

**INDUKSI DAN PROLIFERASI KALUS KELOR (*Moringa
oleifera* Lam.) HASIL INDUKSI POLIPLOIDI DENGAN
PENAMBAHAN AUKSIN DAN SITOKININ**

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagian Syarat Guna
Memperoleh Gelar Sarjana Sains dalam Ilmu Biologi



Disusun oleh:

Dian Putri Rahmawati

1908016012

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG
2023

PERNYATAAN KEASLIAN NASKAH

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dian Putri Rahmawati

NIM :1908016012

Jurusan : Biologi

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

“INDUKSI DAN PROLIFERASI KALUS KELOR (*Moringa oleifera* Lam.) HASIL INDUKSI POLIPLOIDI DENGAN PENAMBAHAN AUKSIN DAN SITOKININ”

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

Semarang, April 2023

Pembuat Pernyataan,

Dian Putri Rahmawati

NIM: 1908016012



PENGESAHAN

Naskah skripsi berikut ini:

Judul : Induksi dan Proliferasi Kalus Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) Hasil Induksi Poliploidi dengan Penambahan Auksin dan Sitokinin

Penulis : Dian Putri Rahmawati

NIM : 1908016012

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, 10 Januari 2024

DEWAN PENGUJI

Penguji I

Dr. Baiq Farhatul Wahidah
NIP. 197502222009122002

Penguji II

Aryani Leksonowati, M.Si
NIP. 198002212005022002

Penguji III

Chusnul Adib Achmad, M.Si
NIP. 19871231201903190000

Penguji IV

Rafidha Asni Akmalia, M.Sc.
NIP. 198908212019032013

Pembimbing I

Dr. Baiq Farhatul Wahidah
NIP. 197502222009122002

Pembimbing II

Aryani Leksonowati, M.Si
NIP. 198002212005022002

NOTA DINAS

Semarang, 26 Desember 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 DAN PROLIFERASI KALUS KELOR
(*Moringa oleifera* Lam.) HASIL INDUKSI
POLIPLOIDI DENGAN PENAMBAHAN AUKSIN
DAN SITOKININ

Penulis : **Dian Putri Rahmawati**

NIM : 1908016012

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

Semarang, 26 Desember 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 DAN PROLIFERASI KALUS KELOR
(*Moringa oleifera* Lam.) HASIL INDUKSI
POLIPLLOIDI DENGAN PENAMBAHAN AUKSIN
DAN SITOKININ

Penulis : **Dian Putri Rahmawati**

NIM : 1908016012

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,



Aryani Leksonowati, M.Si.

NIP. 198002212005022002

ABSTRAK

Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) memiliki banyak manfaat untuk kesehatan. Pada semua bagian tumbuhan memiliki kandungan anti-oksidan, anti-inflamasi, dan anti-mikroba. Kelor dapat dibudidayakan secara konvensional namun menimbulkan ketidakseragaman pertumbuhan tanaman dan memerlukan waktu yang cukup lama. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi auksin terhadap induksi kalus daun kelor dan pengaruh pemberian perlakuan ZPT terhadap proliferasi kalus kelor hasil induksi poliploid. Eksplan yang digunakan berupa daun kelor tetraploid, mikroploid, dan diploid. Tahapan penelitian meliputi induksi kalus dan proliferasi kalus. Hasil menunjukkan bahwa kalus dapat diinduksi dari semua ploidi (tetraploid, mikroploid, dan diploid) dengan penambahan auksin (2,4D dan Picloram). Kelor mikroploid perlakuan 1 mg/L Picloram menginduksi pembentukan kalus (90,0%) tertinggi diantara yang lainnya, dengan tipe kalus campuran dan warna putih kekuningan. Proliferasi kalus terjadi sangat lambat terutama pada kelor tetraploid namun pada kalus mikroploid hampir semua perlakuan sudah memperlihatkan struktur granula (bulat).

Kata Kunci: *Moringa oleifera* Lam., Kalus, Zat Pengatur Tumbuh dan ploidi.

ABSTRACT

Moringa (Moringa oleifera Lam.) has many health benefits. All parts of the plant contain anti-oxidants, anti-inflammatory and anti-microbial properties. Moringa can be cultivated conventionally but it causes uneven plant growth and requires quite a long time. The aim of this research was to determine the effect of several auxin concentrations on the induction of Moringa leaf callus and the effect of PGR treatment on the proliferation of Moringa callus resulting from polyploidy induction. The explants used were tetraploid, mixoploid and diploid Moringa leaves. The research stages include callus induction and callus proliferation. The results show that callus can be induced from all ploidies (tetraploid, mixoploid, and diploid) by the addition of auxin (2,4D and Picloram). Mixoploid moringa treated with 1 mg/L Picloram induced the highest callus formation (90.0%) among the others, with a mixed callus type and a yellowish white color. Callus proliferation occurs very slowly, especially in tetraploid moringa, but in mixoploid callus almost all treatments show a granular (round) structure.

Keywords: *Moringa oleifera Lam., Callus, Growth Regulator, and ploidy.*

TRANSLITERASI

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
ش	Sy	ا	'
ص	s}	ء	'
ض	d}	ي	Y

Bacaan Madd :

a > = a panjang

i > = i panjang

u > = u panjang

Bacaan Diftong :

au = °ا

ai = °اي

I = °اي

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb.

Alhamdulillahirobbil 'alamiin, puji syukur kepada Allah SWT yang memberikan rahmat syukur dan kasih sayang-Nya kepada saya sehingga saya dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul **“Induksi dan Proliferasi Kalus Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) Hasil Induksi Poliploidi dengan Penambahan Auksin dan Sitokinin”**, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S1). Penyusunan laporan skripsi ini tentu tidak lepas dari bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak Oleh karena itu, saya ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tuaku tercinta, Bapak Rohman dan Ibu Hartini serta keluargaku yang selalu memberikan do'a, semangat dan dukungannya.
2. Dekan dan Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang.
3. Dr. Baiq Farhatul Wahidah, M. Si selaku Ketua Program Studi Biologi dan sebagai pembimbing I dari UIN Walisongo, yang telah memberikan kesempatan bimbingan, bantuan, arahan dan ilmu selama melaksanakan penelitian.

4. Aryani Leksonowati M.Si., selaku pembimbing II dari Pusat Riset Rekayasa Genetika, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) yang telah memberikan kesempatan bimbingan, bantuan, arahan dan ilmu selama melaksanakan penelitian.
5. Dr. Ir Witjaksono M.Sc., selaku Ketua Kelompok Riset Manipulasi Sel Tanaman, Pusat Riset Rekayasa Genetika, BRIN.
6. Sahabat-sahabat tercinta dan teman seperjuangan yang selalu memberikan dukungan dan bantuannya.
7. Seluruh pihak terkait yang telah membantu dalam proses pelaksanaan penelitian dan pembuatan laporan ini, terutama kepada para peneliti (Ibu April, Ibu Indira, Ibu Tri, dan Ibu Ressa) dan teknisi (Ibu Yuli, Ibu Omi, dan Mang Dian) yang berada di Laboratorium Biak Sel dan Jaringan Tanaman, Kawasan Sains dan Teknologi (KST) Soekarno, BRIN.

Saya menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan laporan ini, sehingga saya berharap saran dan kritik yang bersifat membangun, agar lebih baik kedepannya semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Semarang, 26 Agustus 2022

Dian Putri Rahmawati

DAFTAR ISI

PERNYATAAN KEASLIAN NASKAH	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
NOTA DINAS	iv
NOTA DINAS	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT	vii
TRANSLITERASI.....	viii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I : PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian	6
BAB II : LANDASAN PUSTAKA.....	7
A. Kajian Teori	7
1. Kelor	7
2. Kultur Jaringan	14
3. Kalus	16
4. Zat Pengatur Tumbuh.....	18

B. Kajian Penelitian yang Relevan.....	21
C. Kerangka Berpikir	25
D. Hipotesis.....	25
BAB III : METODE PENELITIAN	27
A. Waktu dan Tempat Penelitian	27
B. Rancangan Penelitian.....	27
C. Populasi dan Sampel	29
D. Alat dan Bahan.....	29
E. Prosedur Penelitian	31
F. Parameter Penelitian.....	35
G. Metode Analisis Data.....	39
BAB IV : HASIL DAN PEMBAHASAN	40
A. Hasil Penelitian.....	40
1. Induksi Kalus.....	40
2. Proliferasi Kalus.....	47
B. Pembahasan.....	58
1. Induksi Kalus.....	58
2. Proliferasi Kalus.....	62
BAB V : PENUTUP.....	68
A. Kesimpulan	68
B. Saran	69
DAFTAR PUSTAKA.....	70
LAMPIRAN	79
RIWAYAT HIDUP	94

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Kandungan nutrisi daun kelor per 100g	11
Tabel 2. 2. Kandungan nutrisi bunga, buah, dan biji kelor per 100 g	12
Tabel 2.3 Kajian Penelitian yang Relevan Tentang Induksi kalus	21
Tabel 2. 4 Kajian Penelitian yang Relevan Tentang Induksi kalus dan Perbanyakkan Tanaman Kelor	22
Tabel 3.1 Perlakuan untuk Induksi Kalus Tanaman Kelor	28
Tabel 4.1 Pengaruh auksin 2,4D dan Picloram terhadap persentase bebas kontaminasi, survival, waktu kemunculan kalus dari eksplan daun kelor diploid, miksoploid, dan tetraploid	45
Tabel 4.2 Pengaruh auksin 2,4D dan Picloram terhadap persentase kalus yang terbentuk dan penutupan kalus dari eksplan daun kelor diploid, miksoploid, dan tetraploid umur 8-12 minggu	46
Tabel 4.3. Pengaruh kombinasi auksin dan sitokinin terhadap morfologi sel pada kalus kelor tetraploid umur 3 minggu setelah subkultur	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1 Grafik analisis aliran sitometri tanaman kelor diploid tetraploid dan miksploid	3
Gambar 2.1 Morfologi Kelor	9
Gambar 3.1 Kelor diploid, miksploid dan tetraploid	30
Gambar 4.1 Proses Pembentukan kalus dari daun kelor	41
Gambar 4.2 Kalus kelor tetraploid dan miksploid umur 3 minggu setelah subkultur pada perlakuan kombinasi auksin-sitokinin	47
Gambar 4.3 Grafik Pengaruh kombinasi auksin dan sitokinin terhadap warna kalus kelor tetraploid dan miksploid umur 3 minggu setelah subkultur	49
Gambar 4.4 Kategori warna kalus kelor tetraploid umur 3 minggu setelah subkultur pada perlakuan kombinasi auksin-sitokinin	50
Gambar 4.5 Kategori warna kalus kelor miksploid umur 3 minggu setelah subkultur pada perlakuan kombinasi auksin-sitokinin	50
Gambar 4.6 Morfologi sel kalus kelor tetraploid dan miksploid yang terbentuk diamati dengan mikroskop	52
Gambar 4.7 Bobot basah dan bobot kering kalus tetraploid dan miksploid	55

- Gambar 4.8 morfologi kalus secara mikroskopi dengan kalus tetraploid dan miksoploid 56
- Gambar 4.9 pengamatan kalus menggunakan pewarnaan acetocarmin dibawah mikroskop dengan kalus miksoploid dan tetraploid 57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perbandingan Komposisi Media dasar MS (Murashige Skoog, 1962) dan Media 60MS 3:1	79
Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian	80
Lampiran 3. Hasil analisis statistik kelor miksploid	82
Lampiran 4. Hasil analisis statistik kelor tetraploid	88

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

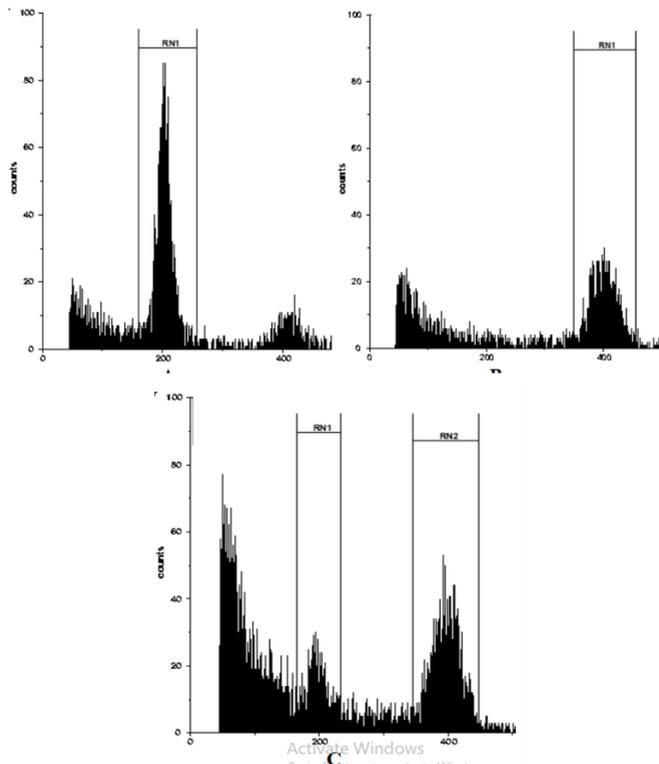
Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) merupakan salah satu jenis tanaman tropis, namun dapat juga tumbuh di daerah subtropis. Kelor memiliki banyak manfaat untuk kesehatan melebihi tanaman lainnya, sehingga dikenal sebagai *The Miracle Tree* atau pohon ajaib (Marhaeni, 2021). Hampir semua bagian dari tumbuhan kelor dapat dimanfaatkan. Baik akar, biji, buah, dan daun kelor memiliki kandungan anti-oksidan, anti-inflamasi, dan anti-mikroba (Munira *et al.*, 2021).

Tumbuhan kelor mudah untuk dibudidayakan baik secara stek maupun biji (Nurhabibah dan Harahap, 2022). Namun kebanyakan menggunakan biji menimbulkan ketidakseragaman pertumbuhan tanaman yang dihasilkan. Sedangkan, kebanyakan dengan metode stek menghasilkan tanaman yang terjamin keseragaman sifatnya, akan tetapi untuk menghasilkan bibit dengan jumlah yang banyak memerlukan waktu yang cukup lama. Teknik kultur jaringan dapat dijadikan alternatif karena dapat menghasilkan tanaman dalam jumlah yang banyak dengan waktu yang singkat, serta bebas penyakit (Dewi, S. dan Dyah, 2010).

Terdapat beberapa teknik kultur jaringan diantaranya yaitu keragaman somaklonal, fusi protoplas, seleksi *in vitro* dan transformasi genetik, dimana langkah awal dari semua kegiatan tersebut adalah menginduksi kalus yang bersifat embrionik. Induksi kalus dilakukan dengan cara memacu pembelahan sel secara terus menerus dari bagian tanaman seperti daun, akar, batang, dan sebagainya, dengan menggunakan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) hingga terbentuk massa sel. Massa sel (kalus) tersebut selanjutnya akan beregenerasi melalui organogenesis ataupun embriogenesis hingga menjadi tanaman lengkap (Bustami, 2011).

Kelor umumnya diploid memiliki kromosom sebanyak 28 kromosom (Silalahi, 2020). Penelitian Ridwan dan Witjaksono (2020), melalui induksi poliploidi, Kecambah dari biji kelor yang berasal dari kebun di kawasan KST Soekarno Cibinong BRIN direndam dengan larutan oryzalin 15 μM dan 60 μM selama satu hari menghasilkan kelor dengan ploidi tetraploid dan mikroploid. Berdasarkan analisis aliran sitometri kelor diploid memiliki DNA relative puncak dengan nilai 200, dan pada kelor tertraploid dengan nilai 400, sedangkan pada mikroploid ditemukan dua nilai puncak yaitu 200 dan 400 yang muncul secara bersamaan (Gambar 1.1).

