, Damanik and Siregar, 2015).

Jenis eksplan yang digunakan adalah daun muda gaharu masih menutup, daun muda gaharu belum membentang sempurna, dan daun muda gaharu membentang sempurna. Konsentrasi 2,4-D yang digunakan adalah 0,5 ppm dan 1 ppm. Adanya jenis

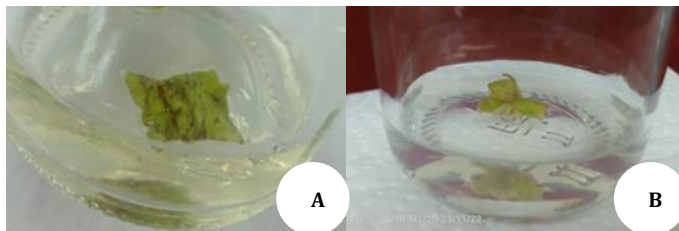
eksplan yang berbeda dan pemberian konsentrasi 2,4-D menunjukkan adanya respons yang bervariasi terhadap waktu munculnya kalus dan persentase eksplan berkalus (Salam, Awal, & Abdullah 2019).

Kedinian munculnya kalus dihitung dari hari setelah tanam (HST). Berdasarkan hasil pengamatan, proses pembentukan kalus diawali dengan proses penggulungan atau pembekakan pada eksplan (Wahyuni, Satria, & Zainal, 2020). Penggulungan atau pembekakan mulai terjadi ketika eksplan berumur 3-5 hari setelah tanam.

Setelah terjadi pembekakan atau penggulungan pada eksplan, kalus mulai terbentuk pada pinggir daun dan permukaan pertulangan daun. Penggulungan atau pembekakan yang terjadi pada eksplan menandakan bahwa eksplan sudah merespons media yang diberikan, dimana eksplan telah menyerap media sebagai nutrisi untuk pertumbuhan kalus (Priyono *et al.*, 2000). Munculnya kalus pada eksplan ditandai juga dengan jaringan berwarna putih bening seperti titik-titik air/lendir pada bekas irisan eksplan dan sayatan di permukaan eksplan yang kemudian berkembang menjadi bulatan-bulatan kecil yang jelas

yang disebut kalus (Waryastuti, Setyobudi and Wardiyati, 2017).

Pembentukan kalus ditandai dengan adanya kumpulan atau massa sel yang tidak beraturan pada bagian eksplan (Juliana, Isda, & Iriani, 2019). Terjadinya pembentukan kalus tersebut disebabkan karena eksplan mempunyai jaringan meristematik dan berinteraksi langsung antara jaringan tanaman dengan ZPT yang terdapat dalam media (Lizawati, 2012).



Gambar 4.1 Eksplan daun gaharu setelah 5 hari ditanam A: Eksplan membesar, B: Eksplan menggulung

Menurut Priyono *et al.* (2020), pembentukan kalus pada eksplan terjadi pada beberapa minggu setelah penanaman. Hal tersebut disebabkan adanya rangsangan luka yang menyebabkan keseimbangan pada dinding sel berubah arah dan sebagian protoplas mengalir ke luar sehingga mulai terbentuk kalus (Waryastuti, Setyobudi and Wardiyati, 2017).

Pemberian 2,4-D pada media memberikan pengaruh interaksi yang nyata terhadap inisiasi kalus (Juliana, Isda and Iriani, 2019).

Tabel 4.1 Uji *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) rata-rata waktu munculnya kalus

| | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------------|----|--------|---------|---------|-------------|
| Replicat ion vector | 9 | 928,2 | 103,13 | 0,543 | 0,835 |
| fact.A | 2 | 2572,0 | 1286,02 | 6,774 | 0,003 ** |
| fact.B | 1 | 25,4 | 25,35 | 0,134 | 0,717 |
| fact.A:fa ct.B | 2 | 126,1 | 63,05 | 0,332 | 0,719 |
| Residua ls | 45 | 8543,4 | 189,85 | | |

Ket. Signif. Codes: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,5 '.' 0,1 ' ' 1

Berdasarkan hasil Uji ANOVA diatas, diketahui bahwa nilai signifikansi pada faktor A atau jenis eksplan yang digunakan sebesar 0,003 kurang dari 0,05. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa jenis eksplan atau jenis daun muda gaharu yang digunakan sangat berpengaruh nyata terhadap rata-rata waktu munculnya kalus, sedangkan nilai signifikansi pada faktor B atau berbagai konsentrasi 2,4-D sebesar 0,717 atau lebih dari 0,05 yang artinya, konsentrasi 0,5 dan 1

ppm 2,4-D tidak memiliki perbedaan yang nyata terhadap waktu munculnya kalus.

Tabel 4.2 Waktu kediniian munculnya kalus pada berbagai konsentrasi 2,4-D dan jenis eksplan

| Jenis Eksplan | Konsentrasi 2,4-D (ppm) | Kediniian Waktu Munculnya kalus (Hari) |
|----------------------------------|-------------------------|--|
| Daun Muda Tertutup | 0,5 | 18,0 a |
| | 1 | 21, 4 ab |
| Daun Muda Belum Terbuka Sempurna | 0,5 | 37,1 a |
| | 1 | 34,3 ab |
| Daun Muda Terbuka Sempurna | 0,5 | 27,0 bc |
| | 1 | 30,3 c |

Ket. Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada Uji Jarak Berganda Duncan taraf 5%

Berdasarkan hasil analisis data Uji Duncan (DMRT) taraf 5%, menunjukkan bahwa perlakuan dengan pemberian 2,4-D 0,5 ppm, mampu membentuk kalus dalam waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan konsentrasi 1 ppm dengan rata-rata waktu munculnya kalus paling cepat yaitu pada hari ke-18 pada eksplan daun muda tertutup.

Berdasarkan penelitian Waryastuti, Setyobudi, & Wardiyati (2017) dan Leksonowati (2016) bahwa zat pengatur tumbuh 2,4-D tunggal dapat menginduksi

terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman. Konsentrasi 2,4-D yang digunakan dalam media berpengaruh terhadap pembentukan kalus pada eksplan, hal tersebut dikarenakan konsentrasi 2,4-D yang digunakan lebih mudah berdifusi ke dalam jaringan tanaman akibat adanya luka irisan sehingga 2,4-D yang ditambahkan akan membantu auksin endogen untuk menstimulasi atau merangsang pembelahan sel terutama sel di sekitar area luka (Waryastuti, Setyobudi, & Wardiyati, 2017).

Penambahan 2,4-D dalam media dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami berupa flavonoid. Selain itu, 2,4-D dapat merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan (Eka Waryastuti, & Setyobudi, 2017). Fungsi lain dari 2,4-D yaitu dapat meningkatkan tekanan osmotik, permeabilitas sel, mengurangi tekanan pada dinding sel, meningkatkan plastisitas dan mengembangkan dinding sel, serta meningkatkan sintesis protein (Widiastoety, 2014). 2,4-D mampu merangsang perbesaran dan sangat baik dalam pembelahan sel untuk membentuk kalus (Kumianjani, Damanik and Siregar, 2015).

Daun merupakan eksplan terbaik yang digunakan untuk induksi kalus. Pertumbuhan kalus yang ditandai dengan pembengkakan eksplan dan diikuti dengan munculnya kalus yang nampak putih di ujung dan tepi eksplan pada tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) (Salam, Awal, & Abdullah, 2019). Keadaan umur daun yang digunakan dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus. Hal tersebut dikarenakan apabila daun yang digunakan dalam inisiasi terlalu tua maka berpengaruh terhadap proses pembelahan (Isnaini, Rahmi and Sujalu, 2014). Pembelahan lambat karena aktivitas metabolisme yang rendah sehingga kebutuhan dari zat pengatur tumbuh perlu ditambahkan untuk memenuhi kebutuhan dari sel tersebut (Samsumaharto *et al.*, 2010).



Gambar 4.2 Kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) A. Media 0,5 ppm 2,4-D, B. Media 1 ppm 2,4-D

2. Persentase Eksplan Berkalus

Persentase eksplan berkalus merupakan salah satu parameter pengamatan yang menunjukkan

kemampuan eksplan dalam membentuk kalus. Pengamatan dilakukan dari hari setelah penanaman eksplan hingga semua eksplan membentuk kalus.

Berdasarkan hasil Uji ANOVA persentase eksplan berkalus menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi zat pengatur tumbuh 0,5 ppm dan 1 ppm 2,4-D menghasilkan respons yang tidak berbeda nyata terhadap persentase eksplan membentuk kalus. Pada Tabel 4.4, diketahui nilai signifikansi berbagai konsentrasi 2,4-D sebesar 0,731 atau lebih dari 0,05, sedangkan nilai signifikansi pada jenis eksplan yang digunakan sebesar 0,001 atau kurang dari 0,05. Artinya, jenis daun muda yang digunakan memiliki perbedaan yang nyata terhadap persentase eksplan berkalus.

Berdasarkan Tabel 4.5 diketahui bahwa adanya pengaruh yang nyata dari pemberian jenis eksplan terhadap persentase eksplan membentuk kalus. Data pengamatan persentase eksplan berkalus pada jenis daun muda belum terbuka sempurna dan daun muda terbuka sempurna mampu membentuk kalus sebesar 100% yang merupakan persentase paling tinggi dalam pembentukan kalus.

Tabel 4.3 Uji *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) rata-rata persentase eksplan berkalus

| | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------------------|----|--------|---------|---------|---------------|
| Replicat ion vector | 5 | 4,053 | 0,811 | 22,109 | 1,927e-08 *** |
| fact.A | 2 | 0,712 | 0,356 | 9,705 | 0,001 *** |
| fact.B | 1 | 0,004 | 0,004 | 0,121 | 0,731 |
| fact.A:fa ct.B | 1 | 0,024 | 0,012 | 0,326 | 0,725 |
| Residua ls | 25 | 0,917 | 0,037 | | |

Ket. Signif. Codes: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,5 '.' 0,1 ' ' 1

Tingginya persentase pembentukan kalus ini menandakan keberhasilan eksplan membentuk kalus. Berdasarkan Tabel 4.4 dapat diketahui juga bahwa jenis eksplan pada daun muda yang masih tertutup menghasilkan pembentukan kalus yang kurang baik yaitu sebesar 50% baik terjadi pada pemberian konsentrasi 2,4-D 0,5 ppm maupun 1 ppm. Hal tersebut, diduga karena sel-sel dan jaringan yang terdapat pada daun muda yang masih tertutup dapat mudah rusak pada saat proses sterilisasi.

Kontaminasi eksplan yang terjadi disebabkan karena kontaminan dari eksplan itu sendiri, organisme

kecil yang masuk ke dalam media, bakteri dan fungi (Waryastuti, Setyobudi, & Wardiyati, 2017).

Tabel 4.4 Rata-rata persentase eksplan berkalus pada jenis eksplan daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)

| Jenis Eksplan | Konsentras i 2,4-D | Rata-rata persentase eksplan berkalus (%) |
|-------------------------------------|-----------------------|---|
| Daun muda tertutup | 0,5 | 50 |
| | 1 | 50 |
| Daun muda belum terbuka sempurna | 0,5 | 100 |
| | 1 | 100 |
| Daun muda terbuka sempurna | 0,5 | 100 |
| | 1 | 100 |

Persentase pembentukan eksplan berkalus yang tinggi menunjukkan adanya respons yang kuat dari eksplan dalam menyerap nutrisi yang terdapat pada media sehingga merangsang perkembangan jaringan untuk membentuk kalus (Wahyuni, Satria and Zainal, 2020). Hal lain juga dapat disebabkan karena jaringan yang terdapat pada daun muda bersifat meristematik yang mempunyai hormon endogen yang aktif membelah dan selanjutnya dikombinasikan dengan hormon eksogen sejenis auksin (2,4-D)

sehingga sel-sel melakukan proliferasi pembentukan kalus (Wahyuni, Satria, & Zainal, 2020)

Berdasarkan Tabel 4.4, menunjukkan bahwa jenis eksplan daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) yang digunakan memberikan pengaruh yang signifikan terhadap persentase eksplan berkalus. Daun muda gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) belum terbuka sempurna dan terbuka sempurna memberikan respons yang terbaik terhadap persentase eksplan berkalus dengan rata-rata eksplan berkalus 100%. Daun gaharu yang terlalu muda ternyata memberikan respons yang kurang bagus. Hal tersebut, dikarenakan sel-sel dan jaringan yang terdapat pada daun yang terlalu muda mudah rusak pada saat sterilisasi, sehingga menyebabkan eksplan mudah *browning*, dan akhirnya mati atau tidak dapat tumbuh kalus (Fadhilah, Noli and Suwirmen, 2015)

Pembentukan kalus dipengaruhi oleh jenis eksplan yang digunakan, komposisi media kultur, dan kandungan hormon auksin endogen (Palei *et al.*, 2017). Keberhasilan eksplan dalam merespon komposisi media juga dipengaruhi oleh kondisi eksplan tersebut. Waryastuti, Setyobudi, & Wardiyati, (2017) menyatakan bahwa musim ketika eksplan diambil,

kualitas tanaman keseluruhan, kondisi aseptik media dan eksplan, ukuran eksplan dan umur fisiologis tanaman mempengaruhi keberhasilan kultur. Keberhasilan untuk menginduksi kalus lebih besar bila jaringan/eksplan yang digunakan bersifat meristematik (aktif membelah) (Waryastuti, Setyobudi, & Wardiyati, 2017).