Pada Kelor tetraploid memiliki ciri khas yang membedakan dengan kelor diploid yaitu ukuran daun dan ukuran stomata kelor tetraploid lebih besar namun kerapatan stomata lebih rendah dibandingkan dengan diploid, Kelor tetraploid juga menunjukkan peningkatan kadar protein lemak, dan kalsium, namun diimbangi dengan penurunan kadar karbohidrat.



Gambar 1.1 Grafik analisis aliran sitometri tanaman kelor diploid (A), tetraploid (B), Miksoploid (C) (sumber: Ridwan dan Witjaksono 2020)

Keberhasilan kultur jaringan tanaman dipengaruhi beberapa faktor diantaranya yaitu media tumbuh, dan faktor lingkungan, seperti zat pengatur tumbuh (ZPT) (Dewi, S. dan Dyah, 2010). Handayani *et al.*, (2021) telah melakukan kultur kelor menggunakan media MS. Media MS dimodifikasi dengan variasi total konsentrasi nitrogen dan nisbah nitrat/ ammonium. Hasil penelitiannya menyatakan bahwa pertumbuhan dan biomassa dengan media modifikasi MS dengan total konsentrasi Nitrogen 40-60 mM dengan nisbah NO_3^- : NH_4^+ 3:1 lebih baik dibanding media MS standar dengan nisbah NO_3^- : NH_4^+ 2:1.

ZPT merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan karena keberadaannya mempengaruhi pertumbuhan dan morfologis dalam sel, jaringan dan kultur organ (Bakar *et al.*, 2016). ZPT mempengaruhi pembentukan kalus pada eksplan. ZPT golongan auksin dan sitokinin dibutuhkan untuk merangsang pembelahan sel dan pembentukan kalus. Auksin memiliki peranan dalam pertumbuhan sel, dominasi apikal dan pembentukan kalus. Sedangkan, sitokinin berperan dalam mengatur pembelahan sel serta mempengaruhi diferensiasi tunas pada jaringan kalus (Manurung *et al.*, 2018). ZPT golongan auksin yang sering

digunakan untuk menginduksi kalus adalah Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4 D), α -Naphthaleneaceticacid (NAA), dan Picloram (4-amino-3,5,6 -trichloropyridine-2-carboxylic acid) (Gantait dan Mahanta, 2021). Sedangkan Sitokinin yang sering digunakan adalah kinetin dan BAP (benzil adenin purin) (Eoh, 2021), dan TDZ (thidiazuron) (Kurniati *et al.*, 2012).

Berdasarkan uraian di atas maka penelitian ini mengkaji tentang "Induksi dan Proliferasi Kalus Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) Hasil Induksi Poliploid dengan Penambahan Auksin dan Sitokinin".

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh pemberian variasi konsentrasi auksin terhadap induksi kalus daun kelor diploid, mikroploid dan tetraploid?
2. Bagaimana pengaruh pemberian perlakuan auksin dan sitokinin terhadap proliferasi kalus kelor hasil induksi poliploid?

C. Tujuan Penelitian

1. Menganalisis pengaruh pemberian variasi konsentrasi auksin terhadap induksi kalus daun kelor diploid, mikroploid dan tetraploid.

2. Menganalisis pengaruh pemberian perlakuan auksin dan sitokinin terhadap proliferasi kalus kelor hasil induksi poliploidi.

D. Manfaat Penelitian

1. Bagi mahasiswa; sebagai informasi tambahan mengenai ZPT yang sesuai untuk induksi kalus, pada kultur eksplan daun kelor.
2. Bagi peneliti; sebagai sumber referensi atau informasi dalam meningkatkan kualitas bibit kelor dan untuk pengembangan penelitian lanjutan.

BAB II

LANDASAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

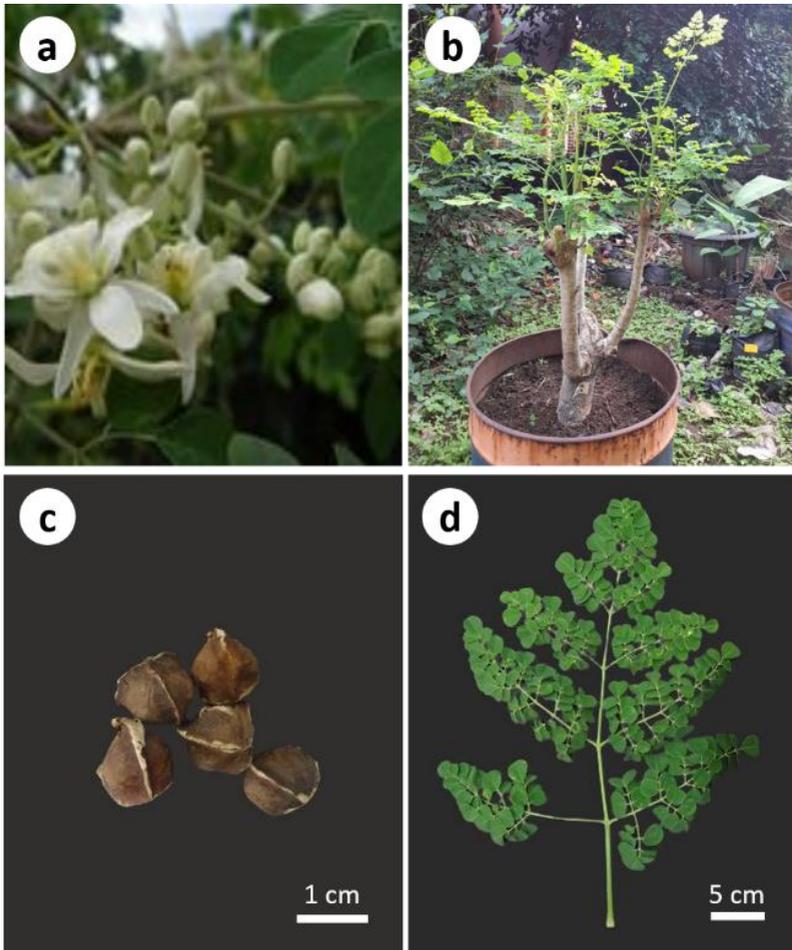
1. Kelor

Tanaman kelor (*M. oleifera* Lam.) adalah salah satu spesies dalam famili *Moringaceae*. Famili ini hanya memiliki satu genus yaitu *Moringa*, dan diperkirakan memiliki sekitar 33 spesies, salah satunya adalah *M. oleifera* L., (Silalahi, 2020). Klasifikasi tanaman Kelor sebagai berikut;

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Spermatophyta*
Kelas : *Dicotyledoneae*
Ordo : *Brassicales*
Famili : *Moringaceae*
Genus : *Moringa*
Spesies : *Moringa oleifera* Lam., (Marhaeni, 2021)

Tanaman kelor dapat tumbuh baik dengan ketinggian ± 1.000 m dpl pada semua jenis tanah kecuali tanah berlempung berat dengan pH tanah netral sampai sedikit asam (Isnain dan Nurhaedah, 2017). Tumbuh dengan suhu sekitar 25-35°C dan

curah hujan sekitar 250-3000 mm. Kelor berupa semak atau pohon (Gambar 2.1b) dengan tinggi sekitar 7-11 meter. Batangnya berkayu getas (mudah patah), tegak, berwarna putih kotor, berkulit tipis, permukaan kasar, dan jarang bercabang. Memiliki bunga berwarna putih kekuning-kuningan (Gambar 2.1a) yang keluar sepanjang tahun dengan aroma semerbak yang khas. Buah/polong kelor berbentuk panjang dengan panjang sekitar 20-60 cm. Buah kelor berwarna hijau ketika masih muda dan berubah menjadi coklat ketika tua. Memiliki biji (Gambar 2.1c) yang berkecambah dalam waktu sekitar 5-12 hari setelah penyemaian dan dapat ditanam pada kedalaman sekitar 2 cm di dalam tanah. (Najib dan Andriani, 2020). Penyimpanan biji dengan suhu 5°C dapat mempertahankan viabilitas biji kelor (Riastiwi *et al*, 2023). Biji berwarna coklat kehitaman berbentuk bulat (Purba, 2020). Akarnya sendiri tidak keras, dan bentuknya tidak beraturan (Isnain dan Nurhaedah, 2017). Akarnya pada saat muda memiliki bonggol yang akan berubah menjadi kayu pada saat tua (Purba, 2020). Memiliki daun (Gambar 2.1d) berbentuk bulat telur dengan tepi daun rata dan ukurannya kecil-kecil bersusun majemuk dalam satu tangkai (Najib dan Andriani, 2020).



Gambar 2.0.1 Morfologi Kelor; a. Bunga Kelor; b. perawakan Kelor; c. Biji Kelor; d. Daun Kelor ((a: Citra, 2019) dan (b-d: Dokumentasi Penelitian, 2023))

Tanaman kelor diperkirakan berasal dari India dan Afrika (Purba, 2020). Saat ini sudah tersebar hampir di seluruh dunia antara lain Asia Tenggara, Amerika

Tengah, Amerika Selatan, Semenanjung Arab, dan daerah tropis, seperti Indonesia (Nurhabibah dan Harahap, 2022). Di Indonesia sendiri, kelor tersebar di daerah Jawa, paling banyak di wilayah Jakarta, Jawa Barat, Jawa Tengah, Yogyakarta, Jawa Timur bagian utara, Pulau Madura, dan Kepulauan Kangean. Selain itu juga, tersebar di Bali bagian selatan, Pulau Lombok, Sumbawa, Kupang, Flores, Sumba dan Pulau Alor (Riastiwi *et al.*, 2018).

Di Indonesia kelor dikenal dengan berbagai nama yang berbeda disetiap daerahnya, diantaranya kelor (Jawa, Sunda, Bali, Lampung), maronggih (Madura), kelo (Bugis), ongge (Bima), murong atau barunggai (Sumatera). Kelor memiliki banyak julukan antara lain; *The Miracle Tree*, *Tree for Life*, dan *Amazing Tree*. Julukan ini muncul karena setiap bagian tanaman kelor mulai dari daun, buah, biji batang, bunga, hingga akar memiliki manfaat yang luar biasa (Isnand dan Nurhaedah, 2017). Manfaat tanaman kelor diantaranya yaitu;

a. Sebagai bahan pangan

Pada bidang pangan, Daun kelor biasanya digunakan sebagai bahan makanan karena mengandung nilai gizi yang tinggi dibanding

tanaman lain dan dianggap memiliki potensi dalam mengatasi masalah kelaparan dan malnutrisi terutama untuk balita dan ibu menyusui (Angelina *et al*, 2021). Berikut adalah kandungan nutrisi pada daun kelor (Tabel 2.1).

Tabel 2.1. Kandungan nutrisi daun kelor per 100g

Kandungan Nutrisi	Daun
Kalori (cal)	92
Protein (g)	6,7
Lemak (g)	1,7
Karbohidrat (g)	12,5
Serat (g)	0,9
Kalsium (mg)	440
Magnesium (mg)	42
Fosfor (mg)	70
Potassium (mg)	259
Tembaga (mg)	0,07
Besi (mg)	0,85
Vitamin B1 (mg)	0,06
Vitamin B2 (mg)	0,05
Vitamin B3 (mg)	0,8
Vitamin C (mg)	220
Vitamin E (mg)	448

(Isnan dan Nurhaedah, 2017).

Selain daun kelor, bagian lain dari tanaman kelor seperti, bunga, buah, dan biji kelor juga memiliki kandungan nutrisi (Tabel 2.2).

Tabel 2. 2. Kandungan nutrisi bunga, buah, dan biji kelor per 100 g

Kandungan Nutrisi	Bunga	Buah	Biji
Kadar air (%)	93,02	90,86	3,11
Protein (g)	24,5	12,36	32,19
Lemak (g)	6,01	0,98	32,40
Serat (g)	5,07	22,57	15,87
Mineral (g)	58,08	13,40	5,58
Kalori (Kcal/100 g)	6,2	50,73	15,96

(Isnain dan Nurhaedah, 2017).

b. Sebagai bahan obat

Selain sebagai bahan pangan, kelor juga digunakan dalam bidang pengobatan sejak zaman dahulu. Hampir semua bagian dari tanaman kelor dapat dimanfaatkan sebagai obat. Pada biji dan buah kelor berkhasiat sebagai antioksidan, antifungi, dan antidiabetes. Pada akarnya berkhasiat sebagai antiinflamasi, antimikroba, dan antiulcer. Sedangkan pada daun kelor berkhasiat sebagai anti-jamur, anti-hipertensi, anti-diare, anti-tumor, anti-

hiperglikemik, anti-kanker, anti-inflamasi, dan anti-bakteri (Munira *et al.*, 2021).

c. Kecantikan

Ekstrak daun kelor dijadikan sebagai campuran dalam bidang kecantikan karena mengandung antioksidan. Selain itu daun kelor juga dapat mengatasi kulit kering karena kurangnya asupan dari vitamin B2. Daun kelor mengandung vitamin B2 yang bermanfaat untuk mengatasi kulit kering menjaga kelembaban kulit (Isnain dan Nurhaedah, 2017).

Terdapat penelitian terkait pemanfaatan ekstrak daun kelor sebagai masker organik untuk merawat kesehatan kulit wajah. Daun kelor memiliki kandungan antioksidan, seperti tanin, steroid, triterpenoid, flavonoid, saponin, alkaloid. Selain itu juga mengandung fenolat yang dapat memberikan perlindungan dan menjaga kelembaban kulit wajah sehingga dapat mencegah penuaan (Perwita, 2019).

2. Kultur Jaringan

Teknik kultur jaringan (*In-vitro*) merupakan suatu teknik mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan dan organ yang ditumbuhkan dalam keadaan aseptis, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi individu baru yang utuh lagi (Basri, 2016). Dasar dari kultur jaringan adalah totipotensi sel. Totipotensi sel adalah bahwa setiap sel organ tanaman mampu tumbuh menjadi tanaman yang sempurna bila ditempatkan di lingkungan yang tepat. Metode kultur jaringan termasuk ke dalam perbanyakan vegetatif, artinya tidak melibatkan adanya fertilisasi antara sel kelamin jantan dan sel telur, itu sebabnya tanaman yang dihasilkan identik dengan induknya. Perbanyakan tanaman dengan teknik kultur jaringan juga sering disebut mikropropagasi atau perbanyakan mikro (Dwiyani, 2015).

Keuntungan perbanyakan tanaman dengan menggunakan teknik kultur jaringan adalah: (1) waktu perbanyakan lebih cepat; (2) jumlah benih yang dihasilkan tidak terbatas; (3) jumlah eksplan yang digunakan sedikit; (4) bebas hama dan penyakit; (5)

tidak tergantung musim; (6) genotip sama dengan induknya (Kurnianingsih *et al*, 2020).

Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan Kultur jaringan adalah: (1) genotip tanaman, ini sangat mempengaruhi pertumbuhan dan morfologis eksplan dalam kultur *in-vitro*. Masing-masing eksplan sangat bervariasi tergantung pada spesies, atau bahkan varietasnya. Masing-masing varietas tanaman berbeda kemampuan dalam merangsang pertumbuhan. Pengaruh genotip ini biasanya berhubungan erat dengan faktor lain seperti nutrisi dalam media dan lingkungan kultur. (2) Media kultur, perbedaan komposisi media, komposisi ZPT, keadaan dan jenis media yang digunakan sangat mempengaruhi pertumbuhan dan regenerasi eksplan yang dikulturkan. (3) Lingkungan tumbuh, seperti suhu, kelembaban relatif, dan cahaya. (4) Kondisi eksplan, keadaan jaringan tanaman yang menjadi eksplan berpengaruh terhadap pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur jaringan. Selain faktor genetis, kondisi eksplan yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan adalah ukuran, umur, jenis eksplan dan fase fisiologis jaringan yang digunakan sebagai eksplan (Basri, 2016). Selain itu, menurut

Apriliyani dan Wahidah (2021), terdapat faktor lain yaitu (5) sterilisasi, merupakan proses yang dilakukan dengan tujuan untuk membunuh mikroorganisme sehingga tidak memungkinkan untuk terjadinya kontaminasi. Sterilisasi menjadi hal paling utama untuk dilakukan dalam kultur jaringan, meliputi sterilisasi ruang, alat, bahan, dan medium yang digunakan.