Pembentukan kalus yang rendah, diduga karena penambahan ZPT yang digunakan pada media sehingga belum berpengaruh terhadap hormon endogen pada eksplan yang belum mampu menginduksi kalus. Pemberian hormon eksogen yang terlalu tinggi akan memperlambat pembentukan kalus. Adanya penambahan auksin dan sitokinin yang tepat, maka eksplan akan diarahkan untuk membentuk kalus (Juliana, Isda, & Iriani, 2019).

B. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi 2,4-D dengan TDZ terhadap Induksi Kalus Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)

Eksplan yang digunakan pada parameter diameter kalus, tekstur kalus, dan warna kalus adalah kalus yang berasal dari media 1 ppm 2,4-D dari daun muda gaharu belum terbuka sempurna.

1. Diameter Kalus

Diameter kalus merupakan salah satu parameter yang digunakan dalam kultur kalus *in-vitro*. Penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan TDZ memberikan pengaruh terhadap pertambahan diameter kalus (Tabel 4.5). Pengukuran diameter kalus dilakukan pada minggu ke-8 setelah eksplan ditanam menggunakan *software* ImageJ. Selanjutnya dilakukan analisis data menggunakan Uji *One Way* ANOVA dan dilanjutkan dengan Uji Duncan (DMRT) taraf 5%.

Tabel 4.5 Uji *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) rata-rata panjang diameter kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) setelah diinduksi selama delapan minggu

| | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|---------------|----|--------|---------|---------|-------------|
| trt | 11 | 0,069 | 0,006 | 2,789 | 0,009 ** |
| Residua ls | 36 | 0,081 | 0,002 | | |

Ket. Signif. Codes: 0 '****' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,5 '.' 0,1 ''

Berdasarkan hasil Uji *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) diatas, diketahui bahwa nilai signifikansi sebesar 0,009 atau kurang dari 0,05 oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa rata-rata diameter kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) pada masing-masing perlakuan memiliki perbedaan

yang nyata. Perbandingan rata-rata diameter kalus pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.6.

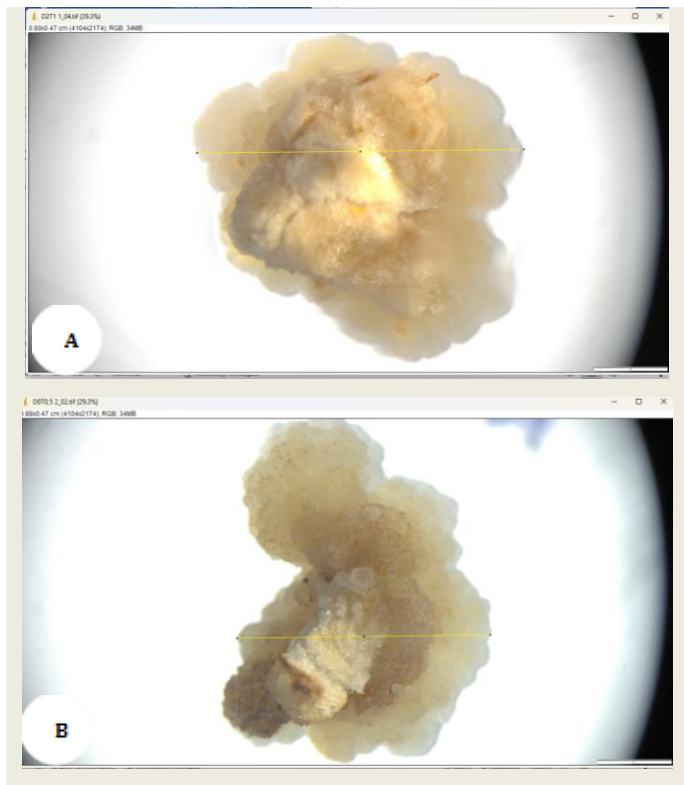
Tabel 4.6 Rata-rata panjang diameter kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) setelah diinduksi selama delapan minggu

| Konsentrasi 2,4-D + TDZ (ppm) | Kode Media | Rata-rata Diameter Kalus |
|-------------------------------------|------------|-----------------------------|
| 0 + 0 | D0T0 | 0,328 ^e |
| 0 + 0,5 | D0T0,5 | 0,359 ^{de} |
| 0 + 1 | D0T1 | 0,383 ^{abcde} |
| 1 + 0 | D1T0 | 0,375 ^{bcde} |
| 1 + 0,5 | D1T0,5 | 0,421 ^{abcd} |
| 1 + 1 | D1T1 | 0,453 ^{ab} |
| 2 + 0 | D2T0 | 0,363 ^{cde} |
| 2 + 0,5 | D2T0,5 | 0,439 ^{abc} |
| 2 + 1 | D2T1 | 0,455 ^a |
| 3 + 0 | D3T0 | 0,382 ^{abcde} |
| 2 + 0 | D3T0,5 | 0,377 ^{abcde} |
| 2 + 0 | D3T1 | 0,397 ^{abcde} |

Ket. Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada Uji Jarak Berganda Duncan taraf 5%

Pada Tabel 4.6, menunjukkan bahwa pemberian kombinasi zat pengatur tumbuh 2 ppm 2,4-D dan 1 ppm TDZ menghasilkan konsentrasi optimal untuk pertumbuhan kalus sehingga diperoleh diameter kalus yang lebih besar dibandingkan dengan pemberian 2,4-D tunggal maupun TDZ tunggal dengan

rata-rata diameter kalus sebesar 0,455 cm. Diameter kalus terkecil diperoleh pada perlakuan tunggal 0,5 ppm TDZ dengan rata-rata diameter kalus 0,358 cm. Konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda memberikan respons yang berbeda terhadap induksi kalus (Khumaida, 2010).



Gambar 4.3 Diameter Kalus, A. media D2T1 (2 ppm 2,4-D dan 1 ppm TDZ) pada minggu ke-8, B, media D0T0,5 (2 ppm 2,4-D dan 1 ppm TDZ) pada minggu ke-8

TDZ merupakan sitokinin yang juga bersifat merangsang multiplikasi pucuk dalam konsentrasi rendah dan dapat menghasilkan tunas kerdil dengan kualitas rendah pada konsentrasi yang tinggi. Thidiazuron juga masuk dalam kelompok ZPT sitokinin sintetik sama seperti BAP (Restanto *et al.*, 2018). TDZ dapat berperan dalam menstimulasi produksi sitokinin endogen dan memiliki peran sebagai inhibitor sitokinin oksidase yang merupakan enzim penghilang keaktifan sitokinin tipe adenin bebas. Oleh karena itu TDZ dapat meningkatkan kerja sitokinin lain, baik sitokinin eksogen ataupun sitokinin endogen (Guo *et al.*, 2011).

Salah satu faktor utama dalam mengontrol diameter kalus adalah pemberian zat pengatur tumbuh dalam media kultur. Kombinasi penggunaan hormon auksin dan sitokinin yang tepat dapat memberikan pengaruh yang baik terhadap pembentukan dan pertumbuhan kalus (Istiningdyah, Tambing, & Bustami, 2013). Menurut Mahadi *et al.* (2016) dalam meningkatkan pertumbuhan kalus, maka perlu dilakukan penambahan hormon pada media kultur.

Zat pengatur tumbuh 2,4-D mampu mendorong pembelahan sel dengan cara mempengaruhi dinding

sel, sehingga dapat mengaktivasi pompa proton yang terletak pada membran plasma. Aktifnya pompa proton tersebut dapat memutuskan ikatan hidrogen diantara serat selulosa dinding sel, putusnya ikatan hidrogen menyebabkan dinding mudah merenggang sehingga tekanan dinding sel akan menurun dan terjadilah pelenturan sel yang akan mengakibatkan tingginya metabolisme nitrogen dalam sel (Kumianjani, Damanik, & Siregar, 2015)

Menurut Rudiyanto, Martin, A. F., ermayanti (2016), penggunaan 2,4-D yang dikombinasikan dengan TDZ memiliki daya aktif yang meningkat sehingga menyebabkan kandungan zat pengatur tumbuh di dalam jaringan meningkat sehingga kalus semakin berkembang. Peningkatan tersebut menyebabkan sel menjadi terus membelah yang akhirnya menyebabkan ukuran kalus bertambah besar.

Penebalan eksplan pada bagian yang terpotong dan pada daerah yang mengalami pelukaan merupakan interaksi eksplan dengan media tumbuh, zat pengatur tumbuh, dan lingkungan tumbuh sehingga diameter eksplan bertambah besar (Rudiyanto, Martin, A. F., ermayanti, 2016). Penambahan 2,4-D pada beberapa

konsentrasi dapat mempengaruhi ukuran kalus yang terbentuk (Kumianjani, Damanik, & Siregar, 2015).

2. Tekstur Kalus

Salah satu indikator pertumbuhan kalus adalah morfologi kalus. Secara visual, morfologi atau struktur kalus dibedakan menjadi dua, yaitu kalus kompak atau kalus berstruktur *non-friable* dan kalus meremah atau kalus berstruktur *friable* (Sudrajad, Suharto, & Rahmawati Wijaya, 2016). Kalus berstruktur kompak merupakan kalus yang tidak mudah dipisahkan dan ikatan antar selnya padat, sedangkan kalus berstruktur meremah merupakan kalus yang mudah pecah bila dipisahkan dikarenakan memiliki ruang antar sel yang besar dan ikatan antar selnya renggang (Wahyuni, Satria, & Zainal, 2020).

Berdasarkan Tabel 4.7 tekstur kalus yang didapatkan pada perlakuan TDZ tunggal semuanya memiliki susunan sel yang kompak, rapat, padat, dan sulit dipisahkan. Pada konsentrasi 2 ppm 2,4-D tunggal tekstur kalus yang diperoleh adalah meremah, sedangkan tekstur kalus pada perlakuan konsentrasi 2,4-D tunggal lainnya adalah kompak. Kalus bertekstur kompak dapat disebabkan adanya hormon auksin endogen yang diproduksi oleh eksplan yang telah

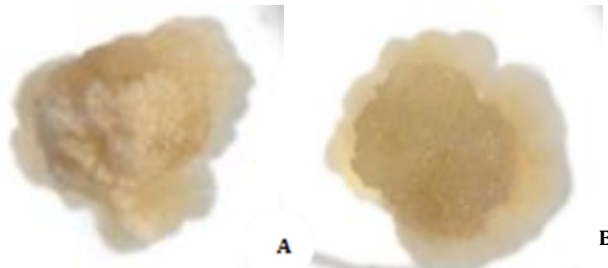
tumbuh membentuk kalus tersebut. Penyebab lainnya karena adanya penurunan aktivitas proliferasi pada sel-sel yang semula membelah (Wahyuni, Satria, & Zainal, 2020).

Tabel 4.7 Tekstur kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) setelah diinduksi selama delapan minggu

| Konsentrasi 2,4-D + TDZ (ppm) | Kode Media | Tekstur Kalus | | Ket. |
|-------------------------------------|---------------|---------------|---------|---------|
| | | Kompak | Meremah | |
| 0 + 0 | D0T0 | + | - | Kompak |
| 0 + 0,5 | D0T0,5 | + | - | Kompak |
| 0 + 1 | D0T1 | + | - | Kompak |
| 1 + 0 | D1T0 | + | - | Kompak |
| 1 + 0,5 | D1T0,5 | - | + | Meremah |
| 1 + 1 | D1T1 | - | + | Meremah |
| 2 + 0 | D2T0 | - | + | Meremah |
| 2 + 0,5 | D2T0,5 | - | + | Meremah |
| 2 + 1 | D2T1 | - | + | Meremah |
| 3 + 0 | D3T0 | + | - | Kompak |
| 2 + 0 | D3T0,5 | + | - | Kompak |
| 2 + 0 | D3T1 | + | - | Kompak |

Sejalan dengan penelitian Yelnititis (2012), diperoleh hasil pertumbuhan pertumbuhan kalus yang diberikan zat pengatur tumbuh 2,4-D tunggal akan menghasilkan kalus yang bertekstur kompak sampai bertekstur remah (*friable*) dan subkultur kalus kedalam media tumbuh yang sama mendorong terbentuknya kalus.

Rata-rata tekstur kalus meremah diperoleh dari kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ, pada perlakuan D1T0,5 (1 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm TDZ), D1T1 (1 ppm 2,4-D dan 1 ppm TDZ), D2T0,5 (2 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm TDZ), serta D2T1 (2 ppm 2,4-D dan 1 ppm TDZ). TDZ merupakan zat pengatur tumbuh sejenis sitokinin yang mampu menginduksi lebih besar dalam proliferasi tunas *in vitro* pada beberapa jenis tanaman. Pemberian TDZ sebagai sitokinin eksogen mampu mencukupi kebutuhan fitohormon yang diperlukan tanaman untuk menginduksi tunas (Restanto *et al.*, 2018).



Gambar 4.4 Tekstur Kalus, A. Kalus Kompak pada media D3T1 (3 ppm 2,4-D dan 1 ppm TDZ) pada minggu ke-8, B.Kalus Meremah pada media D2T0,5 (2 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm TDZ) pada minggu ke-8

Menurut Wahyuni *et al.* (2017) kalus yang bertekstur meremah cocok dimanfaatkan untuk proses embriogenesis, sedangkan kalus bertekstur kompak dapat dikembangkan sebagai peluang untuk

organogenesis. Hal tersebut dikarenakan kalus kompak akan membentuk secara langsung organ tanpa melewati proses embriogenesis. Berdasarkan Lestari (2011), zat pengatur tumbuh dibuat agar tanaman memacu pembentukan fitohormon (hormon tumbuhan) yang sudah ada di dalam tanaman atau menggantikan fungsi dan peran hormon bila tanaman kurang dapat memproduksi hormon dengan baik.

3. Warna Kalus

Salah satu parameter yang digunakan dalam kultur *in vitro* adalah warna kalus. Warna kalus merupakan penampilan visual yang menggambarkan kondisi sel-sel pada kalus masih aktif membelah atau tidak. Tingkat perkembangan kalus yang berbeda-beda dapat dilihat pada warna kalus.

Berdasarkan Tabel 4.8 dapat diketahui bahwa, pada ZPT 2,4-D tunggal pada konsentrasi 2 ppm memberikan warna terbaik dibandingkan dengan konsentrasi 2,4-D tunggal lainnya maupun TDZ tunggal. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Fadhilah, Noli, & Suwirman (2015) semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang diberikan semakin cerah warna kalus yang terbentuk.

Tabel 4.8 Warna kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) setelah diinduksi selama delapan minggu

| Konsentrasi 2,4-D + TDZ (ppm) | Kode Media | Warna Kalus |
|-------------------------------------|------------|----------------------|
| 0 + 0 | D0T0 | Putih kecoklatan |
| 0 + 0,5 | D0T0,5 | Putih kecoklatan |
| 0 + 1 | D0T1 | Putih kecoklatan |
| 1 + 0 | D1T0 | Putih kecoklatan |
| 1 + 0,5 | D1T0,5 | Kuning kecoklatan |
| 1 + 1 | D1T1 | Kuning kecoklatan |
| 2 + 0 | D2T0 | Putih kekuningan |
| 2 + 0,5 | D2T0,5 | Putih kekuningan |
| 2 + 1 | D2T1 | Putih kekuningan |
| 3 + 0 | D3T0 | Putih kecoklatan |
| 2 + 0 | D3T0,5 | Kuning kecoklatan |
| 2 + 0 | D3T1 | Putih kecoklatan |

Umumnya, kalus berwarna hijau pada pengamatan awal berkalus, selanjutnya seiring perkembangan kalus warna kalus mulai berubah warna menjadi putih, kemudian kuning, kuning kecoklatan, hingga coklat (Rasud & Bustaman., 2020). Adanya perubahan warna pada kalus menandakan

bahwa adanya proses degradasi klorofil, sehingga semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofil (Kumianjani, Damanik and Siregar, 2015). Perubahan warna kalus juga menandakan adanya respon pada pemberian kombinasi ZPT 2,4-D dan TDZ (Asmono & Sari, 2016).

Kalus yang berwarna putih merupakan massa atau kumpulan sel yang masih terus aktif membelah dan dapat membentuk kalus yang lebih banyak. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embriogenik yang memiliki kandungan butir pati yang tinggi (Ariati *et al.*, 2012). Pertumbuhan kalus semakin menurun dapat dilihat dari warna kalus yang semakin gelap (menjadi coklat) dan tampak tidak berkembang pertumbuhannya, hal tersebut dikarenakan tidak adanya ZPT sitokinin dalam media, sehingga mempercepat terjadinya proses penuaan (senesen) sel. (Juliana, Isda, & Iriani, 2019).

Kalus yang terbentuk dari suatu eksplan dapat menghasilkan warna yang berbeda-beda. Warna kalus mengalami perkembangan sejak seminggu setelah inokulasi hingga berumur 60 hari setelah inokulasi, kemudian warna pada kalus tersebut berubah sesuai perkembangan kalus pada setiap perlakuan. Pada akhir

pengamatan warna kalus didominasi oleh warna putih kecoklatan (Waryastuti, Setyobudi, & Wardiyati, 2017).

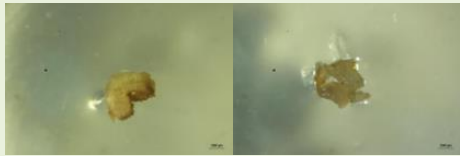
Peningkatan konsentrasi 2,4-D yang diberikan dapat mempengaruhi warna kalus, hal tersebut dikarenakan semakin meningkatnya konsentrasi auksin yang diberikan dalam media warna kalus semakin menguning, dan jika tidak cepat disubkultur akan cepat mencoklat dan akhirnya mati (Wahyuningtyas, Resmisari, & Nashichuddin, 2014). Hal tersebut juga dikarenakan semakin bertambahnya umur kalus dan semakin sedikitnya nutrisi pada media, sehingga sel-sel pada kalus tidak mendapat sumber energi untuk dapat tumbuh (Wahyuni, Satria, & Zainal, 2020).

Pada ZPT TDZ tunggal konsentrasi 0,5 ppm maupun 1 ppm belum menghasilkan warna kalus putih kecoklatan. Menurut Wahyuni, Satria, & Zainal (2020) menyatakan bahwa warna kecoklatan pada kalus mengakibatkan kematian pada jaringan, hal tersebut disebabkan karena adanya metabolisme senyawa fenol yang berlebihan sehingga bersifat toksik pada kalus. Peningkatan pada produksi senyawa fenolat yang diikuti oksidasi oleh aktivitas enzim oksidase dan

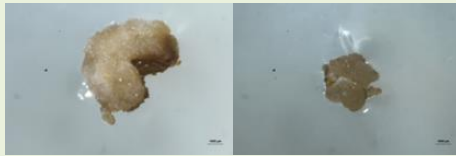
polimerisasi dapat mengakibatkan perubahan warna kalus menjadi coklat (pencoklatan).

Pada perlakuan D2T0,5 (2 ppm 2,4-D dengan 0,5 TDZ) dan D2T1 (2 ppm 2,4-D dengan 1 ppm TDZ) kalus yang dihasilkan berwarna putih kekuningan. Menurut Mahadi *et al.* (2014), pertumbuhan kalus yang baik dapat dilihat dari warna kalus yang berpigmen putih dan kuning. Hal tersebut dikarenakan kalus yang berwarna putih kekuningan mengandung butir pati yang tinggi. Warna putih hingga kekuningan merupakan salah satu ciri kalus yang dapat berkembang menjadi embriogenik. Kalus berwarna kekuningan, putih kekuningan serta putih dan bertekstur *friable* merupakan ciri kalus yang membentuk embrio somatik (Yelnititis, 2012).

Berikut merupakan gambar morfologi dan warna kalus pada kombinasi konsentrasi 2,4-D dan TDZ



Minggu Ke-1



Minggu Ke-2



Minggu Ke-3



Minggu Ke-4



Minggu Ke-5



Minggu Ke-6



Minggu Ke-7



Minggu Ke-8

Gambar 4.5 Morfologi dan warna kalus pada media D0T0 (Dokumen Penelitian, 2023)



Minggu Ke-1



Minggu Ke-2



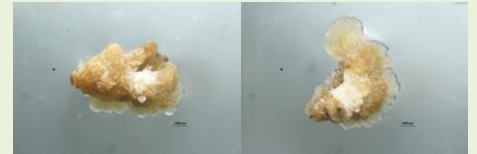
Minggu Ke-3



Minggu Ke-4



Minggu Ke-5



Minggu Ke-6



Minggu Ke-7



Minggu Ke-8

Gambar 4.6 Morfologi dan warna kalus pada media D0T0,5 (Dokumen Penelitian, 2023)



Minggu Ke-1



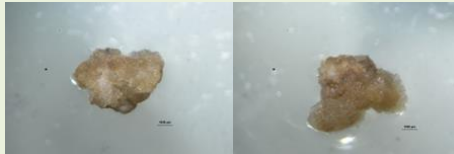
Minggu Ke-2



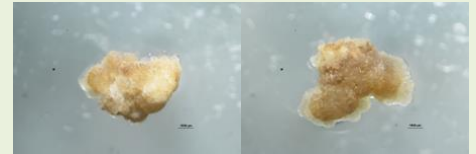
Minggu Ke-3



Minggu Ke-4



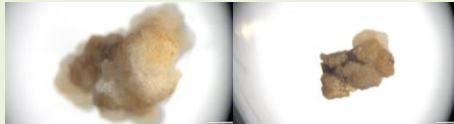
Minggu Ke-5



Minggu Ke-6

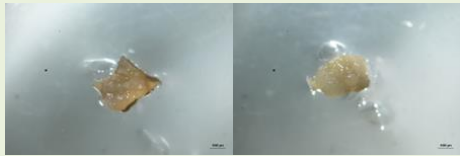


Minggu Ke-7

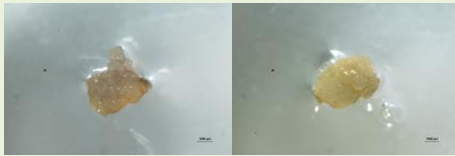


Minggu Ke-8

Gambar 4.7 Morfologi dan warna kalus pada media DOT1 (Dokumen Penelitian, 2023)



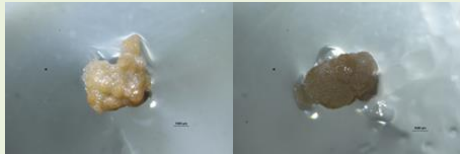
Minggu Ke-1



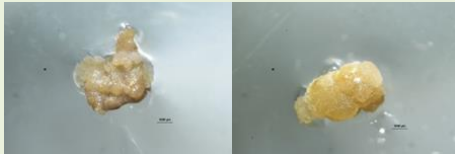
Minggu Ke-2



Minggu Ke-3



Minggu Ke-4



Minggu Ke-5



Minggu Ke-6



Minggu Ke-7

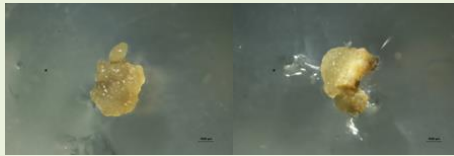


Minggu Ke-8

Gambar 4.8 Morfologi dan warna kalus pada media D1T0 (Dokumen Penelitian, 2023)