3. Kalus

Kalus merupakan kumpulan sel yang belum terdiferensiasi. Secara teori, seluruh jaringan tanaman yang sel-selnya masih hidup dapat membentuk kalus secara *in vitro*. Namun, lebih mudah menghasilkan kalus pada jaringan tanaman yang masih muda (belum ada lignifikasinya pada dinding selnya), atau jaringan muda yang bersifat meristematik. Kalus akan terbentuk jika eksplan ditanam pada media kultur yang mengandung auksin dan sitokinin dengan rasio yang sama atau media yang mengandung 2,4 D (Purba *et al.*, 2017).

Adapun tipe-tipe kalus berdasarkan pertumbuhan dan perkembangan yaitu: kalus embriogenik, kalus proliferaatif, dan kalus senesen. Tipe kalus embriogenik

merupakan tipe kalus yang mampu berkembang ke arah embriogenesis somatik atau organogenesis somatik. Kalus proliferasif adalah kalus yang mampu tumbuh namun tidak mampu berkembang ke arah organogenesis atau embriogenesis. Kalus senesen (penuaan) merupakan kalus yang memiliki pertumbuhan lambat dan tidak menunjukkan perkembangan dengan ciri-ciri tidak terdapatnya klorofil, berwarna krem atau coklat dan selnya berbentuk polyhedral (Fauziyyah *et al.*, 2012).

Berdasarkan tekstur dan visualnya, tipe kalus dibedakan menjadi kalus remah, kompak, dan intermediet. Kalus kompak memiliki tekstur padat dan keras yang tersusun dari sel-sel kecil yang sangat rapat. Kalus remah memiliki tekstur lunak dan tersusun dari sel-sel dengan ruang antar sel yang banyak. Sedangkan kalus intermediet merupakan perpaduan antara kalus kompak dan kalus remah. Kalus yang mempunyai tekstur kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak sedangkan kalus remah dianggap baik untuk kultur suspensi dalam upaya perbanyak jumlah kalus (Ulva *et al.*, 2011)

4. Zat Pengatur Tumbuh

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) merupakan senyawa yang mutlak diperlukan meskipun ketersediaan unsur hara dalam tanaman tercukupi (Iswahyudi *et al.*, 2021). Maka dari itu, Zat pengatur tumbuh (ZPT) adalah senyawa organik yang bukan termasuk unsur hara, yang berpengaruh terhadap proses biokimia, fisiologis dan morfologis tumbuhan, yang aktif dalam konsentrasi rendah (Tanjung, 2021). Pertumbuhan dapat terhambat, bahkan tidak tumbuh apabila di dalam media tidak terdapat ZPT. Penggunaan ZPT yang tepat dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus dan organ-organ lainnya (Kartika dan Supriyanto, 2020). Aktivitas ZPT dalam pertumbuhan tergantung pada jenis, struktur kimia, konsentrasi, genotipe tanaman, serta fase fisiologis tanaman (Lestari, 2011).

Tumbuhan pada dasarnya dapat memproduksi ZPT secara alami, akan tetapi seringkali jumlahnya tidak cukup optimal sehingga dibutuhkan ZPT tambahan untuk menghasilkan respon pertumbuhan yang maksimal (Iswahyudi *et al.*, 2021). ZPT memiliki peran dalam mengatur percepatan pertumbuhan dari masing-masing jaringan dan mengintegrasikan bagian-

bagian tersebut guna menghasilkan bentuk yang kita sebut tumbuhan (Tanjung, 2021).

ZPT yang digunakan dalam kultur jaringan terdapat dua jenis yaitu ZPT sintetik (buatan) dan alami (Fauzi, 2021). ZPT sintetik biasanya digunakan karena kandungan hormon yang dapat disesuaikan dengan kebutuhan dan cara penggunaannya yang mudah (Tanjung, 2021). ZPT sintetik biasanya memiliki harga yang relatif mahal dan ketersediaannya cukup langka. Dalam memacu pertumbuhan tanaman, kemampuan ZPT alami bisa saja sama ataupun melebihi dari ZPT sintetik (Kartika dan Supriyanto, 2020). ZPT alami dapat diperoleh dari bahan-bahan organik yang terdapat di alam. ZPT alami memiliki kelebihan diantaranya yaitu lebih ramah lingkungan, mudah didapatkan, lebih aman digunakan, dan relatif lebih murah (Iswahyudi *et al.*, 2021). ZPT pada tanaman terdapat lima jenis, yaitu auksin, giberelin, etilen, asam absisat dan sitokinin dimana masing-masing hormon memberikan pengaruh yang berbeda terhadap fisiologi tanaman (Fauzi, 2021). Dalam menginduksi kalus ZPT yang sering digunakan adalah golongan auksin dan sitokinin. Auksin memiliki peranan dalam pertumbuhan sel, dominasi apikal dan

pembentukan kalus. Sedangkan, sitokinin berperan dalam mengatur pembelahan sel serta mempengaruhi diferensiasi tunas pada jaringan kalus (Manurung, Damanik dan Bayu, 2018). ZPT dari golongan sitokinin adalah: BAP (6-benzylaminopurine), 2-iP (isopentenyl adenine), kinetin (6-furfurylaminopurine), Zeatin (6-4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylaminopurine) dan TDZ (thidiazuron). ZPT golongan auksin yang biasa digunakan dalam kultur in-vitro adalah: indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butiricacide (IBA), 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) dan naphthalene-acetic acid (NAA) (Dwiyani, 2015). Selain itu juga terdapat Picloram (4-amino-3,5,6 -trichloropyridine-2-carboxylic acid) (Gantait dan Mahanta, 2021).

B. Kajian Penelitian yang Relevan

Penelitian didukung oleh penelitian-penelitian terdahulu yang ditampilkan pada tabel 2.1 sebagai berikut;

Tabel 2.3 Kajian Penelitian yang Relevan Tentang Induksi kalus

Eksplan	Tahap	Media	ZPT	Hasil	Pustaka
Daun dan ruas batang gaharu	Induksi kalus, suspensi sel	MS	Picloram, 2,4D, NAA, IAA, IBA, BA	Kombinasi perlakuan 1-2 mg/L 2,4-D dan (0,1-0,3 mg/L) BA menghasilkan pembentukan kalus yang tinggi (>80%) (induksi kalus) 0,5-1 mg/L 2,4-D menghasilkan kumpulan sel yang halus dan homogen (suspensi sel)	(Aryani Leksonowati, 2017)
Daun Gerbera	Induksi kalus, Regenerasi tunas, rooting, aklimatisasi	MS	Picloram, NAA, 2,4D, BAP, IBA, 1AA	1 mg/l Picloram menghasilkan Induksi kalus tercepat dengan berat segar dan kering maksimum (induksi) 1 mg/l kinetin dengan rerata Panjang tunas tertinggi (5,2 cm). 1,5 mg/l IAA menghasilkan jumlah akar terbanyak dan terpanjang	(Gantait dan Mahanta, 2021)

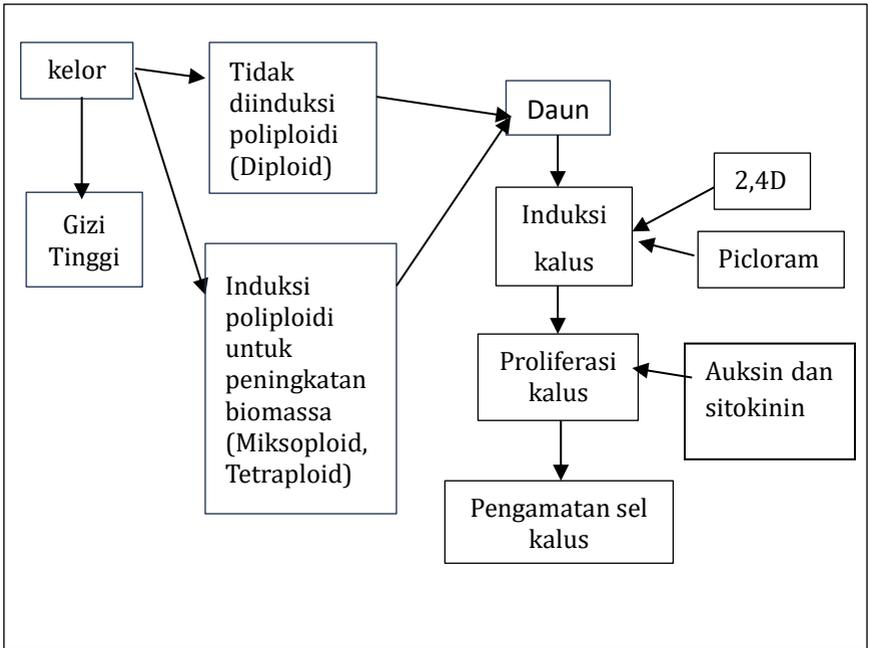
Tabel 2. 4 Kajian Penelitian yang Relevan Tentang Induksi kalus dan Perbanyakkan Tanaman Kelor

Eksplan	Tahap	Media	ZPT	Hasil	Pustaka
Daun Embrio zigotik	Induksi kalus Induksi embriogenik Maturase, germinasi, regenerasi aklimatisasi	MS	2,4D, NAA, BAP, Kinetin, IBA	Kalus tumbuh cepat optimal pada konsentrasi 10,75 μM NAA (eksplan embrio zigotik) dan 15.83 μM 2,4 D (eksplan daun). Frekuensi induksi embrio somatik tertinggi diperoleh pada konsentrasi 13,31 μM BAP Kalus embrio somatik yang diinduksi berakar dengan baik pada 10,75 μM NAA	(Devendra <i>et al.</i> , 2012)
Pucuk dan akar (dari biji yang dkecambah kan melalui <i>in vitro</i>)	Induksi kalus,	MS	2,4 D	0,5 mg/l 2,4-D merupakan media yang paling efektif untuk induksi kalus	(Shank <i>et al.</i> , 2013)
Daun dan kotiledon (dari biji yang dkecambah kan secara <i>in vitro</i>)	Induksi Perkembangan embrio dan diferensiasi pucuk Suspensi sel (kalus dari daun)	MS	2,4D, TDZ, BA, NAA, ABA	Kalus dari eksplan daun lebih baik dibandingkan dari eksplan kotiledon. 3 dan 5 TDZ mg/l dengan sukrosa 30 g/l menginduksi kalus embriogenik terbaik. 0,5 mg/l NAA + 0,025 mg/l ABA merupakan media terbaik untuk menghasilkan tunas. 3 mg/L TDZ media terbaik dalam suspensi sel untuk menghasilkan tunas.	(Gihan <i>et al.</i> , 2016)

Eksplan	Tahap	Media	ZPT	Hasil	Pustaka
Daun	Induksi kalus	MS	Kinetin+ NAA	Kombinasi yang optimum adalah NAA 0,5 ppm + Kinetin 1 ppm dengan rata-rata kalus induksi pada hari ke-14	(Evan <i>et al.</i> , 2017)
Epikotil Batang daun Tunas	Induksi kalus Diferensiasi kalus	MS	2,4D, NAA, BA, TDZ; Kinetin	2,4D 2 mg/L membentuk kalus tertinggi untuk semua jenis eksplan. 2,4-D 2 mg/L + BA 0,5 mg/L mencapai pembentukan kalus maksimum 100% pada eksplan epicotyl, daun dan tunas. BA 1,5 mg/L menghasilkan persentase diferensiasi kalus 100 % dan nilai jumlah pucuk tertinggi	(El-Banna, 2018)
Daun	Induksi Regenerasi pucuk Multiplikasi pucuk pengakaran aklimatisasi	MS	BAP, NAA, IBA	0,5 mg/l BAP (induksi) 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP (regenerasi) 1 mg/l BAP (multiplikasi) 0,5 mg/l IBA (pengakaran)	(Mamo dan Feyissa, 2019)
Buku tunas	Regenerasi	MS	BA	Konsentrasi 0,25 mg/l BA dengan Modifikasi medium MS dengan total konsentrasi N 40-60 mM dengan nisbah NO ₃ :NH ₄ ⁺ 3:1 menunjukkan hasil yang optimum.	(Handayani <i>et al.</i> , 2021)

Eksplan	Tahap	Media	ZPT	Hasil	Pustaka
Ruas (dari planlet)	Regenerasi	DKW	BAP, Kinetin, 2-IP, Zeatin, IAA, NAA, dan IBA	Kinetin 1 mg/l adalah yang terbaik untuk tinggi pucuk, jumlah pucuk dan jumlah tangkai daun. Auxin IAA pada 1,0 dan 2,0 mg/l menghasilkan jumlah akar dan panjang akar tertinggi.	(Rudiyanto <i>et al.</i> , 2023)

C. Kerangka Berpikir



D. Hipotesis

1. H_0 : Pemberian variasi konsentrasi auksin tidak berpengaruh terhadap induksi kalus daun kelor diploid, miksoploid dan tetraploid.
 H_a : Pemberian variasi konsentrasi auksin berpengaruh terhadap induksi kalus daun kelor diploid, miksoploid dan tetraploid.

2. H_0 : Pemberian beberapa perlakuan auksin dan sitokinin tidak berpengaruh terhadap proliferasi kalus kelor hasil induksi poliploidi.
 H_a : Pemberian beberapa perlakuan auksin dan sitokinin berpengaruh terhadap proliferasi kalus kelor hasil induksi poliploidi.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Oktober 2022 sampai agustus 2023, di Laboratorium Biak Sel dan Jaringan Tanaman, Pusat Riset Rekayasa Genetika, KST Soekarno, BRIN, Jalan Raya Jakarta-Bogor Km. 46 Cibinong, Bogor, Jawa Barat.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian kuantitatif dan kualitatif. Pendekatan penelitian yang digunakan berupa pendekatan penelitian eksperimental, karena pada penelitian ini menggunakan pengontrolan variabel, dan pemberian perlakuan. Penelitian ini terdiri dari dua tahapan sebagai berikut;

1. Induksi Kalus

Rancangan Acak yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pada percobaan ini terdiri dari 3 set; set (i) inisiasi eksplan daun kelor tetraploid, set (ii) inisiasi eksplan daun kelor miksploid, sedangkan set (iii) inisiasi eksplan daun kelor diploid. Dengan 5 perlakuan (Tabel 3.1) yaitu

kontrol; 0,5 mg/L 2,4D; 1 mg/L 2,4D; 0,5 mg/L Picloram; dan 1 mg/L Picloram. Setiap perlakuan terdiri dari tiga ulangan (petri) dan setiap petri berisi 10 eksplan.