Minggu Ke-1



Minggu Ke-2



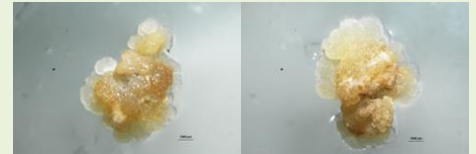
Minggu Ke-3



Minggu Ke-4



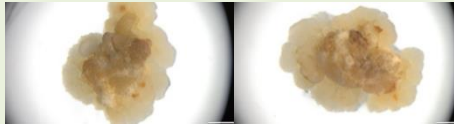
Minggu Ke-5



Minggu Ke-6



Minggu Ke-7

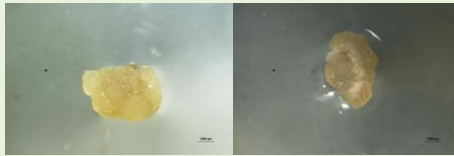


Minggu Ke-8

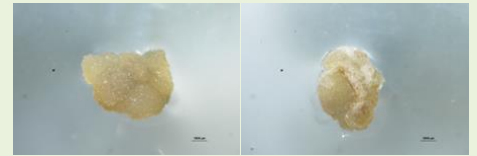
Gambar 4.9 Morfologi dan warna kalus pada media D1T0,5 (Dokumen Penelitian, 2023)



Minggu Ke-1



Minggu Ke-2



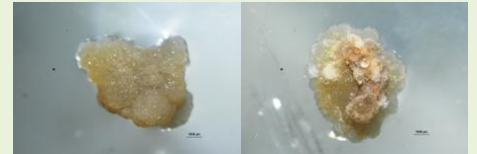
Minggu Ke-3



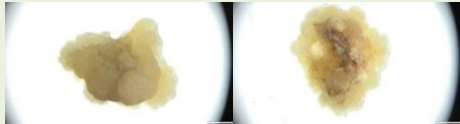
Minggu Ke-4



Minggu Ke-5



Minggu Ke-6



Minggu Ke-7



Minggu Ke-8

Gambar 4.10 Morfologi dan warna kalus pada media D1T1(Dokumen Penelitian, 2023)



Minggu Ke-1



Minggu Ke-2



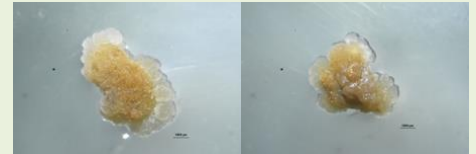
Minggu Ke-3



Minggu Ke-4



Minggu Ke-5



Minggu Ke-6



Minggu Ke-7

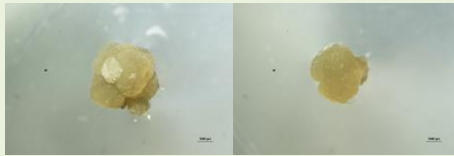


Minggu Ke-8

Gambar 4.11 Morfologi dan warna kalus pada media D2T0 (Dokumen Penelitian, 2023)



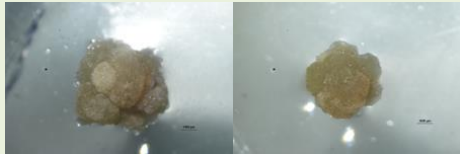
Minggu Ke-1



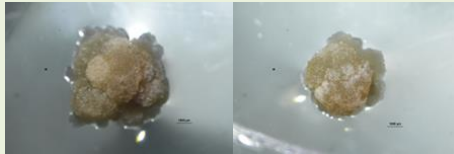
Minggu Ke-2



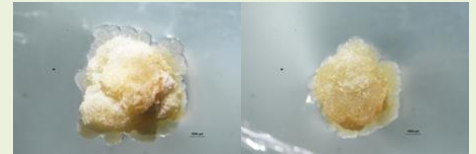
Minggu Ke-3



Minggu Ke-4



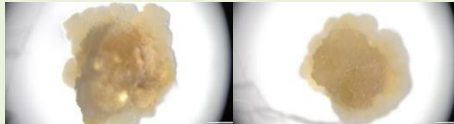
Minggu Ke-5



Minggu Ke-6

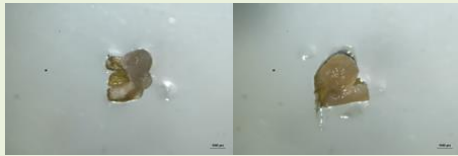


Minggu Ke-7



Minggu Ke-8

Gambar 4.12 Morfologi dan warna kalus pada media D2T0,5 (Dokumen Penelitian, 2023)



Minggu Ke-1



Minggu Ke-2



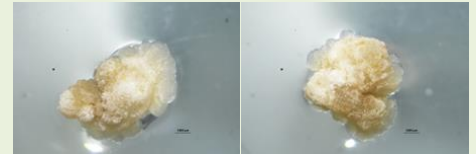
Minggu Ke-3



Minggu Ke-4



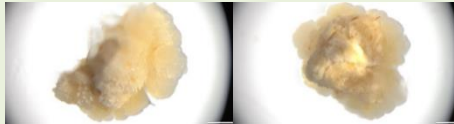
Minggu Ke-5



Minggu Ke-6



Minggu Ke-7



Minggu Ke-8

Gambar 4.13 Morfologi dan warna kalus pada media D2T1 (Dokumen Penelitian, 2023)



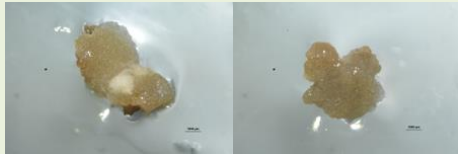
Minggu Ke-1



Minggu Ke-2



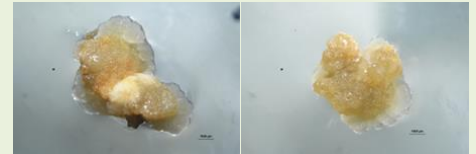
Minggu Ke-3



Minggu Ke-4



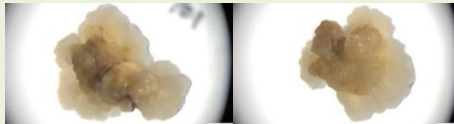
Minggu Ke-5



Minggu Ke-6

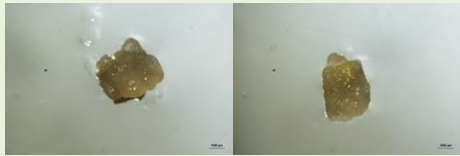


Minggu Ke-7



Minggu Ke-8

Gambar 4.14 Morfologi dan warna kalus pada media D3T0 (Dokumen Penelitian, 2023)



Minggu Ke-1



Minggu Ke-2



Minggu Ke-3



Minggu Ke-4



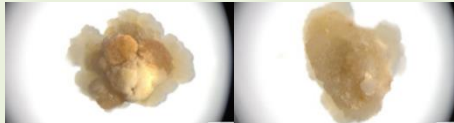
Minggu Ke-5



Minggu Ke-6



Minggu Ke-7



Minggu Ke-8

Gambar 4.15 Morfologi dan warna kalus pada media D3T0,5 (Dokumen Penelitian, 2023)



Minggu Ke-1



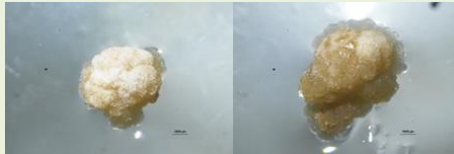
Minggu Ke-2



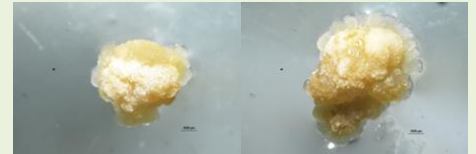
Minggu Ke-3



Minggu Ke-4



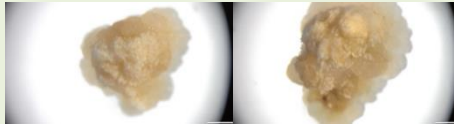
Minggu Ke-5



Minggu Ke-6



Minggu Ke-7



Minggu Ke-8

Gambar 4.16 Morfologi dan warna kalus pada media D3T1 (Dokumen Penelitian, 2023)

4. Berat Basah dan Berat Kering Kalus

Hasil rata-rata berat basah dan berat kering kalus yang telah diberikan perlakuan pada kombinasi berbagai konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan TDZ dapat dilihat pada Tabel 4.12.

Berat basah dan berat kering kalus dalam penelitian ini dihitung pada akhir pengamatan atau pada minggu ke-8 setelah tanam. Penimbangan dilakukan dengan menimbang eksplan pada setiap perlakuan dengan menggunakan timbangan analitik dan hasil perhitungan dinyatakan dalam satuan gram (g). Setelah eksplan ditimbang berat basah, selanjutnya eksplan dikeringkan dengan oven pada suhu 120°C selama ± 1 jam, kemudian eksplan ditimbang kembali untuk mengetahui berat kering eksplan pada setiap perlakuan.

Tabel 4.9 Uji *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) rata-rata berat basah kalus

| | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F) |
|----------|----|--------|---------|---------|--------|
| trt | 11 | 0,061 | 0,005 | 2,467 | 0,020* |
| Residual | 36 | 0,081 | 0,002 | | |

s

Ket. Signif. Codes: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,5 '.' 0,1 ' ' 1

Berdasarkan hasil Uji ANOVA berat basah kalus, dapat diketahui bahwa nilai signifikansi sebesar 0,020 atau kurang dari 0,05, sehingga dapat disimpulkan bahwa rata-rata berat basah kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) memiliki perbedaan yang nyata.

Tabel 4.10 Uji *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) rata-rata berat kering kalus

| | D | Sum Sq | Mean Sq | F | Pr(>F) |
|-----------|---|--------|---------|-------|---------|
| | f | | | value | |
| trt | 1 | 0,0003 | 3,5415e | 2,004 | 0,058 . |
| | 1 | | -05 | | |
| Residuals | 3 | 0,0006 | 1,7674e | | |
| | 6 | | -05 | | |

Ket. Signif. Codes: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,5 '.' 0,1 ' ' 1

Hasil Uji ANOVA berat kering kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) memiliki nilai signifikansi sebesar 0,058 atau lebih dari 0,05. Rata-rata berat kering kalus tidak memberikan perbedaan yang nyata. Perbandingan rata-rata penurunan berat kering kalus pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.12.

Tabel 4.11 Rata-rata berat basah dan berat kering kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) pada umur delapan minggu

| Konsentrasi 2,4-D + TDZ (ppm) | Kode Media | Rata-rata Berat Basah Kalus (gram) | Rata-rata Berat Kering Kalus (gram) |
|-------------------------------------|---------------|---|---|
| 0 + 0 | D0T0 | 0,1118 ^c | 0,0133 ^{ab} |
| 0 + 0,5 | D0T0, 5 | 0,1908 ^{abc} | 0,0193 ^a |
| 0 + 1 | D0T1 | 0,1468 ^{abc} | 0,0160 ^{ab} |
| 1 + 0 | D1T0 | 0,1128 ^c | 0,0125 ^{ab} |
| 1 + 0,5 | D1T0, 5 | 0,2203 ^a | 0,0185 ^a |
| 1 + 1 | D1T1 | 0,1663 ^{abc} | 0,0150 ^{ab} |
| 2 + 0 | D2T0 | 0,1660 ^{abc} | 0,0170 ^{ab} |
| 2 + 0,5 | D2T0, 5 | 0,2008 ^{ab} | 0,0170 ^{ab} |
| 2 + 1 | D2T1 | 0,2200 ^a | 0,0190 ^a |
| 3 + 0 | D3T0 | 0,1648 ^{abc} | 0,0170 ^{ab} |
| 2 + 0 | D3T0, 5 | 0,1398 ^{bc} | 0,0123 ^{ab} |
| 2 + 0 | D3T1 | 0,1383 ^{bc} | 0,0100 ^b |

Ket. Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada Uji Jarak Berganda Duncan taraf 5%

Berdasarkan Tabel 4.11, diketahui bahwa rata-rata berat basah kalus paling tinggi pada perlakuan D1T0,5 (1 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm TDZ) yaitu sebesar 0,2203 gram, akan tetapi, hasil yang ditunjukkan pada perlakuan D1T0,5 (1 ppm 2,4-D dan 0,5 ppm TDZ) tidak berbeda nyata dengan perlakuan D2T1 (2 ppm 2,4-D dan 1 ppm TDZ) yang memiliki berat basah kalus

sebesar 0,22 gram. Hal ini disebabkan karena konsentrasi dan aktivitas 2,4-D yang diberikan mempengaruhi pertumbuhan eksplan. Salah satu mekanisme kerja auksin adalah pemanjangan sel pada koleoptil dan ruas-ruas tanaman. Elongasi sel terutama terjadi pada arah vertikal dan diikuti dengan pembesaran sel dan peningkatan berat basah (Fadhilah, Noli, & Suwirnen, 2015).

Adapun rata-rata berat kering kalus tertinggi pada masing-masing perlakuan diperoleh dari perlakuan D0T0,5 (0 ppm 2,4-D dan 0,5 TDZ) sebesar 0,0193 gram, sedangkan hasil terendah rata-rata berat kering kalus terdapat pada perlakuan D3T1 (3 ppm 2,4-D dan 1 ppm TDZ) sebesar 0,0100 gram.

Peningkatan berat basah kalus menandakan adanya pertumbuhan pada kalus. Berat basah kalus tergantung pada kecepatan selnya dalam pembelahan. Penambahan hormon dalam media berpengaruh terhadap pembelahan sel (Devy, Yulianti, & Hardiyanto, 2016). Pemberian ZPT yang sesuai akan menghasilkan pertumbuhan kalus yang optimal. Metabolisme fenol secara positif mempengaruhi sistem kultur jaringan bersama dengan metabolisme

auksin yang berperan dalam pembesaran sel dan sintesis senyawa lainnya (Hutami, 2008).

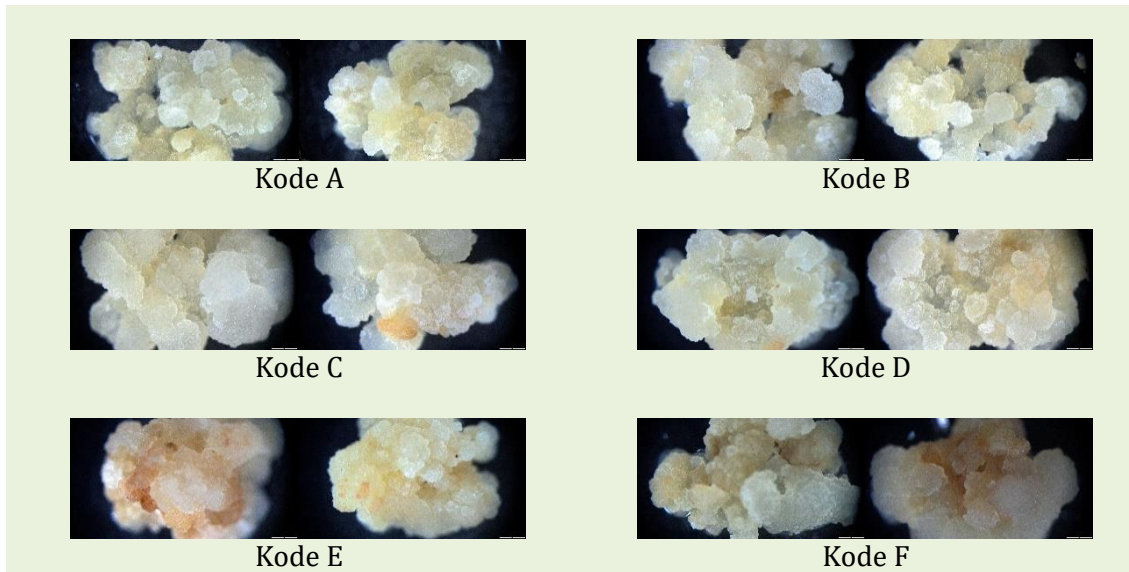
Konsentrasi ZPT 2,4-D dan penggenangan berpengaruh nyata terhadap respon pertumbuhan kalus dan penambahan berat bobot kalus (Kumianjani, Damanik, & Siregar, 2015). 2,4-D berperan terhadap pelonggaran dinding sel dengan melepaskan ikatan hidrogen yang terdapat pada dinding sel. Mekanisme pelonggaran dinding sel dipengaruhi oleh proses pengaktifan gen yang terlibat dalam sintesis protein. Pengontrolan sintesis protein sendiri diatur oleh gen pengatur, gen operator dan gen struktural (Yurmita *et al.*, 2012). 2,4-D yang mampu merangsang perbesaran dan pembelahan sel untuk membentuk kalus (Kumianjani, Damanik, & Siregar, 2015).

Rendahnya berat segar kalus yang terbentuk disebabkan karena eksplan hanya menghasilkan kalus berupa lendir dan berair, belum berkembang serta menyebabkan eksplan browning (Fadhilah, Noli, & Suwirmen, 2015). Eksplan yang mengalami mati fisiologis dan browning mengakibatkan kematian jaringan sehingga tidak mampu memproduksi kalus. Lizawati (2012) mengatakan bahwa peristiwa browning pada kalus disebabkan adanya metabolisme

senyawa fenol yang bersifat toksik dan dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kematian jaringan. Hal tersebut menandakan terjadinya kemunduran fisiologis eksplan dan juga terjadinya senyawa fenol.

C. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi BAP dan 2,4-D Terhadap Somatik Embriogenesis

Somatik embriogenesis atau embrio somatik merupakan embrio yang terbentuk dari jaringan vegetatif/somatik atau dengan kata lain embrio yang terbentuk bukan dari penyatuan sel-sel gamet jantan dan betina. Somatik embriogenesis dapat diawali dengan dua mekanisme yaitu secara langsung pada jaringan eksplan dan secara tidak langsung dari jaringan terorganisir (kalus). Perbanyakan secara tidak langsung menghasilkan tanaman yang sama dengan induknya. Embriogenesis somatik merupakan salah satu metode regenerasi yang mempunyai tahapan perkembangan fase globular, hati, torpedo, dan planlet (Rineksane *et al.*, 2012)



Gambar 4.17 Penampilan kalus yang terbentuk pada penambahan BAP dan 2,4-D serta 500 mg/L *casein hydrolysate* selama 4 minggu. Kode A. (0,5 ppm BAP dan 0,1 ppm 2,4-D), Kode B. (0,5 ppm BAP dan 0,5 ppm 2,4-D), Kode C. (0,5 ppm BAP dan 1 ppm 2,4-D), Kode D. (1 ppm BAP dan 0,1 ppm 2,4-D), Kode E. (1 ppm BAP dan 0,5 ppm 2,4-D), Kode F. (1 ppm BAP dan 1 ppm 2,4-D) (Dokumen Penelitian, 2023)

Pada Gambar 4.17, penambahan 0,5 ppm BAP dan 0,1 ppm 2,4-D, 0,5 ppm BAP dan 0,5 ppm 2,4-D, dan 1 ppm BAP dan 0,5 ppm 2,4-D, serta 1 ppm BAP dan 0,1 ppm 2,4-D ternyata memberikan hasil proliferasi kalus embriogenik yang baik dibandingkan dengan pemberian 0,5 ppm BAP dan 1 ppm 2,4-D serta 1 ppm BAP dan 1 ppm 2,4-D. Hal tersebut membuktikan bahwa pemberian sitokinin (BAP) lebih tinggi dan pemberian auksin (2,4-D) yang lebih rendah sesuai untuk proliferasi kalus dan pemeliharaan kalus embriogenik. Auksin 2,4-D merupakan auksin sintetik kuat yang berfungsi memacu pembentukan kalus, pemanjangan/pertumbuhan sel, inisiasi akar dan induksi embriogenesis somatik (Waryastuti, Setyobudi, & Wardiyati, 2017).

Penambahan 0,5 ppm dan 1 ppm BAP yang dikombinasikan dengan 0,1 ppm, 0,5 ppm, dan 1 ppm 2,4-D serta penambahan 500 mg/L *casein hydrolysate* ternyata belum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pembentukan embriogenesis somatik, akan tetapi mampu menghasilkan kalus yang embriogenik. Hal tersebut dikarenakan kalus yang dihasilkan sudah mulai membentuk bulatan-bulatan yang hampir mendekati fase globular pada tahapan embriogenesis. Hal ini, berbanding terbalik dengan penelitian Elviana *et*

al. (2011) yang menyatakan bahwa penambahan BAP pada media MS dapat menghasilkan fase globular, dan juga berbanding terbalik dengan hasil penelitian (Rineksane *et al.*, 2012) yang menyatakan bahwa penambahan 1 mg/L BAP pada media dapat menghasilkan sel embriogenesis fase jantung. 2,4-D merupakan auksin sintetik kuat yang berfungsi memacu pembentukan kalus, pemanjangan/pertumbuhan sel, inisiasi akar dan induksi embriogenesis somatik (Waryastuti, Setyobudi, & Wardiyati, 2017).

Embriogenesis somatik merupakan salah satu teknik regenerasi tanaman gaharu secara *in vitro*. Keberhasilan kalus embrio somatik dapat dilihat melalui tahapan perkembangan dan pembentukan sel seperti globular, hati, torpedo, dan planlet (Juliana, Isda, & Iriani, 2019). Pada penelitian ini, belum terlihat tahapan-tahapan dari embrio somatik tersebut. Struktur embrio somatik bipolar dicirikan dengan memiliki dua calon meristem, yaitu meristem akar dan meristem tunas (Juliana, Isda, & Iriani, 2019). Embrio somatik berkembang dari sel tunggal selanjutnya mengalami pembelahan sel dan membentuk kelompok sel meristematik (Kumianjani, Damanik, & Siregar, 2015).

BAP merupakan Zat pengatur tumbuh jenis sitokinin yang paling stabil dalam media kultur dibandingkan dengan jenis sitokinin lainnya. *Gugus benzyl* yang terdapat di dalam BAP tidak mudah dirubah oleh enzim yang ada dalam jaringan tanaman (Samudin, 2009). Selain itu, pemberian 2,4-D dapat memberikan pengaruh terhadap induksi kalus dan proliferasi kalus yang dihasilkan dari eksplan daun segar maupun tunas meristem apikal (Ali *et al.*, 2008). Menurut Istiningdyah, Tambing & Bustami (2013) pemberian BAP dan *casein hydrolysate* dalam media berpengaruh terhadap pertumbuhan tunas secara *in vitro*.

Penelitian Rostiana & Syahid (2008) tentang embriogenesis jahe mengungkapkan bahwa induksi kalus embriogenik menggunakan media MS dengan tambahan 2,4-D dan BAP menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D semakin kompak kalus yang terbentuk. Keberhasilan perbanyakan kalus dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh (ZPT). ZPT yang biasanya digunakan untuk meningkatkan pertumbuhan serta perkembangan tanaman adalah golongan auksin atau sitokinin (Jinus, Prihastanti & Haryanti, 2012). Golongan sitokinin yang sering dikombinasikan adalah 6-benzyl amino purine (BAP). BAP berperan dalam menstimulasi

pemotongan sel dan proliferasi kalus (Juliana, Isda, & Iriani, 2019).

Dalam kaitannya dengan pembentukan kalus embriogenik, kalus yang embriogenik dicirikan dengan warna kalus yang putih kekuningan dan mengkilat (Lizawati, 2012). Pertumbuhan kalus embriogenik membutuhkan auksin dengan konsentrasi tinggi dan sitokinin yang rendah. Menurut (Yelnitis & Komar, 2010) kalus embriogenik memiliki struktur *friable* sampai kompak dan berwarna putih kekuningan. Selanjutnya sel embriogenik juga dicirikan oleh bentuknya yang bulat, sitoplasma padat sehingga berwarna lebih gelap dibanding sel non embriogenik, vakuola sangat sedikit, ukuran sel kecil, inti besar, dan dinding sel tipis (Salam, Awal & Abdullah 2019). Beberapa faktor yang mempengaruhi embriogenesis somatik antara lain genotipe, zat pengatur tumbuh, jenis tanaman, media tumbuh maupun senyawa organik (Rineksane *et al.*, 2012).