Tabel 3.1 Perlakuan untuk Induksi Kalus Tanaman Kelor

Auksin (A)	PLOIDI		
	Diplo (D)	Mixo (M)	Tetra (T)
Tanpa Auksin/Kontrol (A₀)	DA ₀	MA ₀	TA ₀
0,5 mg/L 2,4D (A₁)	DA ₁	MA ₁	TA ₁
1 mg/L 2,4D (A₂)	DA ₂	MA ₂	TA ₂
0,5 mg/L Picloram (A₃)	DA ₃	MA ₃	TA ₃
1 mg/L Picloram (A₄)	DA ₄	MA ₄	TA ₄

2. Proliferasi Kalus

Rancangan acak yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap, dengan 5 perlakuan. Kalus steril yang diperoleh dari percobaan sebelumnya disubkultur ke media perlakuan. Setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan (petri) dengan setiap petri berisi 9 eksplan kalus. Adapun perlakuan disusun sebagai berikut:

A: 1 mg/L 2,4D

B: 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram

C: 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,5 mg/L BAP

D: 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,03 TDZ

E: 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ

C. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, gelas ukur, *pH-indicator strips* (4.0-7.0), *hot plate*, dan *magnetic stirrer*, pinset, scalpel, mata pisau, tabung reaksi, cawan petri, Bunsen, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF), spidol, lateks, *autoclave*, teko takar, keranjang, alat tulis, tisu, dan sprayer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksplan daun kelor diploid, miksploid dan tetraploid, alkohol 70% dan 96%, Aquades, Picloram, 2,4D, BAP, TDZ, NAA, antibiotik (*Streptomycin*, *Cefotaxime*, *Rifampicin*), fungisida Masalgin 50WP, Medium dasar yang digunakan adalah medium MS yang telah dimodifikasi (60MS 3:1) oleh Handayani *et al.*, 2021 yaitu total konsentrasi N 60 mM dengan nisbah $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+ 3:1$ (lampiran 1) ditambah 0,17g/L KH_2PO_4 , 0,01 g/L PVP, pematik Gelrite 2 g/L.

D. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kelor. Sampel yang digunakan berupa daun (gambar 3.1a) yang diambil pada pohon kelor dengan ploidi yang berbeda (tetraploid (gambar 3.1b), miksploid (gambar 3.1c), dan diploid (gambar 3.1d)) hasil dari penelitian Ridwan dan Witjaksono (2020). Kriteria

sampel yang digunakan yaitu daun yang diambil pada tangkai ke 2-3 dari pucuk.



Gambar 3.1 Kelor; (a) Daun Kelor diploid, mikroploid dan tetraploid; (b) Tanaman Kelor Tetraploid; (c) Tanaman Kelor Mikroploid; (d) Tanaman Kelor Diploid

(Dokumentasi penelitian, 2023)

E. Prosedur Penelitian

1. Persiapan Penelitian

a) Sterilisasi Alat

Alat yang disterilisasi yaitu berupa cawan petri, tabung reaksi, pinset, scalpel. Alat tersebut dicuci bersih dan dikeringkan. kemudian dibungkus menggunakan plastik dan diikat menggunakan karet gelang. Setelahnya di autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 20 menit.

b) Sterilisasi Lingkungan kerja

Kegiatan untuk mengkulturkan tanaman secara *in vitro* dilakukan di dalam LAF. LAF perlu disterilisasikan menggunakan UV selama 30 menit, kemudian disterilisasikan menggunakan alkohol 70% dengan cara disemprot dan dilap menggunakan tisu, lalu alat-alat penanaman dimasukkan ke dalam LAF dengan keadaan yang telah disterilkan menggunakan alkohol 70%.

c) Pembuatan media

Media dasar yang digunakan adalah media MS yang telah dimodifikasi. Media yang dibuat ada 3 macam yaitu sebagai berikut;

- 1) media antibiotik, terdiri dari medium dasar MS yang telah dimodifikasi ditambah dengan *Streptomycin* 0,4 g/L, *Cefotaxime* 0,4 g/L, *Rifampicin* 0,15 g/L, Masalgin 1 g/L yang dicampurkan di LAF setelah media diautoklaf
- 2) media perlakuan (2,4D dan picloram) untuk induksi kalus, terdiri dari medium dasar MS yang telah dimodifikasi ditambah dengan picloram dan 2,4D dengan konsentrasi yang telah ditentukan.
- 3) media perlakuan untuk proliferasi kalus. terdiri dari medium dasar MS yang telah dimodifikasi ditambah dengan 2,4D, picloram, BAP, TDZ, NAA, dengan konsentrasi yang telah ditentukan.

Nilai pH yang digunakan dalam pembuatan media yaitu 5,7-5,8. Kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm. Lalu media dituangkan ke petri dengan keadaan steril di dalam LAF.

2. Inisiasi

a) Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi dilakukan dengan 2 cara, yaitu (i) sterilisasi 1; eksplan dicuci menggunakan detergen

selama 10 menit, kemudian bilas menggunakan air hingga busanya menghilang. Eksplan dipisahkan dari tangkainya, kemudian dibawa ke LAF. Dalam LAF eksplan disterilisasikan menggunakan larutan natrium hipoklorit (NaClO) 5% selama 5 menit dan 2,5% selama 10 menit, masing-masing dibilas menggunakan aquades steril sebanyak 3 kali kemudian ditiriskan dan diiniasi ke dalam media antibiotik. (ii) Sterilisasi 2; eksplan dipisahkan dari tangkainya lalu dicuci menggunakan detergen selama 10 menit, kemudian bilas menggunakan air hingga busanya menghilang. Lalu direndam dengan larutan fungisida dan bakterisida (Masalgin dan agrept) masing masing 1g/L selama 30 menit. Lalu di dalam LAF eksplan disterilisasikan menggunakan larutan natrium hipoklorit (NaClO) 5% selama 5 menit dan 2,5% selama 10 menit, masing-masing dibilas menggunakan aquades steril sebanyak 3 kali. kemudian ditiriskan dan diiniasi ke dalam media perlakuan induksi. Sterilisasi pertama, digunakan untuk eksplan daun kelor tetraploid dan miksploid. Sedangkan untuk diploid, sebelumnya dilakukan sterilisasi pertama namun tidak terjadi pertumbuhan dan

perkembangan (mati), sehingga dilakukan dengan sterilisasi yang berbeda.

b) Inisiasi ke Media Antibiotik

Setelah disterilisasi daun ditiriskan di dalam cawan petri kemudian dipotong-potong. Eksplan yang digunakan berupa daun yang telah dipotong persegi, dengan ukuran $\pm 7-10\text{mm}^2$. Daun diberi 3 sayatan atau perlukaan tegak lurus dengan tulang daun. Setelah dipotong, daun diinisiasi ke dalam media antibiotik, dengan posisi bagian adaksial daun mengenai media. Eksplan diinkubasi di media antibiotik selama 3 hari pada suhu $16^\circ-18^\circ\text{C}$ dalam kondisi gelap.

3. Induksi kalus

Setelah diinkubasi di media antibiotik selama 3 hari, dipindahkan ke media perlakuan induksi kalus. Setiap petri berisi 10 eksplan, dengan tiga kali ulangan (petri) pada setiap perlakuan. Kultur diinkubasi pada suhu $16^\circ-18^\circ\text{C}$ dalam kondisi gelap. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 8 minggu.

4. Proliferasi

Kalus steril yang peroleh di subkultur ke media perlakuan proliferasi. Setiap petri berisi enam kalus, dengan tiga kali ulangan (petri) pada setiap perlakuan.

Kultur diinkubasi pada suhu 16°-18°C dalam kondisi gelap. Pengamatan dilakukan pada minggu ketiga setelah subkultur

F. Parameter Penelitian

Parameter yang diamati pada Percobaan satu dan dua dijelaskan sebagai berikut;

1. Persentase eksplan bebas kontaminasi

Persentase eksplan bebas kontaminasi diamati dari jumlah eksplan yang steril ditandai dengan eksplan yang tidak mengalami kontaminasi baik bakteri maupun jamur. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 8 minggu, yang dinyatakan dalam bentuk persentase. Cara menghitung persentase eksplan bebas kontaminasi sebagai berikut:

persentase eksplan bebas kontaminasi (%)

$$= \frac{\sum \text{eksplan steril}}{\sum \text{total eksplan yang ditanam}} \times 100$$

2. Persentase hidup

Persentase hidup diamati dari jumlah eksplan yang hidup ditandai dengan eksplan yang masih berwarna hijau segar dan tidak mengalami 100% browning pada permukaan eksplan, serta masih dapat

tumbuh dan berkembang menjadi kalus. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 8 minggu, yang dinyatakan dalam bentuk persentase. Cara menghitung persentase hidup sebagai berikut:

persentase hidup (%)

$$= \frac{\sum \text{eksplan hidup}}{\sum \text{total eksplan steril yang ditanam}} \times 100$$

3. Persentase kemunculan kalus

Kalus tumbuh dihitung setelah munculnya kalus. Kalus tumbuh dihitung setiap minggu.

4. Persentase eksplan berkalus

Eksplan yang berkalus diamati dan dihitung setiap minggu sekali yang dinyatakan dalam bentuk persentase. Cara menghitung persentase eksplan yang berkalus sebagai berikut:

Eksplan yang berkalus (%)

$$= \frac{\sum \text{eksplan berkalus}}{\sum \text{total eksplan yang steril yang ditanam}} \times 100$$

5. Tipe dan warna kalus

Tipe kalus diamati secara langsung penampakan visualnya, kemudian dideskripsikan. Warna kalus merupakan gambaran visual dari kalus sehingga dapat

diketahui bahwa kalus yang terbentuk sel-selnya masih aktif atau mati. Pengamatan warna kalus dilakukan pada minggu terakhir pengamatan. Pada percobaan 1 diamati secara visual kemudian dideskripsikan, sedangkan pada percobaan 2 diamati warnanya secara visual kemudian dinyatakan dalam skoring, yaitu 1= warna coklat, 2= warna putih-kekuningan, 3= warna kuning.

6. Persentase Penutupan Kalus

Penutupan kalus diamati dari perkembangan kalus yang menutupi permukaan eksplan. Persentase penutupan kalus dihitung dengan cara membandingkan luas kalus yang terbentuk terhadap luas eksplan. Pengamatan dilakukan pada 8 MST.

7. Berat basah dan berat kering kalus

Pengukuran bobot kalus dilakukan pada percobaan kedua, di akhir penelitian. Pengukuran dilakukan dengan cara ditimbang menggunakan timbangan analitik dengan satuan gram. Pengukuran berat kering dilakukan setelah pengukuran berat basah yang kemudian dikeringkan dengan oven suhu 60°C selama 3 hari lalu ditimbang.

8. Pengamatan bentuk sel kalus secara mikroskopis

Pengamatan bentuk sel dilakukan dengan menggunakan mikroskop (Mikroskop Inverted merk Nikon). Sebanyak satu klaster kalus ($\pm 0,1$ gr), diletakan di petri kecil, lalu dicacah halus untuk memisahkan antar klaster selnya. Selanjutnya diberi $\pm 2-4$ ml aquades steril dan diamati dibawah mikroskop. Parameter bentuk sel yang diamati dikategorikan menjadi; (i) sel berbentuk bulat isodiametris, (ii) sel berbentuk lonjong/oval, (iii) sel-sel yang mengelompok (*clump*), (iv) sel /*clump* yang mengalami nekrosis/ mati. Pengamatan dilakukan sebanyak tiga ulangan untuk setiap perlakuan, dengan 3 bidang pandang untuk setiap ulangan. Masing-masing parameter bentuk sel dihitung pada setiap bidang pandang dengan perbesaran lensa objektif 10×10 .

9. Pewarnaan acetocarmine

Kalus diambil secara acak kemudian diletakan di atas kaca preparat, lalu dicacah untuk memisahkan antar selnya dan diratakan di atas kaca preparat setipis mungkin, setelah itu kalus ditetesi larutan acetocarmine secukupnya, dan ditutup dengan gelas

penutupnya, lalu dilakukan penekanan (*Squash*) dengan bantuan ibu jari secara perlahan. Kemudian kaca preparat dilewatkan di atas api bunsen agar larutan acetocarmine meresap dan kering. Selanjutnya preparat diamati bentuk selnya.

G. Metode Analisis Data

Data kualitatif yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Sedangkan data kuantitatif yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk rata-rata dan standar error (SE) yang dianalisis dengan Microsoft Excel, Software R ver. 4.2.3 dan dianalisis secara statistik dengan ANOVA kemudian dilanjutkan dengan Uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) jika terdapat hasil yang signifikan.

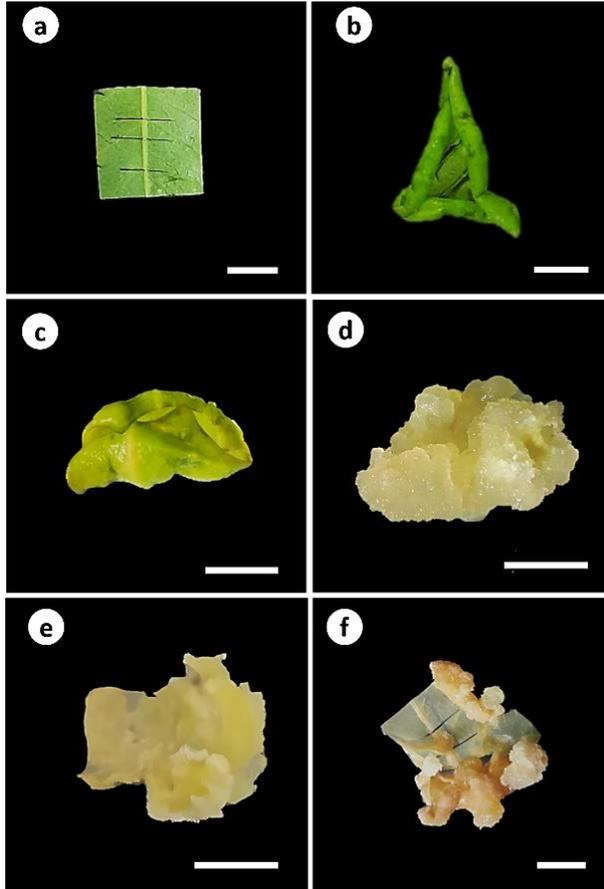
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Induksi Kalus

Proses pembentukan kalus dari eksplan daun kelor terjadi melalui beberapa tahapan (Gambar 4.1 a). Pada tahap awal yaitu minggu ke-4 sampai minggu ke-5, eksplan akan membesar sehingga permukaan daun akan menggulung (Gb 4.1 b) lalu membengkak (Gb 4.1 c). Kemudian terjadi pertumbuhan sel-sel yang cepat dan tidak terorganisir di tepian daun atau bagian perlukaan, lama-kelamaan sel-sel tersebut bercampur sehingga pada minggu ke-4 sampai minggu ke-10 mulai terbentuk kalus pada eksplan. Kalus dapat terbentuk pada eksplan daun semua ploidi kelor baik tetraploid, miksoploid maupun diploid (Gb 4.1 d-f). Sebagian besar kalus yang terbentuk pada kelor tetraploid bertipe basah/mengapas dengan warna kuning atau putih kekuningan (Gb 4.1 d). Pada kalus aksesi miksoploid umumnya bertipe campuran antara kompak dan mengapas dengan warna putih kekuningan (Gb 4.1 e),

sedangkan pada aksesori diploid juga bertipe campuran tetapi ukurannya kecil-kecil dan warnanya kecoklatan (gambar 4.1 f).



Gambar 4.1 Proses Pembentukan kalus dari daun kelor; eksplan potongan daun (a); daun mulai menggulung (b); daun mulai membengkak (c); kalus daun kelor tetraploid (d); kalus daun kelor miksploid (e); kalus daun kelor diploid (f); bar = 5mm.

Dari tiga ploidi daun kelor yang disterilisasi menggunakan metode sterilisasi 1 (dengan antibiotik) hanya ada dua macam ploidi kelor yang hidup yaitu tetraploid dan miksploid, sedangkan untuk diploid mengalami kematian atau tidak mengalami pertumbuhan, namun 100% bebas kontaminasi. Oleh karena itu dicoba inisiasi lagi dengan metode sterilisasi yang berbeda (tanpa antibiotik) pada ploidi diploid, miksploid dan tetraploid tetapi ternyata hanya eksplan kelor diploid yang hidup, sedangkan eksplan miksploid dan tetraploid mengalami kematian atau kontaminasi (tabel 4.1). Pada eksplan tetraploid dan miksploid dengan sterilisasi menggunakan antibiotik, memiliki persentase bebas kontaminasi (steril) yang tinggi ($\geq 75\%$), dengan persentase hidup yang tinggi pula ($\geq 67\%$), Sedangkan pada eksplan diploid dengan sterilisasi menggunakan antibiotik memiliki persentase eksplan bebas kontaminasi 0% (100 % kontaminasi). Pada sterilisasi tanpa antibiotik, eksplan miksploid

dan tetraploid memiliki persentase eksplan bebas kontaminasi 0 % (100 % kontaminasi), sedangkan pada eksplan diploid dengan sterilisasi tanpa antibiotik memiliki persentase bebas kontaminasi dan daya hidup yang lebih rendah ($\leq 67\%$).