Embrio somatik dimanfaatkan untuk memperbanyak klon sebagai penghasil individu dengan genetik yang sama, menghilangkan virus, sintesis metabolit, pembuatan benih sintetis, dan regenerasi tanaman dari sel tunggal (protoplas) (Kumianjani,

Damanik & Siregar, 2015). Keberhasilan embrio somatik selain ditentukan oleh ZPT, juga dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah hormon pertumbuhan, genotip eksplan, sumber nitrogen, dan substansi-substansi lain seperti: sukrosa, etanol, dan maltosa (Kumianjani, Damanik & Siregar, 2015).

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini sebagai berikut:

1. Penambahan konsentrasi 0,5 ppm dan 1 ppm 2,4-D pada media berpengaruh tidak signifikan terhadap waktu munculnya kalus dan persentase eksplan berkalus, sedangkan jenis eksplan daun muda gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) memberikan pengaruh yang signifikan terhadap waktu munculnya kalus dan persentase eksplan berkalus.
2. Penambahan kombinasi berbagai konsentrasi 2,4-D dan TDZ pada media memberikan pengaruh yang signifikan terhadap diameter kalus dan berat basah kalus, sedangkan pada berat kering kalus berpengaruh tidak signifikan. Penambahan kombinasi berbagai konsentrasi 2,4-D dan TDZ juga berpengaruh terhadap tekstur dan warna kalus yaitu pada perlakuan D2T0,5 (2 ppm 2,4-D dengan 0,5 TDZ) dan D2T1 (2 ppm 2,4-D dengan 1 ppm TDZ) yang memberikan tekstur meremah dan warna putih kekuningan.
3. Penambahan 0,5 dan 1 ppm BAP yang dikombinasikan dengan 0,1, 0,5, dan 1 ppm 2,4-D serta penambahan

500 mg/L *casein hydrolysate* ternyata belum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pembentukan somatik embriogenesis, akan tetapi mampu menghasilkan kalus yang embriogenik.

B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang induksi kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) dengan menggunakan kombinasi dan konsentrasi zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin lainnya.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui tahapan somatik embriogenesis pada kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk).

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A. *et al.* (2008). Rapid clonal multiplication of sugarcane (*saccharum officinarum*) through callogenesis and organogenesis. *Pakistan Journal of Botany*. 40(1), pp. 123–138.
- Ariati, S.N., Waeniati., M. d & I. S. (2012). Induksi Kalus Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) Pada Media MS Dengan Penambahan 2,4-D, BAP Dan Air Kelapa. *Jurnal Natural Science*. 1(1), pp. 74–84. Available at: [http://jurnal.untad.ac.id/jurnal/index.php/ejurnal/fmi pa/article/view/1022](http://jurnal.untad.ac.id/jurnal/index.php/ejurnal/fmi%20pa/article/view/1022).
- Asmono, S.L. & Sari, V.K. (2016). Induksi Kalus dari Beberapa Kultivar Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Dataran Medium secara *In Vitro* menggunakan Variasi Konsentrasi 2,4-D. *Jurnal Ilmiah Inovasi*. 16(2), pp. 116-121. Available at: <https://doi.org/10.25047/jii.v16i2.295>.
- Devy, N.F., Yulianti, F. & Hardiyanto, H. (2016). Pengaruh Densitas Awal Kalus dalam Perbanyakan Melalui Embriogenesis Somatik terhadap Daya Multiplikasi dan Stabilitas Genetik Planlet Siam Kintamani. *Jurnal Hortikultura*. 22(4), p.309. Available at: <https://doi.org/10.21082/jhort.v22n4.2012.p309->

- Dwiyani, R (2015). *Kultur Jaringan Tanaman*. Denpasar Barat: Pelawa Sari.
- Eka Waryastuti, D. & Setyobudi dan Tatik Wardiyati Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas, L. (2017). Pengaruh Konsentrasi Tingkat Konsentrasi 2,4-D dan BAP Pada Media MS Terhadap Induksi Kalus Embriogenik Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Jurnal Produksi Tanaman*, 5(1), pp. 140–149.
- Elviana, M. *et al.* (2011). Morphological and histological changes during the somatic embryogenesis of mangosteen. *Biologia Plantarum*. 55(4), pp. 731–736. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0177-5>.
- Fadhilah, N.-, Noli, Z.A. & Suwirman, S.- (2015). Induksi kalus *Artemisia vulgaris* L. dengan Pemberian Beberapa Konsentrasi 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid(2,4-D). *Jurnal Biologi Unand*. 4(4), p. 216. Available at: <https://doi.org/10.25077/jbioua.4.4.216-222.2015>.
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF) (2022.). *Classification of Aquilariamalaccensis*. <https://www.gbif.org/occurrence/2242768103> (Diakses pada tanggal 27 April 2019).
- Guo, B. *et al.* (2011). Thidiazuron : A multi-dimensional plant

- growth regulator. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 10(45).
- Gusmalawati, D (2017). *Struktur Anatomi Akar , Batang dan Daun Gaharu (Aquilaria malaccensis Lamk .) yang Mengalami Cekaman Kekeringan'*, 6, pp. 38–44.
- Hapsari, B W *et al.* (2019). Kultur Tunas (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) pada Beberapa Media dengan Penambahan Sitokinin untuk Konservasi *In Vitro*. Prosiding Seminar Nasional Konservasi dan pemanfaatan tumbuhan dan Satwa Liar “Riset Sebagai Fondasi Konservasi dan Pemanfaatan Tumbuhan dan Satwa Liar” 2019.
- Hayati, K., Surya, N. Y., & Setiari, N (2010). Induksi Kalus dari Hipokotil Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Secara *In Vitro* dengan Penambahan Benzyl Amino Purin (BAP) dan a-arau (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) Hasil Rekayasa. *Program Studi Kehutanan, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera*. [156976-ID-none.pdf \(neliti.com\)](https://doi.org/10.24127/156976-ID-none.pdf).
- Hutami, S. (2008). Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*. 4(2), pp. 83–88.
- Indah, Nur Putri, & Ermavitalini, Dini (2013). Induksi Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) Pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal sains dan*

Seni Pomits. 2 (1).

- Isnaini, M., Rahmi, A. & Sujalu, P. (2014). Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Pupuk Daun Terhadap Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Terung (*Solanum melongena* L.) Varietas Mustang F1. *Agrifor*. 8(1), pp. 53–58.
- Istiningdyah, A., Tambing, Y. & Bustami, M.U. (2013). Pengaruh Bap Dan Kasein Hidrolisat Terhadap Pertumbuhan Tunas Melon (*Cucumis Melo* L.) Secara *in Vitro*. *Agrotekbis*. 1(4), pp. 314–322.
- Istiqhomah, S. & Mukaromah, A.S (2019). Pengaruh Kepadatan Medium MS0 terhadap Perkecambahan Biji Jagung (*Zea mays* L., Var. " Lokal ") secara *In Vitro*, 2(2), pp. 68–75. doi:10.21580/ah.v2i2.4664.
- Jinus, J. (Jinus), Prihastanti, E. (Erma), & Haryanti, S. (Sri) (2012). Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) Root-Up Dan Super-GA Terhadap Pertumbuhan Akar Stek Tanaman Jabon (*Anthocephalus Cadamba* Miq). *Jurnal Sains dan Matematika Universitas Diponegoro*. pp. 35–40. Available at: <https://www.neliti.com/publications/140741/>.
- Juliana, T., Isda, M.N., & Iriani, D. (2019). Embriogenesis Somatik dari Kalus Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Asal Bengkalis dengan Pemberian BAP dan Madu secara *In Vitro*. *Al-Kaunyah: Jurnal Biologi*. 12(1), pp.

8-17.Availableat:

<https://doi.org/10.15408/kauniah.v12i1.5667>.

Karlinda, N., R.S. Wulandari, & Y. Mariana. 2013. *Pengaruh NAA dan BAP terhadap Perkembangan Subkultur Gaharu (Aquilaria malaccensis Lamk). Jurnal Hutan Lestari*. Vol. 1, No. 1.

Kharnainor, S & Shiny C T. (2021). A Review of *Aquilaria malaccensis* Propagation and Production of the Secondary Metabolite from Callus. *Grassroots Journal of Natural Resources*. Vol. 4, No. 4.

Kumianjani, E., Damanik, R.I., & Siregar, L.A.M. (2015). Pengaruh Pemberian N 2,4-D Terhadap Pertumbuhan dan Metabolisme Kalus Kedelai Pada Kondisi Hipoksida Secara *In vitro* Study of Application Growth Regulator toward Growth and Metabolism of Soyben Callus at Hypoxyda Condition. 4(1), pp. 1673–1680.

Leksonowati, A. (2016). Interaksi Antara Biak Suspensi Sel Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) dan *Fusarium* sp. dalam Menghasilkan Senyawa Seskuiterpen. *Thesis*. IPB : Bogor.

Lestari, E.G. (2011). Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyakkan Tanaman melalui Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*. 7(1), p. 63. Available at: <https://doi.org/10.21082/jbio.v7n1.2011.p63-68>.

- Lizawati (2012). Calli proliferation and somatic embryogenesis of physic nut (*Jatropha curcas* L.) various combination with PGR's and amino acids. *Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jambi*, 1(4), pp. 256-265. Available at: <https://onlinejournal.unja.ac.id/bioplante/article/view/1726>.
- Mahadi, I., Wulandari, S., & Omar, A. (2014). Pengaruh Naftalen Acetyl Acid (NAA) dan Benzyl Amino Purin (BAP) Terhadap Pertumbuhan Kalus Tanaman Rosella (*Hibiscus sabdriffa*). *Jurnal Biogenesis*. 11(1): 1 - 7.
- Palei, S., Rout, G. R., Das, A. K., & Dash, D. K. (2017). Callus Induction and Indirect and Indirect Regeneration of Strawberry (*Fragria x Ananassa*) Duch. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6
- aluo. (2021). Metode Perbanyak Tanaman Ubi Jalar Ungu (*Ipomea Batatas Poiret*) dengan Teknik Kultur Jaringan atau Stek Planlet. *Jurnal Inovasi Penelitian*, 2(3), pp. 1037-1046.
- Priyono, D., Suhandi, & Matsaleh. (2000). Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh IAA dan 2-IP pada Kultur Jaringan Bakal Buah Pisang. *Jurnal Hortikultura*. 10 (3): 183 - 190.

- Rahmadi, A. *et al.* (2021). Induksi Kalus pada Eksplan Daun Muda Tanaman Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Klon Baru Kamajaya dengan Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D dan Kinetin Secara In Vitro. *Agrikultura*, 31(3),p.222.Availableat:<https://doi.org/10.24198/agrikultura.v31i3.29388>.
- Rasiska, S *et al.* (2017). Pengujian Filter Fisik (*Show Sound Filter*) untuk Menurunkan Kadar Pestisida Golongan Organoklorin. *Jurnal Soilrens*. Vol.15, No. 1.
- Rasud & Bustaman (2020). In Vitro Callus Induction from Clove (*Syzigium aromaticum* L.) Leaves on Medium Containing Various Auxin Concentrations. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25(1), pp. 67–72. Available at: <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>.
- Restanto, D.P. *et al.* (2018). Kajian Thidiazuron (TDZ) dalam Induksi PLB Anggrek *Phalaenopsis* sp secara In Vitro. *Agritrop: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian (Journal of Agricultural Science)*. 16(1), p. 176. Available at: <https://doi.org/10.32528/agr.v16i1.1561>.
- Rineksane *et al.* (2012). In vitro development of embryogenic calli and embryogenic stages in suspension cultures of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(13), pp. 2549–2558. Available at: <https://doi.org/10.5897/jmpr11.197>.