Pemberian auksin pada potongan daun kelor berpengaruh terhadap pembentukan kalus (tabel 4.2). Semua eksplan dapat hidup pada medium dengan penambahan auksin maupun tidak, tetapi eksplan tidak dapat membentuk kalus tanpa adanya penambahan auksin. Pada eksplan kelor miksoptloid, perlakuan auksin menginduksi kalus sekitar 26,7- 90%, dengan penutupan kalus 3,7- 14,7%. Pada eksplan kelor tetraploid, perlakuan auksin menginduksi kalus sekitar 10- 73,3%, dengan penutupan kalus 8,1- 29,7%. Pada Eksplan diploid, auksin menginduksi kalus sekitar 40-60% dengan persentase penutupan kalus 2,3-14,7%. Pada kelor diploid kemunculan kalus lebih cepat dibandingkan yang lainnya, dengan kelor

miksoploid kemunculan kalusnya yang paling lama yaitu ≥ 8 MST. Pada kelor tetraploid dan miksoploid tipe kalus dominan Mengapas atau campuran dengan warna putih kekuningan, sedangkan pada kelor diploid tipe kalus dominan campuran, dengan warna kecoklatan (*browning*). Warna tersebut disebabkan karena kondisi eksplan diploid yang berubah warna akibat sterilisasi pada saat inisiasi.

Tabel 4.1 Pengaruh auksin 2,4D dan Picloram terhadap persentase bebas kontaminasi, survival, waktu kemunculan kalus dari eksplan daun kelor diploid, miksoptloid, dan tetraploid

Auksin (mg/L)	% Eksplan bebas kontaminasi			% hidup			Waktu kemunculan kalus (MST)			Keterangan
	2×	M×	4×	2×	M×	4×	2×	M×	4×	
Tanpa auksin (0)	0	100	100	-	77	67	-	0	0	Metode sterilisasi dengan antibiotik (sterilisasi 1)
2,4D (1,0)	0	100	100	-	97	87	-	8-10	7	
2,4D (0,5)	0	75	100	-	100	100	-	8-10	5	
Picloram (1,0)	0	75	100	-	97	100	-	8-10	7	
Picloram (0,5)	0	75	80	-	100	73	-	8-10	6	
Tanpa auksin (0)	33	0	0	60	-	-	0	-	-	
2,4D (1,0)	67	0	0	60	-	-	4	-	-	
2,4D (0,5)	67	0	0	60	-	-	5	-	-	
Picloram (1,0)	33	0	0	53	-	-	4	-	-	
Picloram (0,5)	33	0	0	40	-	-	5	-	-	

Keterangan: kode menunjukan macam ploidi; 2× (diploid); M×(Miksoptloid); 4× (Tetraploid).

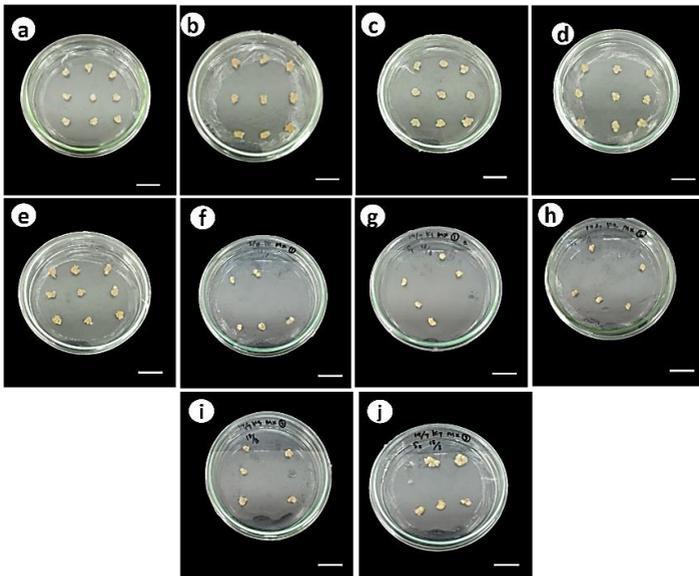
Tabel 4.2 Pengaruh auksin 2,4D dan Picloram terhadap persentase kalus yang terbentuk dan penutupan kalus dari eksplan daun kelor diploid, miksploid, dan tetraploid umur 8-12 minggu

Auksin (mg/L)	% Kalus yang terbentuk			% Penutupan kalus			Tipe dan warna kalus	Keterangan
	2×	M×	4×	2×	M×	4×		
Tanpa auksin (0)	-	0,0	0,0	-	0,00	0,0	Mengapas atau campuran dengan warna putih kekuningan	Metode sterilisasi dengan antibiotik (sterilisasi 1)
2,4D (1,0)	-	26,7	73,3	-	3,7	26,3		
2,4D (0,5)	-	36,7	10,0	-	10,2	8,1		
Picloram (1,0)	-	90,0	36,7	-	14,7	21,3		
Picloram (0,5)	-	30,0	40,0	-	3,7	29,7	Campuran, dengan warna kecoklatan	Metode sterilisasi tanpa antibiotik (sterilisasi 2)
Tanpa auksin (0)	0,0	-	-	0,0	-	-		
2,4D (1,0)	60,0	-	-	14,7	-	-		
2,4D (0,5)	53,3	-	-	6,7	-	-		
Picloram (1,0)	60,0	-	-	2,3	-	-		
Picloram (0,5)	40	-	-	3,0	-	-		

Keterangan: kode menunjukkan macam ploidi; 2× (diploid); M×(Miksploid); 4× (Tetraploid)

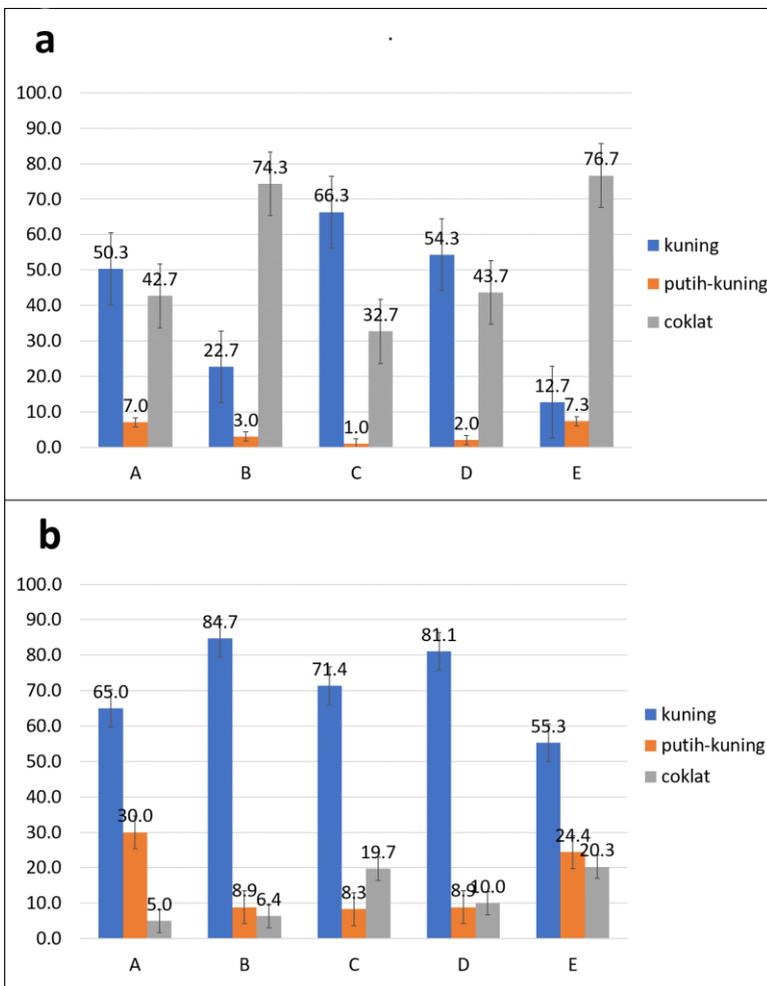
2. Proliferasi Kalus

Morfologi kalus pada tahap proliferasi kalus dapat dilihat pada gambar 4.2. Kalus tetraploid (gambar 4.2 a-e) pada tahap proliferasi subkultur 3 memperlihatkan morfologi dengan tekstur kapas (basah) pada semua perlakuan. Kalus miksploid (gambar 4.2 f-j) pada tahap proliferasi subkultur 2 memperlihatkan morfologi dengan tekstur dominan kompak pada semua perlakuan.

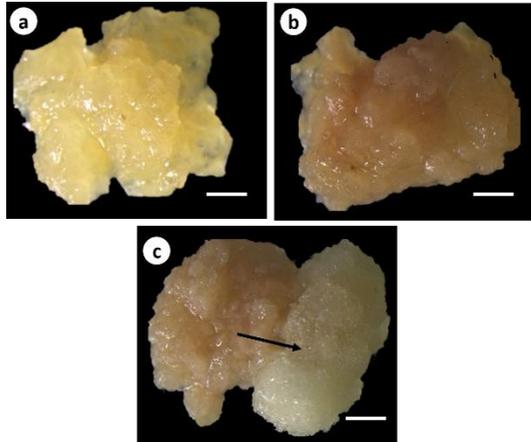


Gambar 4.2 Kalus kelor umur 3 minggu setelah subkultur pada perlakuan kombinasi auksin-sitokinin; tetraploid (a-e); dan miksploid (f-j); 1 mg/L 2,4D (a dan f); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram (b dan g); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,5 mg/L BAP (c dan h); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,03 TDZ (d dan i); 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (e dan j); bar: 2cm.

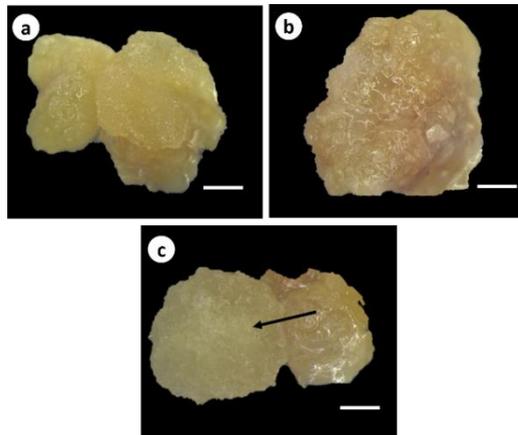
Warna kalus yang terbentuk dari ke-5 perlakuan pada eksplan kalus tetraploid (gambar 4.4) dan mikroploid (gambar 4.5) dikategorikan menjadi 3 warna, yaitu warna coklat, kuning, dan putih-kuning. Tetraploid didominasi warna coklat pada semua perlakuan, sedangkan pada kalus mikroploid didominasi warna kuning. Pada tetraploid perlakuan 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (E) tingkat warna dominasi coklat tertinggi dibandingkan yang lainnya, namun memiliki tingkat warna putih-kuning yang tinggi pula. Warna dominasi kuning tertinggi terjadi pada kalus perlakuan 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,5 mg/L BAP (C). Sama seperti tetraploid, pada mikroploid warna dominasi coklat tertinggi terjadi pada perlakuan 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (E), sedangkan warna kuning pada perlakuan 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram (B), dan warna putih-kuning pada perlakuan 1 mg/L 2,4D (A) (gambar 4.3).



Gambar 4.3 Grafik Pengaruh kombinasi auksin dan sitokinin terhadap persentase warna kalus kelor tetraploid (a) dan miksploid (b) umur 3 minggu setelah subkultur; 1 mg/L 2,4D (A); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram (B); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,5 mg/L BAP (C); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,03 TDZ (D); 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (E).

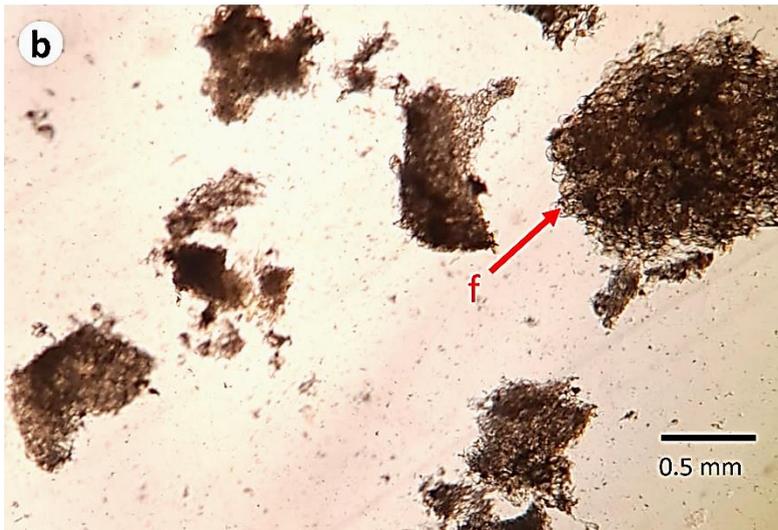


Gambar 4.4 Kategori warna kalus kelor tetraploid umur 3 minggu setelah subkultur pada perlakuan kombinasi auksin-sitokinin; kuning (a); kecoklatan (b); Putih-Kekuningan (c); tanda panah hitam menunjukkan bagian kalus berwarna putih-kekuningan; bar: 1mm.



Gambar 4.5 Kategori warna kalus kelor miksploid umur 3 minggu setelah subkultur pada perlakuan kombinasi auksin-sitokinin; kuning (a); kecoklatan (b); Putih-Kekuningan (c); tanda panah hitam menunjukkan bagian kalus berwarna putih-kekuningan; bar: 1mm

Kalus yang diamati di bawah mikroskop menunjukkan morfologi yang bervariasi dan terdiri dari sel isodiametrik berbentuk bulat, sel memanjang, dan kelompok sel (Gambar 4.6). Lima media perlakuan menunjukkan terdapat perbedaan jumlah sel bulat, memanjang, dan *clump* serta terdapat sel yang mengalami kematian (nekrosis) (Tabel 4.3). pada kalus tetraploid, jumlah sel berbentuk lonjong lebih banyak daripada yang berbentuk bulat. Perlakuan, NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (E), menghasilkan jumlah sel berbentuk bulat (17%) sel membentuk *clump* (13%) dan jumlah nekrosis (8%) tertinggi daripada media perlakuan lainnya, dengan sel lonjong (62%). Namun jumlah sel berbentuk lonjong tersebut tidak lebih tinggi dibanding perlakuan 1 mg/L 2,4D (A) (83%). Berbeda dengan kalus tetraploid, pada kalus miksoploid jumlah *clump* lebih dominan, hal ini karena pada kalus miksoploid memiliki tekstur kompak yang antar selnya tersusun rapat sehingga sulit untuk terpisah. Diantara ke-5 perlakuan, persentase *clump* tertinggi yaitu sebesar 65% terjadi pada perlakuan 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram (B). Pada perlakuan 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,5 mg/L BAP (C), memiliki persentase sel berbentuk bulat dan lonjong tertinggi yaitu sebesar 15% dan 53%. Sama halnya dengan kalus tetraploid, pada kalus miksoploid persentase nekrosis tertinggi juga terjadi pada perlakuan 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (E).