- Rudiyanto, Martin, A. F., ermayanti, T.M. (2016). Perlakuan Konsentrasi 2,4-Dichlorophenoxyaceticacid (2,4-D) dan Thidiazuron (TDZ) terhadap Pembentukan Kalus pada Helai Daun, Tangkai Daun, dan Bonggol *Tacca leontopetaloides*. *Prosiding Nasional Seminar Nasional XXV Kimia dalam Industri dan Lingkungan*, (November), pp. 129–134.
- Rusdianto & Ari I. 2012. *Induksi Kalus Embriogenik pada Wortel (Daucuscarota L) Menggunakan 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid*. *Jurnal Hasil Riset*.
- Rostiana, O., dan S.F. Syahid. 2008. Embriogenesis somatik Jahe dari Eksplan Meristem. *J. Biotrop*. 15 (2): 12-24.
- Saikia, M., Shrivastava, K. & Sureshkumar Singh, S. (2012). An Efficient Protocol for Callus Induction in *Aquilaria malaccensis* Lam. Using Leaf Explants at Varied Concentrations of Sucrose. *International Journal of Plant Research*. 2(6), pp. 188–194. Available at: <https://doi.org/10.5923>.
- Salam, Awal, & Abdullah. (2019). Embryogenic Callus Induction of *Aquilaira*. *International Journal of Engineering and Advanced Technology (IJEAT)* (1), pp. 5746–5751. Available at: <https://doi.org/10.35940/ijeat.A3057.109119>./j.plant.20120206.03.

- Samanhudi *et al.* (2022). Agarwood (*Aquilaria malaccensis*) diversity conservation by in vitro culture with IAA and yeast extract. *Biodiversitas*. 23(5), pp. 2457–2463. Available at: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230525>.
- Samudin, S. (2009). The Effect of Cytokinin and Naphthaleneacetic Acid combination on the Initiation of Apple (*Malus sylvestris* Mill.). *Jurnal Agroland*, 16(3), pp. 193–198.
- Samsumaharto, R.A *et al.* (2010). Identifikasi Minyak Atsiri dalam Kalus Daun Lavender (*Lavandula officinalis* Chaix) dengan Perlakuan Penambahan Zat Pengatur Tumbuh NAA pada Medium MS. *Jurnal Farmasi Indonesia*. Vol. 7. No.1 .
- Science, E. (2020). Characterization of *Aquilaria malaccensis* Callus Cells using SEM and Somatic Embryogenesis Associated Genes Identification Characterization of *Aquilaria malaccensis* Callus Cells using SEM and Somatic Embryogenesis Associated Genes Identification'.doi:10.1088/1755-1315/549/1/012070.
- Sukmadjaja, D *et al.* (2017). Teknik Isolasi dan Kultur Protoplas Tanaman Padi. *Jurnal AgroBiogen*. 3(2):60-65.
- Sudrajad, H., Suharto, D., & Rahmawati Wijaya, N. (2016)

- 'Inisiasi Kalus Sanrego (*Lunasia Amara* Blanco.) dalam Kultur Jaringan. *Proceeding Biology Education Conference*. 13(1), pp. 619–623. Available at: https://simdos.unud.ac.id/uploads/file_pendidikan_1_dir/ddeec13c19c352d21ccca286966a08ec.pdf.
- Sumarna, Y. (2012). Budidaya Jenis Pohon Penghasil Gaharu. *Departemen Kehutanan Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan Pusat Litbang Produktivitas Hutan Bogor*. pp. 1–3.
- Wahidah, B.F. & Hasrul. (2017). Pengaruh Pemberian Zat Pengatur Tumbuh Indole Acetic Acid (IAA) Terhadap Pertumbuhan Tanaman Pisang Sayang (*Musa paradisiaca* L. Var. Sayang) Secara *in Vitro*. *Jurnal Teknosains*, 11(1), pp. 27–41.
- Wahyuni, A., Satria, B., & Zainal, A. (2020). Induksi Kalus Gaharu dengan NAA dan BAP Secara *In Vitro*. *Agrosains: Jurnal Penelitian Agronomi*. 22(1), p. 39. Available at: <https://doi.org/10.20961/agsjpa.v22i1.36007>.
- Wahyuni, D. K., Andriani, P., Ansori, A. N. M., & Utami, E. S. W. (2017). Callus Induction of Gendarussa (*Justicia gendarussa*) by Various Concentration of 2,4-D. IBA and BAP. *Biosaintifika Journal of Biology & Biology Education*. 9(3): 402 – 408.

- Wahyuningtyas, L. (2014). Induksi Kalus Akasia (*Acacia mangium*) dengan Penambahan Kombinasi 2,4-d dan BAP pada Media MS. *Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi*. pp. 1–10. Available at: <http://etheses.uin-malang.ac.id/id/eprint/376>.
- Waryastuti, D.E., Setyobudi, L., & Wardiyati, T. (2017). Pengaruh tingkat konsentrasi 2, 4-D dan Bap pada media MS terhadap induksi kalus embriogenik temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza* Roxb.)'. *Jurnal Produksi Tanaman*, 5(1), pp. 140–149.
- Widiastoety, D. (2014). Pengaruh Auksin dan Sitokinin Terhadap Pertumbuhan Planlet Anggrek Mokara. *J. Hort.*, 24(3): 230-238.
- Winarsih, A *et al.* (2014). *Pengaruh Stressing Terhadap Percepatan Pembentukan Gubal Gaharu Pada Tanaman Gaharu (Aquilaria malaccensis Lamk.)*.
- Windujati, Arya. (2011). *Kajian Penggunaan Zat Pengatur Tumbuh BAP dan TDZ dalam Kultur Jaringan Daun Tanaman Penghasil Gaharu (Aquilaria malaccensis Lamk.)*. Skripsi. Bogor: Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor.
- Wiriadinata, H. *et al.* (2010). Konsep Budidaya Gaharu (*Aquilaria* spp.) di Provinsi Bengkulu. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*. 7(4), pp. 371–380.

Available at: <https://doi.org/10.20886/jphka.2010.7.4.371-380>.

Yelnitis & Komar, tajudin edy (2010). Upaya Induksi Kalus Embriogenik Dari Ptongan Daun Ramin. *Pusat Penelitian dan Pengembangan Konservasi Alam*. pp. 1–14.

Yelnitis, Y. (2012). Pembentukan Kalus Remah dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*. 6(3), pp. 181–194. Available at: <https://doi.org/10.20886/jpth.2012.6.3.181-194>.

Yurmita, N., Asmeliza, & E. Azriati. (2012). Respon Regenerasi Eksplan Kalus Kedelai (*Glycine max* L. Merril) Terhadap Pemberian NAA Secara In Vitro. Universitas Negeri Padang, Padang.

Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Jakarta: Bumi Aksara.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Izin Penelitian



KEMENTERIAN AGAMA REPUBLIK INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO SEMARANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
Alamat: Jl.Prof. Dr. Hamka Km. 1 Semarang Telp. 024 76433366 Semarang 50185
E-mail: fst@walisongo.ac.id Web : <http://fst.walisongo.ac.id>

Nomor : B.6281/Un.10.8/K/SP.01.08/09/2022 Semarang, 15 September 2022
Lamp : Proposal Skripsi
Hal : Permohonan Izin Riset

Kepada Yth.
Kepala Pusat Riset Genetika BRIN
Kawasan Sains dan Teknologi (KST) Cibinong
Bogor, Jawa Barat
di tempat

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Diberitahukan dengan hormat dalam rangka penulisan skripsi Prodi Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo Semarang, bersama ini kami sampaikan saudara :

Nama : Siti Nur Hasanah

NIM : 1908016019

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/ Biologi.

Judul Skripsi : Indikasi Kalus dan Embriogenesis Tanaman Gaharu (*Aquilaria Malaccensis*) secara In Vitro.

Dosen Pembimbing : 1. Baiq Farhatul Wahida, M.Si
2. Betalini Widhi Hapsari, M.Si

Mahasiswa tersebut membutuhkan data-data dengan tema/judul skripsi yang sedang disusun, oleh karena itu kami mohon mahasiswa tersebut meminta ijin melaksanakan riset di Rekeyasa Genetika BRIN Kawasan Sains dan Teknologi (KST) Cibinong, yang akan dilaksanakan tanggal 1 Oktober 2022-30 Maret 2023.

Demikian atas perhatian dan kerjasamanya disampaikan terima kasih.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.



Dekan
Kab. TU

M. Kharis, SH., MH
196910171994031002

Tembusan Yth.

1. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo (sebagai laporan)
2. Arsip

Lampiran 2. Perhitungan dan Pengambilan Larutan Stok Zat Pengatur Tumbuh

1. Larutan stok 100 ppm dalam 100 mL Akuades dengan perhitungan:

Larutan stok 2,4-D, TDZ, dan BAP 100 ppm dalam 100 mL

$$\frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{X}{100 \text{ mL}}$$

$$\frac{1 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} = \frac{X}{100 \text{ mL}}$$

$$x = 10 \text{ mg}$$

(Setelah itu, dilarutkan dengan NaOH \pm 3 tetes.

Kemudian ditera dengan akuades 100 mL)

2. Pengambilan larutan stok 100 ppm untuk 250 mL

- a. Perlakuan pemberian 2,4-D

- a) Konsentrasi 0,1 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 0,1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{0,1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 0,25 \text{ mL}$$

- b) Konsentrasi 0,5 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 0,5 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{0,5 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 1,25 \text{ mL}$$

c) Konsentrasi 1 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 2,5 \text{ mL}$$

d) Konsentrasi 2 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 2 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{2 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 5 \text{ mL}$$

e) Konsentrasi 3 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 3 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{3 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 7,5 \text{ mL}$$

b. Perlakuan pemberian TDZ

a) Konsentrasi 0,5 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 0,5 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{0,5 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 1,25 \text{ mL}$$

b) Konsentrasi 1 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 2,5 \text{ mL}$$

c. Perlakuan pemberian BAP

a) Konsentrasi 0,5 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 0,5 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{0,5 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 1,25 \text{ mL}$$

b) Konsentrasi 1 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \text{ ppm} \times V1 = 1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 2,5 \text{ mL}$$

Lampiran 3. Hasil Uji *Analysis of Variance* (ANOVA)

1. Waktu Munculnya Kalus

```
--  
$waktu_munculnya_kalus  
$waktu_munculnya_kalus[[1]]  
Analysis of Variance Table  
  
Response: dependent.var  


|                   | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F)      |
|-------------------|----|--------|---------|---------|-------------|
| replicationvector | 9  | 928.2  | 103.13  | 0.5432  | 0.834999    |
| fact.A            | 2  | 2572.0 | 1286.02 | 6.7738  | 0.002681 ** |
| fact.B            | 1  | 25.4   | 25.35   | 0.1335  | 0.716517    |
| fact.A:fact.B     | 2  | 126.1  | 63.05   | 0.3321  | 0.719159    |
| Residuals         | 45 | 8543.4 | 189.85  |         |             |

  
---  
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1  
  
$waktu_munculnya_kalus[[2]]  
[1] "R Square 0.299"  
  
$waktu_munculnya_kalus[[3]]  
[1] "SEm of A: 3.081 , SEd of A: 4.357 , SEm of B: 2.516 , SEd of B 3.558 , SEm of AB: 4.357 , SEd of AB: 6.162"  
  
$waktu_munculnya_kalus[[4]]  
  
      Shapiro-Wilk normality test  
  
data:  model$residuals  
W = 0.98133, p-value = 0.4874  
  
$waktu_munculnya_kalus[[5]]  
[1] "Normality assumption is not violated"  
  
$waktu_munculnya_kalus[[6]]  
[1] "The means of one or more levels of first factor are not same, so go for multiple comparison test"
```

2. Persentase Eksplan Berkalus

```
-$Persentase_eksplan_berkalus
$Persentase_eksplan_berkalus[[1]]
Analysis of Variance Table

Response: dependent.var
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
replicationvector  5 4.0533  0.81067  22.1091 1.927e-08 ***
fact.A             2  0.7117  0.35583   9.7045 0.0007601 ***
fact.B             1  0.0044  0.00444   0.1212 0.7306382
fact.A:fact.B      2  0.0239  0.01194   0.3258 0.7249989
Residuals         25  0.9167  0.03667
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

$Persentase_eksplan_berkalus[[2]]
[1] "R Square 0.839"

$Persentase_eksplan_berkalus[[3]]
[1] "SEm of A: 0.055 , SEd of A: 0.078 , SEm of B: 0.045 , SEd of B 0.064 , SEm of AB: 0.078 , SEd of AB: 0.111"

$Persentase_eksplan_berkalus[[4]]
      Shapiro-Wilk normality test

data: model$residuals
W = 0.96321, p-value = 0.2695

$Persentase_eksplan_berkalus[[5]]
[1] "Normality assumption is not violated"

$Persentase_eksplan_berkalus[[6]]
[1] "The means of one or more levels of first factor are not same, so go for multiple comparison test"
```