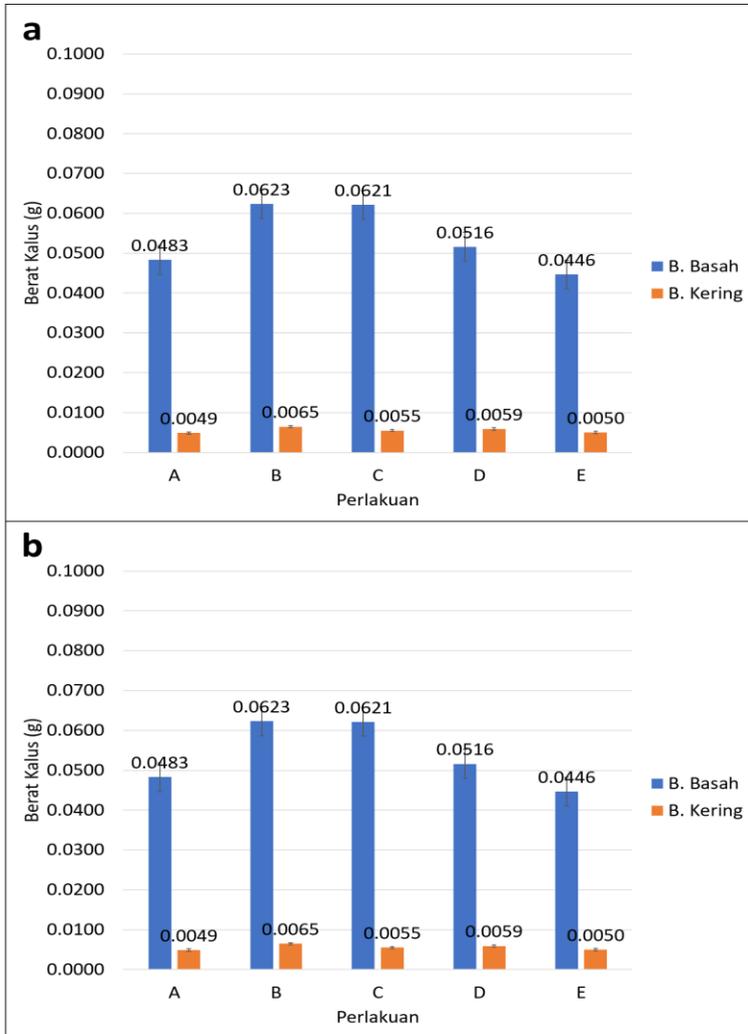
Gambar 4.6 Morfologi sel kalus kelor tetraploid (a); dan miksploid (b); yang terbentuk diamati dengan mikroskop perbesaran 10x4; sel bulat dengan sitoplasma (a); sel bulat kosong (b); sel memanjang (c); Clump (d); sel nekrosis (e); *clump* yang terdiri dari sel-sel bulat (f).

Tabel 4.3. Pengaruh kombinasi auksin dan sitokinin terhadap morfologi sel pada kalus kelor tetraploid umur 3 minggu setelah subkultur

Eksplan	Perlakuan	Jumlah sel Bulat(%)	Jumlah sel Lonjong (%)	Jumlah Klamp (%)	Nekrosis (%)
Tetraploid	A	5,56 ± 1,46 (7) ^a	69,56 ± 13,60(83)^a	6,67 ± 2,22(8) ^a	1,56 ± 0,48(2) ^a
	B	5,11 ± 1,72 (10) ^a	36,67 ± 2,03(71) ^b	6,33 ± 0,88(12) ^a	3,56 ± 0,73(7) ^a
	C	7,89 ± 1,72(13) ^a	45,33 ± 6,34(74) ^b	6,22 ± 0,59(10) ^a	1,89 ± 0,97(3) ^a
	D	4,78 ± 1,35 (8) ^a	45,22 ± 6,41(76) ^b	6,33 ± 0,96(11) ^a	3,22 ± 0,56(5) ^a
	E	9,44 ± 4,13(17)^a	33,67 ± 4,67(62) ^b	7,00 ± 1,68(13)^a	4,33 ± 1,15(8)^a
Mixoploid	A	0,67 ± 0,33 (4) ^a	5,56 ± 1,17 (34) ^a	9,22 ± 1,90 (56) ^a	1,00 ± 0,33 (6) ^a
	B	0,44 ± 0,11 (4) ^a	2,56 ± 1,54 (25) ^a	6,67 ± 0,69 (65)^a	0,56 ± 0,56 (5) ^a
	C	3,44 ± 2,47 (15)^a	12,11 ± 7,61 (53)^a	7,33 ± 2,22 (32) ^a	0,11 ± 0,11 (0) ^a
	D	1,78 ± 0,11 (12) ^a	4,78 ± 1,49 (33) ^a	7,00 ± 0,19 (48) ^a	1,00 ± 0,19 (7) ^a
	E	0,89 ± 0,48 (9) ^a	2,22 ± 0,62 (23) ^a	5,44 ± 0,99 (56) ^a	1,11 ± 0,62 (11)^a

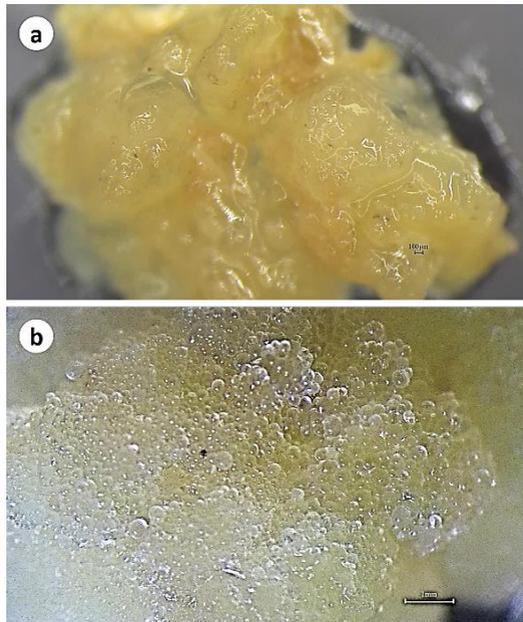
Keterangan: Nilai merupakan rata-rata ± standar error (n=3). Huruf yang sama pada tabel tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf 5%. 1 mg/L 2,4D (A); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram (B); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,5 mg/L BAP (C); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,03 TDZ (D); 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (E).

Dari penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa pemberian ZPT berpengaruh terhadap berat kalus (Gambar 4.7). berat kalus yang dihasilkan kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan membesarnya kalus. Gambar 4.7 menunjukkan bahwa pada kalus tetraploid perlakuan 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram (B), menghasilkan berat basah kalus (0.0623 g) dan berat kering kalus (0.0065 g) tertinggi, sedangkan perlakuan 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (E), menghasilkan berat basah kalus (0.0446 g) dan berat kering kalus (0.0050) terendah. Berbanding terbalik dengan kalus tetraploid, pada kalus miksploid perlakuan 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (e), menghasilkan berat basah kalus (0.0809 g) dan berat kering kalus (0.0100 g) tertinggi. Sedangkan pada perlakuan 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,5 mg/L BAP (C), menghasilkan berat basah kalus (0.0220 g) dan berat kering kalus (0.0026 g) terendah.

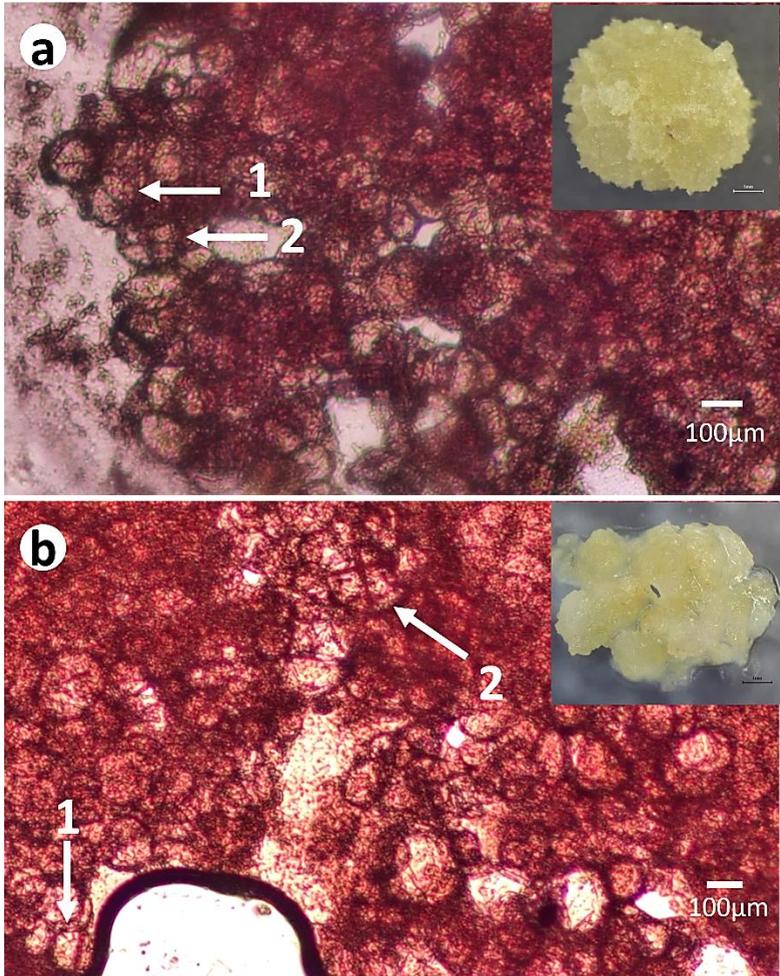


Gambar 4.7 Bobot basah dan bobot kering kalus tetraploid (a); dan miksploid (b); Huruf merupakan kode perlakuan; 1 mg/L 2,4D (A); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram (B); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,5 mg/L BAP (C); 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram + 0,03 TDZ (D); 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (E).

Gambar hasil pengamatan kalus tetraploid dan mikroploid di bawah mikroskop stereo dan dengan menggunakan pewarna acetocarmin dapat dilihat pada gambar .9. Secara mikroskopis, kalus tetraploid dan mikroploid memperlihatkan morfologi yang agak berbeda. Kalus mikroploid pada hampir semua perlakuan sudah memperlihatkan struktur granula (bulat), sedangkan kalus tetraploid masih belum terbentuk struktur granula (gambar 4.8).



Gambar 4. 8 morfologi kalus secara mikroskopi dengan kalus tetraploid perlakuan (C) 1 mg/L 2,4D +1 mg/L Picloram + 0,5 mg/L BAP (a); dan mikroploid perlakuan (E) 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (b). Bar (a:1 μ m, b: 1mm).



Gambar 4.9 pengamatan kalus menggunakan pewarnaan acetocarmin dibawah mikroskop dengan kalus mikroploid perlakuan (E) 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (a); dan tetraploid perlakuan (E) 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (b); sel yang membelah 2 (diad) (1); sel yang membelah 4 (tetrad) (2); dengan perbesaran 4x10. Bar 100 μ m

B. Pembahasan

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yang saling berurutan. Berikut merupakan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini.

1. Induksi Kalus

Kalus kelor dapat diperoleh dari potongan eksplan daun kelor tetraploid, miksploid, maupun diploid, yang diberi perlakuan auksin (2,4D dan Picloram). Pada kelor tetraploid dan miksploid memiliki kemampuan daya hidup yang lebih baik dibandingkan dengan kelor diploid, hal ini dilihat dari eksplan kelor tetraploid dan miksploid yang memiliki persentase eksplan bebas kontaminasi $\geq 75\%$ dan persentase hidup $\geq 67\%$. Meskipun begitu, kelor diploid memiliki waktu kemunculan kalus yang lebih cepat dibandingkan yang lainnya yaitu 4-5 MST. Pada kelor diploid dan tetraploid perlakuan 1mg/L 2,4D efektif dalam menginduksi kalus dari segi pembentukan kalus dan penutupan kalus, sedangkan Pada kelor miksploid perlakuan 1 mg/L Picloram efektif dalam menginduksi kalus dari segi pembentukan kalus dan penutupan kalus. Dari 3 macam ploidi yang digunakan, dengan diberi perlakuan yang sama menunjukkan adanya perbedaan

respon dalam pembentukan kalus, hal ini menunjukkan adanya pengaruh genotipe tanaman. Menurut (Ningsih *et al.*, 2016) Beragamnya jumlah kalus dan efisiensi pembentukan kalus pada media yang digunakan menunjukkan bahwa genotipe yang berbeda membutuhkan media yang berbeda juga. Respon pembentukan kalus dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain media kultur, genotipe tanaman, keadaan fisiologi eksplan (Maulidia dan Fanata, 2019), dan komposisi ZPT yang digunakan (Sisharmini *et al.*, 2016).

Morfologi kalus meliputi warna dan tekstur kalus. Warna dan tekstur pada kalus dapat digunakan sebagai indikator kualitas kalus. Pada kelor miksoptloid dan tetraploid diperoleh rata-rata kalus bertipe kapas atau campuran dengan warna putih kekuningan, sedangkan pada kelor diploid diperoleh rata-rata kalus bertipe campuran dengan warna kecoklatan. Menurut (Fintarti (2010) dalam Khalida dan Noli, 2019) menyebutkan bahwa adanya variasi tekstur dan warna kalus yang terbentuk dipengaruhi oleh pemberian auksin yang ditambahkan ke dalam medium. Kalus yang berwarna putih hingga kekuningan menunjukkan bahwa kalus

berkembang dengan baik dan aktif mengalami pembelahan sel serta mengandung kloroplas yang tinggi. Sedangkan Kalus yang berwarna coklat (semakin gelap) menunjukkan pertumbuhan kalus semakin menurun (Silvina dan Ningsih, 2021).

Salah satu permasalahan yang menghambat keberhasilan dalam kultur jaringan terutama pada induksi kalus adalah kontaminasi. Cara untuk mengurangi tingkat kontaminasi tersebut, eksplan daun kelor diinokulasi ke dalam media yang mengandung antibiotik selama 3 hari. Penggunaan antibiotik yang ditambahkan ke media tanam dapat mengendalikan pertumbuhan kontaminasi, penggunaan antibiotik, kontaminasi yang terjadi hanya sekitar 9% - 18% (Handayani dan Witjaksono, 2023). Eksplan diploid dengan sterilisasi 1 (dengan antibiotik) tidak mengalami kontaminasi (100% steril), akan tetapi tidak mengalami pertumbuhan (tidak hidup). Hal ini dikarenakan penambahan antibiotik pada media menimbulkan efek fitotoksik pada eksplan sehingga menyebabkan kematian (Ray dan Ali, 2017). Pengaruh antibiotik ini sangat bergantung pada spesies tanaman dan kultivarnya. Selain itu, jenis antibiotik yang dipilih dan

konsentrasinya merupakan faktor penting, karena keberadaan antibiotik dalam medium dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Gerszberg dan Grzegorzcyk, 2019).

Pada sterilisasi lain (tanpa antibiotik) tidak terdapat kelor tetraploid dan miksploid yang hidup (terkontaminasi), Hal ini terjadi kemungkinan terjadi karena sterilisasi yang kurang optimal atau kurang tepat sehingga kontaminan masih dapat hidup dan menyebabkan kontaminasi. Menurut (Tuwo *et al.*, 2022), Penggunaan bahan sterilan dengan konsentrasi yang kurang tepat tidak tentu dapat mematikan kontaminan, namun dapat menyebabkan kematian pada eksplan. Selain bahan dan konsentrasi sterilan, Keberhasilan sterilisasi juga dipengaruhi oleh ketepatan teknik sterilisasi, dan waktu sterilisasi, yang digunakan. Kondisi eksplan juga termasuk dalam faktor yang mempengaruhi keberhasilan sterilisasi. Eksplan yang diperoleh dari alam dapat membawa spora atau benih jamur dan bakteri yang dapat tumbuh dan merusak eksplan.