3. Diameter Kalus

```
|$Diameter_Kalus
|$Diameter_Kalus[[1]]
|$Diameter_Kalus[[1]][[1]]
Analysis of Variance Table

Response: data2
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt    11 0.069187 0.0062897  2.7889 0.009929 **
Residuals 36 0.081190 0.0022553
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

|$Diameter_Kalus[[1]][[2]]
[1] "The treatment means of one or more treatments are not same, so go for multiple comparison test"

|$Diameter_Kalus[[1]][[3]]
[1] "R Square 0.46"

|$Diameter_Kalus[[1]][[4]]

      Shapiro-Wilk normality test

data: model$residuals
W = 0.97236, p-value = 0.3122

|$Diameter_Kalus[[1]][[5]]
[1] "Normality assumption is not violated"

|$Diameter_Kalus[[1]][[6]]
[1] "SEM 0.0237 , SED 0.0336"
```

4. Berat Basah Kalus

```
$Berat_Basah
$Berat_Basah[[1]]
$Berat_Basah[[1]][[1]]
Analysis of Variance Table

Response: data2
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt    11 0.061091 0.0055537  2.4674 0.02032 *
Residuals 36 0.081031 0.0022509
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

$Berat_Basah[[1]][[2]]
[1] "The treatment means of one or more treatments are not same, so go for multiple comparison test"

$Berat_Basah[[1]][[3]]
[1] "R Square 0.43"

$Berat_Basah[[1]][[4]]
      Shapiro-Wilk normality test

data: model$residuals
W = 0.97389, p-value = 0.3562

$Berat_Basah[[1]][[5]]
[1] "Normality assumption is not violated"

$Berat_Basah[[1]][[6]]
[1] "sEm 0.0237 , sEd 0.0335"
```


5. Berat Kering Kalus

```
$Berat._Kering
$Berat._Kering[[1]]
$Berat._Kering[[1]][[1]]
Analysis of Variance Table

Response: data2
      Df      Sum Sq   Mean Sq F value  Pr(>F)
trt    11 0.00038956 3.5415e-05  2.0038 0.05757 .
Residuals 36 0.00063625 1.7674e-05
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

$Berat._Kering[[1]][[2]]
[1] "All the treatment means are same so dont go for any multiple comparison test"

$Berat._Kering[[1]][[3]]
[1] "R Square 0.38"

$Berat._Kering[[1]][[4]]

      Shapiro-Wilk normality test

data: model$residuals
W = 0.9726, p-value = 0.3187

$Berat._Kering[[1]][[5]]
[1] "Normality assumption is not violated"

$Berat._Kering[[1]][[6]]
[1] "SEm 0.0021 , sEd 0.003"
```

Lampiran 4. Hasil Uji *Duncan Multiple Range Test (DMRT)* pada taraf 5%

1. Waktu munculnya kalus

```
$Waktu_munculnya_kalus[[6]]
[1] "The means of one or more levels of first factor are not same, so go for multiple comparison test"

$Waktu_munculnya_kalus[[7]]
$Waktu_munculnya_kalus[[7]][[1]]
  MSerror Df   Mean   CV
  189.8522 45 28.01667 49.18032

$Waktu_munculnya_kalus[[7]][[2]]
  Table CriticalRange
2 2.848372      8.775858
3 2.995440     9.228974
$Waktu_munculnya_kalus[[7]][[3]]
  dependent.var groups
BTS      35.70      a
TS       28.65      a
T        19.70      b

$Waktu_munculnya_kalus[[8]]
[1] "All the second factor level means are same so dont go for any multiple comparison test"
$Waktu_munculnya_kalus[[9]]
$Waktu_munculnya_kalus[[9]][[1]]
  MSerror Df   Mean   CV
  189.8522 45 28.01667 49.18032

$Waktu_munculnya_kalus[[9]][[2]]
  Table CriticalRange
2 2.848372      7.165458
$Waktu_munculnya_kalus[[9]][[3]]
  dependent.var groups
1      28.66667      a
0.5    27.36667      a
```

```

$Waktu_munculnya_kalus[[10]]
[1] "The means of levels of interaction between two factors are same so dont go for any multiple comparison test"

$Waktu_munculnya_kalus[[11]]
$Waktu_munculnya_kalus[[11]][[1]]
  MSerror Df      Mean      CV
189.8522 45 28.01667 49.18032

$Waktu_munculnya_kalus[[11]][[2]]
  Table CriticalRange
2 2.848372      12.41094
3 2.995440      13.05174
4 3.091920      13.47212
5 3.161684      13.77610
6 3.215093      14.00882

$Waktu_munculnya_kalus[[11]][[3]]
  dependent.var groups
BTS:0.5          37.1    a
BTS:1            34.3   ab
TS:1             30.3  abc
TS:0.5           27.0  abc
T:1              21.4   bc
T:0.5            18.0    c

```

2. Diameter Kalus

```
$Diameter_Kalus[[1]][[7]]
$Diameter_Kalus[[1]][[7]][[1]]
      MSerror Df      Mean      CV
      0.002255264 36 0.3941667 12.04811
```

```
$Diameter_Kalus[[1]][[7]][[2]]
```

```
      Table CriticalRange
2  2.868158    0.06810387
3  3.015218    0.07159579
4  3.111132    0.07387324
5  3.180048    0.07550963
6  3.232451    0.07675394
7  3.273806    0.07773590
8  3.307304    0.07853131
9  3.334964    0.07918808
10 3.358137    0.07973832
11 3.377770    0.08020451
12 3.394551    0.08060298
```

```
$Diameter_Kalus[[1]][[7]][[3]]
```

```
      data2 groups
D2T1    0.45450    a
D1T1    0.45250    ab
D2T0.5  0.43850    abc
D1T0.5  0.42125    abcd
D3T1    0.39700    abcde
D0T1    0.38275    abcde
D3T0    0.38200    abcde
D3T0.5  0.37675    abcde
D1T0    0.37475    bcde
D2T0    0.36325    cde
D0T0.5  0.35875    de
D0T0    0.32800    e
```

3. Berat Basah Kalus

```
$Berat_Basah[[1]][[7]]
$Berat_Basah[[1]][[7]][[1]]
      MSerror Df      Mean      CV
0.002250875 36 0.1648333 28.78264
```

```
$Berat_Basah[[1]][[7]][[2]]
      Table CriticalRange
2  2.868158      0.06803757
3  3.015218      0.07152609
4  3.111132      0.07380132
5  3.180048      0.07543612
6  3.232451      0.07667922
7  3.273806      0.07766022
8  3.307304      0.07845486
9  3.334964      0.07911099
10 3.358137      0.07966069
11 3.377770      0.08012643
12 3.394551      0.08052451
```

```
$Berat_Basah[[1]][[7]][[3]]
      data2 groups
D1T0.5 0.22025      a
D2T1   0.22000      a
D2T0.5 0.20075      ab
D0T0.5 0.19075      abc
D1T1   0.16625      abc
D2T0   0.16600      abc
D3T0   0.16475      abc
D0T1   0.14675      abc
D3T0.5 0.13975      bc
D3T1   0.13825      bc
D1T0   0.11275      c
D0T0   0.11175      c
```

4. Berat Kering Kalus

```
$Berat._Kering[[1]][[7]]
$Berat._Kering[[1]][[7]][[1]]
      MSerror Df      Mean      CV
1.767361e-05 36 0.0155625 27.01365
```

```
$Berat._Kering[[1]][[7]][[2]]
      Table CriticalRange
2  2.868158  0.006028867
3  3.015218  0.006337988
4  3.111132  0.006539599
5  3.180048  0.006684460
6  3.232451  0.006794611
7  3.273806  0.006881539
8  3.307304  0.006951952
9  3.334964  0.007010093
10 3.358137  0.007058803
11 3.377770  0.007100072
12 3.394551  0.007135346
```

```
$Berat._Kering[[1]][[7]][[3]]
      data2 groups
D0T0.5 0.01925    a
D2T1   0.01900    a
D1T0.5 0.01850    a
D2T0   0.01700   ab
D2T0.5 0.01700   ab
D3T0   0.01700   ab
D0T1   0.01600   ab
D1T1   0.01500   ab
D0T0   0.01325   ab
D1T0   0.01250   ab
D3T0.5 0.01225   ab
D3T1   0.01000    b
```

Lampiran 5. Gambar Pengambilan Eksplan

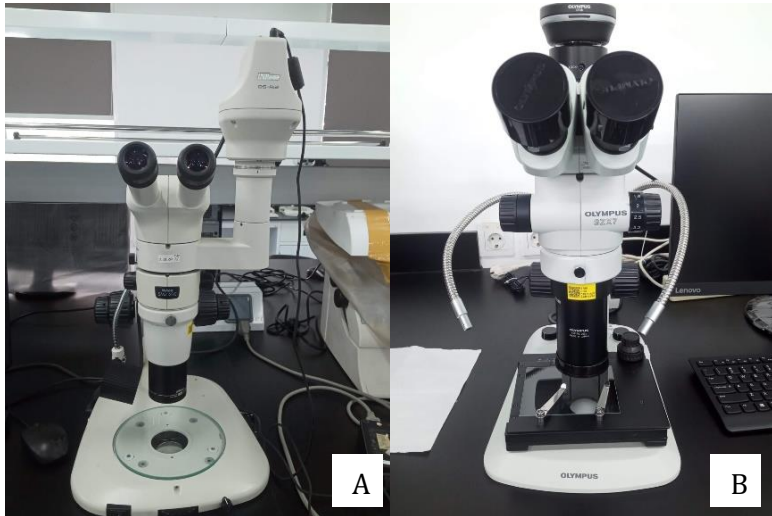


Lampiran 6. Gambar Sterilisasi Eksplan



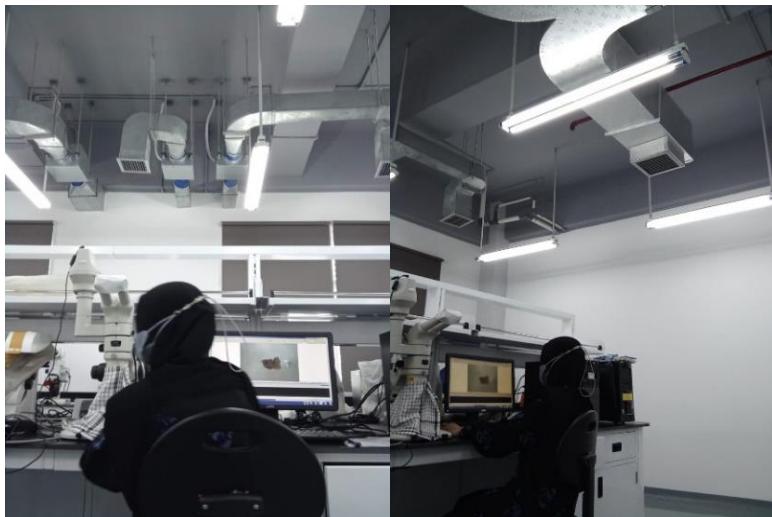
Keterangan. (A) Sterilisasi di luar LAF, (B) Sterilisasi di dalam LAF

Lampiran 7. Gambar Mikroskop



Keterangan: (A) Mikroskop Nikon SMZ 1279, (B) Olympus SZX7 (Dokumen Penelitian, 2023)

Lampiran 8. Gambar Pengamatan di Mikroskop



Lampiran 9. Gambar Penimbangan Kalus



RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

1. Nama Lengkap : Siti Nur Hasanah
2. Tempat dan Tanggal Lahir : Grobogan, 28 April 2001
3. Alamat Rumah : Dusun Jeblogan, RT 07 RW
09, Desa Kenteng , Kec.
Toroh, Kab. Grobogan
4. HP : 088221400372
5. Email : Sinur2728@gmail.com

B. Riwayat Pendidikan

1. Pendidikan Formal
 - a. RA Masyithoh Toroh
 - b. MI Tarbiyatul Athfal Toroh
 - c. MTs Tarbiyatul Athfal Toroh
 - d. MA Shofa Marwa Toroh
2. Pendidikan Non formal
 - a. Taman Pendidikan Al-Qur'an Tarbiyatul Athfal Toroh
 - b. Madrasah Diniyah Awaliyah Tarbiyatul Athfal Toroh
 - c. Pondok Pesantren Fadhlul Fadhlan Semarang