2. Proliferasi Kalus

Proliferasi kalus adalah proses pembelahan dan pembesaran sel yang tidak terstruktur. Pada tahap ini hanya menggunakan kalus tetraploid dan miksploid, hal ini karena pada kalus diploid rata-rata kalus yang diperoleh mengalami browning. Pada tahap proliferasi, kalus miksploid menunjukkan kemampuan berkembang biak lebih baik dibandingkan kalus tetraploid. Kalus tetraploid yang disubkultur ke media perlakuan proliferasi menghasilkan tekstur kapas/basah, dengan karakteristik lunak, dan rapuh. Hal ini sesuai dengan penelitian (Shank *et al.*, 2013) yang menyebutkan bahwa kalus kelor yang dihasilkan lunak, rapuh, dan putih kekuningan dimana karakteristik tersebut cocok untuk kultur suspensi. Sedangkan kalus miksploid menghasilkan kalus dominan kompak dengan bagian permukaannya berbentuk granular (bulatan-bulatan kecil).

Kalus tetraploid dominan berwarna coklat. Kalus berwarna coklat (semakin gelap) mengindikasikan pertumbuhan kalus yang semakin menurun. Warna kecoklatan pada kalus merupakan tanda terjadinya kemunduran fisiologis, selain itu

menandakan adanya metabolisme senyawa fenol yang bersifat toksik dan dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan menyebabkan kematian jaringan (Lizawati, 2012). Sedangkan pada kalus miksploid dominan berwarna kuning. Warna kalus yang putih kekuningan dan mengkilat mencirikan kalus embriogenik. Perbedaan warna pada kalus menunjukkan tingkat perkembangan kalus yang berbeda-beda pula, hal ini dipengaruhi oleh konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan pada media tumbuh (Lizawati, 2012).

Dari kalus tetraploid yang diamati dibawah mikroskop (gambar 4.6 a), terdapat dua sel yang berbentuk bulat atau isodiametrik, yaitu sel bulat memiliki sitoplasma yang padat (gambar 4.6 panah a), dan sel bulat yang tidak memiliki sitoplasma padat (gambar 4.6, panah b). Sel isodiametrik dengan sitoplasma padat ini memiliki aktivitas pembelahan sel yang terus menerus (meristematik), hal tersebut sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Thorpe dan Murashige (1970) dalam (Purwianingsih dan Yuniarti, 2004) bahwa sel yang isodiametrik, dengan sitoplasma yang pekat serta perbandingan antara sitoplasma dan inti yang tinggi dan hampir

sama, memperlihatkan bahwa sel memiliki aktivitas mitosis dan bersifat meristematik. Selain itu, Silveira *et al.*, (2013) juga menambahkan bahwa sel kecil yang membulat dan isodiametrik yang mengandung nukleus yang menonjol dan sitoplasma yang padat yang mengindikasikan sel tersebut adalah sel meristematik yang mampu membentuk embrio somatik. Sel memanjang atau lonjong memiliki vakuola besar, dan sitoplasma tidak terkonsentrasi (Gambar 4.6, panah c). Sel-sel tersebut kemungkinan sel parenkim yang tidak bersifat embriogenik. Sel yang besar, vakuola besar, sel memanjang dengan nukleus kecil dan sitoplasma yang sedikit merupakan sel yang bersifat non-embriogenik (Silveira *et al.*, 2013). Sebaliknya, sel *clump* adalah sekelompok sel yang dikumpulkan menjadi satu kesatuan sehingga sulit untuk dihitung. Perlakuan, NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (E), menunjukkan tingkat proliferasi tertinggi daripada perlakuan lainnya, dilihat dari persentase sel berbentuk bulat lebih tinggi sekitar 17%. Akan tetapi, persentase sel lonjong atau memanjang lebih tinggi dibandingkan sel bulatnya yaitu sekitar 62%. Hal tersebut menunjukkan bahwa kalus masih bersifat non-

embriogenik. Selain persentase sel bulat yang tinggi, sel nekrosisnya juga tinggi diantara perlakuan yang lain. Hal tersebut sejalan dengan grafik pada gambar 4.3 yang menunjukkan bahwa Perlakuan, NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (E) memiliki tingkat warna kecoklatan yang tinggi. Pada kalus miksploid yang diamati dibawah mikroskop dominan berbentuk *clump* (gambar 4.6 b), hal ini karena tekstur kalus yang kompak sehingga antar selnya sulit terpisah. meskipun teksturnya kompak namun pada permukaannya berbentuk granular sehingga sel tersebut rata-rata berbentuk bulat yang berkumpul membentuk *clump* (gambar 4.6 panah f). Pada penelitian ini juga dilakukan pewarnaan pada kalus menggunakan pewarnaan acetocarmin. Gambar (4.9 dengan panah 2) menunjukkan terdapat sel yang dalam fase tetrad, fase dimana dalam satu sel, terdiri dari 4 ikatan kromatid pada satu sentromer. Fase tetrad memungkinkan kalus menjadi embriogenesis apabila dilakukan subkultur berulang dengan media yang optimal.

Pertambahan berat kalus disebabkan karena terjadi pembelahan dan pertambahan sel. Berat basah ini dikarenakan adanya kandungan air yang terdapat

dalam kalus (Ulva *et al.*, 2011). Sedangkan pada berat kalus kering kandungan air pada kalus telah menghilang, namun di dalam sel masih terdapat biomassa yang digunakan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder pada kalus (Anggraeni *et al.*, 2022). Pada penelitian ini, berat basah dan berat kering kalus miksploid terbesar terjadi pada perlakuan 0,1 mg/L NAA + 0,3 mg/L BAP + 0,003 mg/L TDZ (E), hal ini sesuai (Setiawati *et al.*, 2019) yang menyatakan bahwa pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh kombinasi auksin dan sitokinin yang ditambahkan dalam media serta interaksinya dengan ZPT endogen yang dihasilkan secara alami oleh jaringan eksplan. Sedangkan pada kalus tetraploid yang menunjukkan berat basah dan berat kering terbesar terjadi pada perlakuan 1 mg/L 2,4D + 1 mg/L Picloram (B). Hal ini diduga karena konsentrasi auksin dan sitokinin yang diberikan belum mampu merangsang sel kalus tetraploid untuk membelah. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh (Anggraeni *et al.*, 2022), pembelahan sel yang optimal dapat menyebabkan pertumbuhan kalus yang optimal sehingga menambah berat segar kalus. Hasil berat kalus yang berbeda-beda menandakan

bahwa sel pada tanaman memiliki respon kemampuan absorpsi air yang berbeda.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

1. Kelor diploid, tetraploid dan miksploid yang diberi auksin mampu menghasilkan kalus, dengan kelor miksploid perlakuan 1 mg/L Picloram lebih baik diantara yang lainnya dalam menginduksi kalus dari segi pembentukan kalus (90,0%) dan dan penutupan kalus (14,7%), dengan tipe kalus campuran dan warna putih kekuningan. Kelor tetraploid dan miksploid memiliki persentase bebas kontaminasi (steril) yang tinggi ($\geq 75\%$), dengan persentase hidup yang tinggi pula ($\geq 67\%$), sedangkan kelor diploid memiliki waktu kemunculan kalus yang lebih cepat (4-5 MST).
2. Pemberian perlakuan auksin dan sitokinin pada proliferasi kalus kelor menghasilkan pertumbuhan dan perkembangan kalus yang terjadi sangat lambat terutama pada kelor tetraploid di semua perlakuan, Sedangkan secara mikroskopis, kalus miksploid pada hampir semua perlakuan sudah memperlihatkan struktur granula (bulat).

B. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya dari peneliti yaitu:

1. Masih perlu penelitian lebih lanjut tentang pengaruh perbedaan ketiga ploidi tersebut dan pengaruh berbagai konsentrasi ZPT lainnya terhadap respon pembentukan kalus. Biak kalus masih harus disubkultur terus-menerus untuk mendapatkan kalus friable kompak dengan struktur bulat yang seragam.
2. Inisiasi dilakukan secara serempak dihari yang sama agar faktor yang berpengaruh antar perlakuan dapat homogen.

DAFTAR PUSTAKA

- Angelina, C., Swasti, Y.R. & Pranata, F.S. (2021). Peningkatan Nilai Gizi Produk Pangan dengan Penambahan Bubuk Daun Kelor (*Moringa oleifera*): REVIEW. *Jurnal Agroteknologi*, 15(01).
- Anggraeni, D. *et al.* (2022). Inisiasi Kalus Daun *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-Dichlorophenoxyatic Acid dan Benzyl Adenine. *Agrikultura*, 33(3).
- Apriliyani, R. dan Wahidah, B.F. (2021). Perbanyakkan anggrek *Dendrobium sp.* secara in vitro: Faktor-faktor keberhasilannya. *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, 1(2).
- Aryani Leksonowati, W. dan D.R. (2017). Induksi Biak Kalus dan Biak Suspensi Sel *Aquilaria malaccensis* Lam. [Induction of Callus Culture and Cell Suspension Culture of *Aquilaria malaccensis* Lam.]. *Berita Biologi*, 16(1).
- Bakar, M. *et al* (2016). Penggunaan BAP dan Kinetin pada Induksi Tunas dari Protocorm Anggrek *Dendrobium (Dendrobium Sp)* pada Kultur *In Vitro. cocus*, 7(4), pp. 911-914.

- Basri, A.H.H. (2016). Kajian Pemanfaatan Kultur Jaringan Dalam Perbanyakan Tanaman Bebas Virus. *Agrica Ekstensi*, 10(6), pp. 64–73.
- Bustami, M.U. (2011). Penggunaan 2,4-D untuk induksi kalus kacang tanah. *Media Litbang Sulteng*, 4(2), pp. 137–141.
- Citra, K. (2019) *Kandungan Nutrisi Tanaman Kelor*, Fakultas Farmasi Universitas Surabaya.
- Devendra, B., Prasad Talluri, V. & Srinivas, N. (2012). Callus induction and somatic embryogenesis of *Moringa oleifera* Lam an anti-radiation plant. *Journal of Agricultural Technology*, 8(6), pp. 1953–1963.
- Dewi, S., P. dan Dyah, S. (2010). Pengaruh Kinetin terhadap Inisiasi dan Pertumbuhan Tunas pada Perbanyakan Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) Secara In Vitro. *Agrin*, 14(1), pp. 29–36.
- Dwiyani, R. (2015) *Kultur Jaringan Tanaman*, *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- El-Banna, H. (2018). Callus Iduction and Differentiation for Value Medicinal Plant (*Moringa oleifera*) in Response to Different Explant Types and Growth Regulators. *Journal of Plant Production*, 9(4).
- Eoh, M. (2021). Kualitas dan Kuantitas Kalus pada Kultur Rumput Benggala (*Panicum maximum*) yang Diinduksi

- dengan Kombinasi Auksin dan Sitokinin. *Agrinimal Jurnal Ilmu Ternak dan Tanaman*, 9(1), pp. 27–35.
- Fauzi, R. (2021). Penggunaan Aloe vera Sebagai Alternatif ZPT Alami untuk Pertumbuhan Tanaman Kacang Hijau (*Vigna radiata*). *Tropical Bioscience Journal of Biological Science*, 1(2), pp. 27–36.
- Fauziyyah, D., Hardiyati, T. & Kamsinah (2012). Upaya Memacu Pembentukan Kalus Eksplan Embrio Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) dengan Pemberian Kombinasi 2.4-D dan Sukrosa secara Kultur In Vitro. *Jurnal Pembangunan Pedesaan*, 12, pp. 30–37.
- Gantait, S. dan Mahanta, M. (2021). Picloram-induced enhanced callus-mediated regeneration, acclimatization, and genetic clonality assessment of gerbera. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1).
- Gerszberg, A. dan Grzegorzcyk-Karolak, I. (2019). Influence of selected antibiotics on the tomato regeneration in in vitro cultures. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3).
- Gihan, M. *et al.* (2016). Regeneration of horseradish Tree (*Moringa oleifera* L.) Through Somatic Embryogenesis and Suspension Culture. *Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.)*, 12(1), pp. 89–96.

- Handayani, T. *et al.* (2021). Respon pertumbuhan kultur tunas kelor (*Moringa oleifera* Lam.) terhadap benziladenin dan modifikasi hara nitrogen. *J. Hort. Indonesia*, 12(1), pp. 59–68.
- Handayani, T. dan Witjaksono (2023). In Vitro Somatic Embryogenesis from Thin Cell Layers (TCLs) Explants of Shallot (*Allium cepa* L.). *AIP Conference Proceedings*, 2606 (January).
- Isnan, W. dan Nurhaedah (2017). Ragam Manfaat Tanaman Kelor (*Moringa oleifera* Lamk) Bagi Masyarakat. *Info Teknis EBONI*, 14(1), pp. 63–75.
- Iswahyudi, I., Ramadani, S.D. & Budiyo, A. (2021). Pendampingan Pembuatan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) Pada Kelompok Tani Palem Desa Sumedangan Kabupaten Pamekasan Madura. *JAST: Jurnal Aplikasi Sains dan Teknologi*, 4(2).
- Kartika, Y. dan Supriyanto, E.A. (2020). Pengaruh Macam Varietas dan Zat Pengatur Tumbuh Alami Terhadap Pertumbuhan Kalus Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Secara In Vitro. *Biofarm: Jurnal Ilmiah Pertanian*, 15(2).
- Khalida, A. dan Noli, Z.A. (2019). Induksi Kalus Anggrek Lilin (*Aerides odorata* Lour .) dengan Pemberian beberapa Callus Induction of *Aerides odorata* Lour . by Adding

- 2,4 Dichlorophenoxyacetic. 7(September), pp. 109–117.
- Kurnianingsih, R. *et al.* (2020). Pelatihan Teknik Dasar Kultur Jaringan Tumbuhan. *JMM (Jurnal Masyarakat Mandiri)*, 4(5).
- Kurniati, R., Purwito, A. & Marwoto, B. (2012). Induksi Kalus Tiga Kultivar Lili dari Petal Bunga pada Beberapa Jenis Media. *Jurnal Hortikultura Indonesia*, 3(1), pp. 17–23.
- Lestari, E.G. (2011). Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyakkan Tanaman melalui Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*, 7(1).
- Lizawati (2012). Callus 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).
- Mamo, M. dan Feyissa, T. (2019). In Vitro Regeneration of *Moringa oleifera* LAM., From Leaf Explants. *SINET: Ethiop. J. Sci*, 42(2).
- Manurung, B.H., Damanik, R.I. & Bayu, E.S. (2018). Kombinasi 2,4 D Dan BAP Untuk Induksi Kalus Embriogenik Beberapa Varietas Kedelai (*Glycine Max* (L.) Merrill) Pada Kondisi Hipoksia Secara In Vitro. *Jurnal Agroteknologi*, 6(1), pp. 86–92.

- Marhaeni, L. sutji (2021). Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Sebagai Sumber Pangan Fungsional dan Antioksidan. *Agrisia*, 13(2), pp. 40–53.
- Maulidia, Z.R.A. dan Fanata, W.I.D. (2019). Pengaruh Jenis Auksin Terhadap Pembentukan Kalus dan Daya Regenerasi tiga Varietas Padi Lokal. *Berkala ilmiah Pertanian*, 2(2), pp. 77–81.
- Muhammad Evan, N., Erlyta Vivi, P. & Wirdhatul, M. (2017). Induction of Somatic Embryogenesis *Moringa oleifera* Lam., With Addition of Various Concentration Naphtalene Acetic Acid (NAA) and Kinetin in Medium MS in-vitro. *UI Proceedings on Science and Technology*, 1, pp. 9–11.
- Munira, M. *et al.* (2021). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk) Berdasarkan Perbedaan Waktu Panen. *Indonesian Journal for Health Sciences*, 5(2).
- Najib, S.Z. dan Andriani, R. (2020). Pharmacological Activities of *Moringa Oleifera*. *Jurnal Info Kesehatan*, 10(1), pp. 231–238.
- Ningsih, R. *et al.* (2016). Induksi Kalus dan Regenerasi Tiga Genotipe Tomat (*Solanum lycopersicon* L.) melalui Kultur Antera. *Jurnal Hortikultura Indonesia*, 7(2), p. 75. Available at: <https://doi.org/10.29244/jhi.7.2.75->

82.

- Nurhabibah & Evi Julianita Harahap (2022). Pengaruh Panjang Stek Terhadap Pertumbuhan Bibit Kelor (*Moringa oleifera* L.) di Desa Kuta Blang, Kecamatan Sama Dua, Kabupaten Aceh Selatan. *Agrinula: Jurnal Agroteknologi dan Perkebunan*, 5(1), pp. 20–29.
- Perwita, M.H. (2019). Pemanfaatan Ekstrak Moringa Oleifera Sebagai Masker Organik Untuk Merawat Kesehatan Kulit Wajah. *Jurnal Keluarga Sehat Sejahtera*, 17(2), p. 2019.
- Purba, E.C. (2020). Kelor (*Moringa oleifera* Lam.): Pemanfaatan dan Bioaktivitas. *Pro-Life*, 7(1), pp. 1–12.
- Purba R.V., Hestin Yuswanti, R. & Nyoman Gede Astawa, I. (2017). Induksi Kalus Eksplan daun Tanaman Anggur (*Vitis vinifera* L.) dengan Aplikasi 2,4-D Secara in Vitro. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*, 6(2), pp. 218–228.
- Purwianingsih, W. dan Yuniarti, L. (2004). Anatomi Kalus dari Eksplan Daun *Catharanthus roseus* (L). G. Don (Tapak Dara). *Jurnal Pengajaran MIPA*, 5(1), pp. 19–29.
- Ray, S.S. dan Ali, N. (2017). Biotic Contamination and Possible Ways of Sterilization: A Review with Reference to Bamboo Micropropagation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60(December), pp. 1–12.
- Riastiwi, I. et al. (2018). *Moringa oleifera* Distribution in Java

- and Lesser Sunda Islands Attributed with Annual Rainfall. *Journal of Biology & Biology Education*, 10(3), pp. 613–621.
- Riastiwi, I., Prawestri, A.D. and Damayanto, I.P.G.P. (2023). Viability of *Moringa oleifera* seeds stored at different temperatures and recent status of *Moringa oleifera* collections in seed banks worldwide. 74, pp. 67–74.
- Ridwan dan Witjaksono (2020). Induction of autotetraploid moringa plant (*Moringa oleifera*) using oryzalin. *Biodiversitas*, 21(9), pp. 4086–4093. Available at: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210920>.
- Rudiyanto *et al.* (2023). In vitro Shoot Growth and Root Formation Enhancement of *Moringa oleifera* Lim., on DKW Medium Containing Cytokinins and Auxins. *AIP Conference Proceedings*.
- Setiawati, T. *et al.* (2019). Induksi Kalus Krisan (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) dengan Penambahan Berbagai Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). *Jurnal EduMatSains*, 3(2), pp. 119–132.
- Shank, L.P. *et al.* (2013). Peroxidase Activity in Native and Callus Culture of *Moringa Oleifera* Lam. *Journal of Medical and Bioengineering*, 2(3), pp. 163–167.
- Silalahi, M. (2020). Pemanfaatan Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam) sebagai Bahan Obat Tradisional dan Bahan

- Pangan. *Majalah Sainstekes*, 7(2), pp. 107–116.
- Silveira, V. *et al.* (2013). Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114(3), pp. 351–364.
- Silvina, F. dan Ningsih, W. (2021). Induksi Kalus Daun Binahong Merah (*Basella rubra* L.) Dengan Pemberian 2,4-D dan Kinetin. *Jurnal Agro*. 8(2), pp. 274–285.
- Sisharmini, A., Apriana, A. & Sustiprijatno, S. (2016). Induksi Kalus dan Regenerasi Beberapa Genotipe Gandum (*Triticum aestivum* L.) secara In Vitro. *Jurnal AgroBiogen*, 6(2).
- Tanjung, T.Y. (2021). Pengaruh Penggunaan ZPT Alami dan Buatan Terhadap Pertumbuhan Setek Tanaman Delima (*Punica granatum* L.). *Hortuscoler*, 2(01), pp. 6–13.
- Tuwo, M., Tambaru, E. & Marianty, N. (2022). Respon Pertumbuhan Biji Jeruk Keprok *Citrus reticulata* Blanco pada Beberapa Teknik Sterilisasi. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 13(2), pp. 32–39.
- Ulva, M. *et al.* (2011). Pertumbuhan Kalus Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Varietas Permata F1 dari Jenis Eksplan dan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda secara In Vitro. *Life Science*, 8(3), pp. 160–169.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Perbandingan Komposisi Media dasar MS
(Murashige Skoog, 1962) dan Media 60MS 3:1

Kategori komponen	Senyawa	Media (mg/L)	
		MS	60MS 3:1 NO ₃ : NH ₄ ⁺
Makro	NH ₄ NO ₃	1650	1200
	KNO ₃	1900	3030
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440
	KH ₂ PO ₄	170	170
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
	FeNaEDTA	36,7	36,7
Mikro MS	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	16,9
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
	H ₃ BO ₄	6,2	6,2
	KI	0,83	0,83
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
	Vitamin MS	Glycine	2
	Pyridoxine	0,5	0,5
	Thiammine HCl	0,1	0,1
	Nicotinic Acid	0,5	0,5
myoinositol gula	Myoinositol	100	100
	Gula	30000	30000

Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian



Gbr 1. Larutan stok



Gbr 2. Membuat media



Gbr 3. Mengukur pH



Gbr 4.
Melarutkan
antibiotic



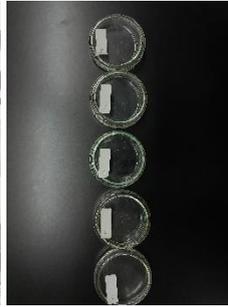
Gbr 5.
Penanaman
eksplan



Gbr 6. Subkultur
kalus



Gbr 7.
mikroskop



Gbr 8 sampel
untuk
pengamatan sel



Gbr 9. Sel bulat
yang
membentuk
clump



Gbr 10.
Pengamatan
dengan
mikroskop



Gbr 11. Kalus
yang dihasilkan



Gbr 12.
Pengamatan
secara langsung

Lampiran 3. Hasil analisis statistik kelor miksploid

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

Response: data2
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt         4  1.4241  0.35603   1.3033  0.333
Residuals  10  2.7317  0.27317

$Bulat[[1]][[2]]
[1] "All the treatment means are same so
dnt go for any multiple comparison test"

$Bulat[[1]][[3]]
[1] "R Square 0.343"

$Bulat[[1]][[4]]

          Shapiro-Wilk normality test

data:  model$residuals
W = 0.88975, p-value = 0.06648

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

$Bulat[[1]][[6]]
[1] "SEm 0.3018 , SEd 0.4267"

$Bulat[[1]][[7]]
$Bulat[[1]][[7]][[1]]
          MSerror Df      Mean      CV
          0.2731672 10 1.291103 40.4812

$Bulat[[1]][[7]][[2]]
          Table CriticalRange
```

```

2 3.151064      0.9508476
3 3.292833      0.9936270
4 3.376283      1.0188083
5 3.429664      1.0349164

$Bulat[[1]][[7]][[3]]
      data2 groups
K2 1.7852223      a
K3 1.5091076      a
K7 1.1349812      a
1D 1.0582872      a
K1 0.9679174      a

$lonjong
$lonjong[[1]]
$lonjong[[1]][[1]]
Analysis of Variance Table

Response: data2
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt      4 5.5250  1.38125   1.5598 0.2587
Residuals 10 8.8555  0.88555

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

$lonjong[[1]][[3]]
[1] "R Square 0.384"

$lonjong[[1]][[4]]

      Shapiro-Wilk normality test

data: model$residuals
W = 0.92695, p-value = 0.2456

```

```
$lonjong[[1]][[5]]
[1] "Normality assumption is not violated"
```

```
$lonjong[[1]][[6]]
[1] "SEm 0.5433 , SEd 0.7684"
```

```
$lonjong[[1]][[7]]
$lonjong[[1]][[7]][[1]]
      MSError Df      Mean      CV
1 0.8855455 10 2.232779 42.14632
```

```
$lonjong[[1]][[7]][[2]]
      Table CriticalRange
2 3.151064      1.711993
3 3.292833      1.789017
4 3.376283      1.834356
5 3.429664      1.863359
```

```
$lonjong[[1]][[7]][[3]]
      data2 groups
K2 3.248968      a
1D 2.434921      a
K3 2.253364      a
K7 1.625341      a
K1 1.601302      a
```

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

```
Response: data2
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt      4 0.6859 0.17147  0.8931 0.5029
Residuals 10 1.9200 0.19200
```

```
$clamp[[1]][[2]]
```

```

[1] "All the treatment means are same so
dont go for any multiple comparison test"

$clamp[[1]][[3]]
[1] "R Square 0.263"

$clamp[[1]][[4]]

      Shapiro-Wilk normality test

data:  model$residuals
W = 0.972, p-value = 0.8865

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

$clamp[[1]][[6]]
[1] "SEm 0.253 , SEd 0.3578"

$clamp[[1]][[7]]
$clamp[[1]][[7]][[1]]
      MSError Df      Mean      CV
      0.1919999 10 2.731228 16.04326

$clamp[[1]][[7]][[2]]
      Table CriticalRange
2 3.151064      0.7971629
3 3.292833      0.8330280
4 3.376283      0.8541392
5 3.429664      0.8676438

$clamp[[1]][[7]][[3]]
      data2 groups
1D 3.090390      a
K3 2.738171      a
K2 2.735508      a
K1 2.670491      a
K7 2.421581      a

```

```

$nekrosis
$nekrosis[[1]]
$nekrosis[[1]][[1]]
Analysis of Variance Table

Response: data2
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt      4 0.48921 0.122301  1.3382 0.3216
Residuals 10 0.91396 0.091396

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

$nekrosis[[1]][[3]]
[1] "R Square 0.349"

$nekrosis[[1]][[4]]

      Shapiro-Wilk normality test

data:  model$residuals
W = 0.91443, p-value = 0.1583

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

$nekrosis[[1]][[6]]
[1] "SEm 0.1745 , SEd 0.2468"

$nekrosis[[1]][[7]]
$nekrosis[[1]][[7]][[1]]
      MSError Df      Mean      CV
0.09139554 10 1.077554 28.05585

```

```
$nekrosis[[1]][[7]][[2]]
  Table CriticalRange
2 3.151064      0.5499955
3 3.292833      0.5747402
4 3.376283      0.5893058
5 3.429664      0.5986231
```

```
$nekrosis[[1]][[7]][[3]]
  data2 groups
K7 1.2249897      a
K3 1.2197284      a
1D 1.2055311      a
K1 0.9624352      a
K2 0.7750856      a
```

Lampiran 4. Hasil analisis statistik kelor tetraploid

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

Response: data2
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt     4  49.118   12.280   0.7594 0.5747
Residuals 10 161.694   16.169

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

$Bulat[[1]][[3]]
[1] "R Square 0.233"

$Bulat[[1]][[4]]

      Shapiro-Wilk normality test

data:  model$residuals
W = 0.93165, p-value = 0.2888

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

$Bulat[[1]][[6]]
[1] "SEm 2.3216 , SEd 3.2832"

$Bulat[[1]][[7]]
$Bulat[[1]][[7]][[1]]
      MSerror Df  Mean      CV
      16.16941 10 6.556 61.33497

$Bulat[[1]][[7]][[2]]
      Table CriticalRange
```

```

2 3.151064      7.315496
3 3.292833      7.644626
4 3.376283      7.838362
5 3.429664      7.962292

$Bulat[[1]][[7]][[3]]
      data2 groups
K7 9.446667      a
K2 7.886667      a
1D 5.556667      a
K1 5.113333      a
K3 4.776667      a

$Lonjong
$Lonjong[[1]]
$Lonjong[[1]][[1]]
Analysis of Variance Table

Response: data2
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt      4 2385.9   596.47   3.4039 0.05286
.
Residuals 10 1752.3   175.23
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*'
0.05 '.' 0.1 ' ' 1

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

$Lonjong[[1]][[3]]
[1] "R Square 0.577"

$Lonjong[[1]][[4]]

      Shapiro-Wilk normality test

```

```

data: model$residuals
W = 0.93825, p-value = 0.3608

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

$Lonjong[[1]][[6]]
[1] "SEm 7.6427 , SEd 10.8084"

$Lonjong[[1]][[7]]
$Lonjong[[1]][[7]][[1]]
      MSError Df      Mean      CV
      175.2316 10  46.088 28.72225

$Lonjong[[1]][[7]][[2]]
      Table CriticalRange
2  3.151064      24.08257
3  3.292833      25.16607
4  3.376283      25.80385
5  3.429664      26.21182

$Lonjong[[1]][[7]][[3]]
      data2 groups
1D  69.55667      a
K2  45.33333      b
K3  45.22333      b
K1  36.66333      b
K7  33.66333      b

$Klam
$Klam[[1]]
$Klam[[1]][[1]]
Analysis of Variance Table

Response: data2
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt    4  1.233  0.3084  0.0525  0.994

```

```

Residuals 10 58.726 5.8726

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

$Klam[[1]][[3]]
[1] "R Square 0.021"

$Klam[[1]][[4]]

        Shapiro-Wilk normality test

data:  model$residuals
W = 0.97039, p-value = 0.8638

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

$Klam[[1]][[6]]
[1] "SEm 1.3991 , SEd 1.9787"

$Klam[[1]][[7]]
$Klam[[1]][[7]][[1]]
      MSerror Df      Mean      CV
      5.8726 10 6.510667 37.22115

$Klam[[1]][[7]][[2]]
      Table CriticalRange
2 3.151064      4.408713
3 3.292833      4.607065
4 3.376283      4.723821
5 3.429664      4.798508

$Klam[[1]][[7]][[3]]
      data2 groups
K7 7.000000      a
1D 6.666667      a

```

```

K1 6.333333      a
K3 6.333333      a
K2 6.220000      a

$Nekrosis
$Nekrosis[[1]]
$Nekrosis[[1]][[1]]
Analysis of Variance Table

Response: data2
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
trt      4  16.214   4.0535   2.0203 0.1674
Residuals 10  20.064   2.0064

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

$Nekrosis[[1]][[3]]
[1] "R Square 0.447"

$Nekrosis[[1]][[4]]

      Shapiro-Wilk normality test

data:  model$residuals
W = 0.95738, p-value = 0.6469

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

$Nekrosis[[1]][[6]]
[1] "SEm 0.8178 , SEd 1.1565"

$Nekrosis[[1]][[7]]
$Nekrosis[[1]][[7]][[1]]
      MSError Df      Mean      CV

```

2.00638 10 2.911333 48.65356

\$Nekrosis[[1]][[7]][[2]]

Table CriticalRange

2	3.151064	2.576934
3	3.292833	2.692872
4	3.376283	2.761117
5	3.429664	2.804772

\$Nekrosis[[1]][[7]][[3]]

data2 groups

K7	4.330000	a
K1	3.556667	a
K3	3.223333	a
K2	1.890000	a
1D	1.556667	a

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

1. Nama Lengkap : Dian Putri Rahmawati
2. Tempat dan Tanggal lahir : Grobogan, 21 Oktober 2001
3. Alamat : Desa Rejosari Rt. 01 Rw. 17
kec. Karangawen, kab.
Demak
4. HP : 085727105450
5. Email : dianputri66778@gmail.com

B. Riwayat Pendidikan

1. TK Setyo Lestari
2. SDN Rejosari 3
3. SMP Negeri 1 karangawen
4. SMA Negeri 2 Mranggen

C. Karya Ilmiah

1. The Process of making nata de salacca from honay salak fruit (*Salacca edulis* Reinw) with the application of biotechnology techniques - article review.
2. Kajian jenis-jenis gulma yang berpotensi sebagai obat herbal bagi Masyarakat.