

LAPORAN AKHIR
PENELITIAN FUNDAMENTAL
TAHUN ANGGARAN 2009



UPAYA PERBANYAKAN TANAMAN PENGHASIL GAHARU (*Aquilaria malacensis* L) SECARA *IN VITRO*

Oleh:
Dr. Ir. Gustian, MS

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, Tahun Anggaran 2009. Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Nomor: 126a/H.16/PL/HB.PF/IV/2009, Tanggal 20 April 2009

UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
November 2009

**HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR PENELITIAN FUNDAMENTAL**

1. Judul Penelitian : Upaya Perbanyak Tanaman Penghasil Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) secara *in vitro*
- 2.1. Data Pribadi
- a. Nama Lengkap : Dr. Ir. Gustian, MS
 - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 - c. NIP/Golongan : 131 641 792/IVa
 - d. Strata/Jab.Fungsional : Lektor Kepala
 - e. Jabatan Struktural : -
 - f. Fakultas/Jurusan : Pertanian/Budidaya Pertanian
 - g. Bidang Ilmu : Pertanian
 - h. Alamat Kantor : Kampus Unand Limau Manis Padang
 - i. Telepon/Faks/E-mail : (0751)72776,72701/72702
 - h. Alamat : Kampus Universitas Andalas Limau Mmanis Padang
 - j. Telepon/Faks : (0751) 7052408
- 2.2. Mata Kuliah Yang Diampu dan Jumlah sks
- a. Mata Kuliah : Gentika Dasar 3 sks
 - b. Mata Kuliah : Pemuliaan Tanaman 3 sks
 - c. Mata Kuliah : Kultur Jaringan 3 sks
 - d. Mata Kuliah : Bioteknologi 3 sks
- 2.3. Penelitian Terakhir
- a. Judul Penelitian I : Induksi kalus tanaman penghasil gaharu secara in vitro. Peneliiian dana SP4.2004.
 - b. Judul Penelitian II : Kompatibilitas Interaksi Jamur Patogen, Stressing Agens dengan Tanaman Penghasil Gaharu dalam Upaya Meningkatkan Kualitas Gubal Gaharu. Hibah Bersaing Tahun ke-1. 2007
 - c. Judul Penelitian III : Kompatibilitas Interaksi Jamur Patogen, Stressing Agens dengan Tanaman Penghasil Gaharu dalam Upaya Meningkatkan Kualitas Gubal Gaharu. Hibah Bersaing Tahun ke-2. 2008
 - d. Judul Penelitian IV : Kompatibilitas Interaksi Jamur Patogen, Stressing Agens dengan Tanaman Penghasil Gaharu dalam Upaya Meningkatkan Kualitas Gubal Gaharu. Hibah Bersaing Tahun ke-3. 2009
3. Lokasi Penelitian : Laboratorium
4. Jangka Waktu Penelitian : 1 Tahun
5. Pembiayaan
- | | | |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|
| | : Biaya diajukan ke Dikti | Biaya dari Instansi Lain |
| - Biaya Tahun ke-1 | Rp. 25,250,000,- | Rp. - |
| Total | Rp. 25,250,000,- | Rp.- |

Mengetahui,
Dekan Fakultas Pertanian,



Padang, 16 November 2009
Ketua Peneliti,

Dr. Ir. Gustian, MS
NIP. 131 641 792

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian

Dr. Ir. Syafrimen Yasin, MS, MSc
NIP. 131 647 299

Upaya Perbanyak Tanaman Penghasil Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk)
secara *in vitro*

(Plant Propagation Agarwood (*Aquilaria malaccensis* Lamk) to *in Vitro*)

Gustian *)

ABSTRAK

Experiment to investigate (Plant Propagation Agarwood (*Aquilaria malaccensis* Lamk) by Effort Conservation Plasma Nutfah to *in Vitro*) was done in February to November 2009 at tissue cultur laboratory of Agriculture Faculty, University Andalas Padang and at tissue cultur laboratory of Mapeni Padang.

The experiment consist of tri tree stages, The first stage about give eksplant and Medium for induction callus, seven (9) level consist of : 1).Shootlet+Medium MS; 2). Shootlet+ Medium WPM; 3). Shootlet+Medium B5; 4). Ibu tulang daun +Medium MS; 5). Ibu tulang daun +Medium WPM; 6). Ibu tulang daun+Media B5; 7) Petiole+Medium MS; 8). Petiole + Medium WPM and 9). petiole+Mediium B5.

The second stage about give combination concentration 2,4-D and BAP for regeneration callus,seven (9) level consist of : 1). 0,00 ppm 2,4-D + 0,00 ppm BAP; 2) 2,50 ppm 2,4-D + 0,00 ppm BAP; 3). 2,50 ppm 2,4-D + 1,50 ppm BAP; 4). 2,50 ppm 2,4-D + 3,00 ppm BAP(K3); 5).5,00 ppm 2,4-D + 0,00 ppm BAP (K4); 6).5,00 ppm 2,4-D + 1,50 ppm BAP; 7). 5,00 ppm 2,4-D + 3,00 ppm BAP; 8) 7,50 ppm 2,4-D + 0,00 ppm BAP dan 9). 7,50 ppm 2,4-D + 1,50 ppm BAP.

The third stage about give combination concentration NAA,BAP and Kinetin for regeneration callus,seven (10) level consist of : 1).0,00 ppm NAA+0,00 ppm Bap + 0,00ppm Kinetin; 2)..0,50 ppm NAA + 1,50 ppm BAP+ 0,10 ppm Kinetin; 3).0,50 ppm NAA + 3,00 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin ; 4). 0,50 ppm NAA + 4,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin; 5). 1,00 ppm NAA + 1,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin; 6). 1,00 ppm NAA + 3,00 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin ; 7). 1,00 ppm NAA + 4,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin ;8). 1,50 ppm NAA + 1,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin; 9). 1,50 ppm NAA + 3,00 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin and 10). 1,50 ppm NAA + 4,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (R9),The experiment used Completely Ramdomized Design (CRD) with four (replication).

Explant Ibu tulang daun and Medium MS were superior result than any another treatment the support growth to get explants life, callus percentage callus, callus formation, less browning for first stage. Combination Concentration (2,50 ppm 2,4-D + 3,00 ppm BAP) were superier result than any another treatment the support growth to get explant life, percentage regeneration callus formatted shootlet for secallus formation , for second stage. Experiment third stage can not observated because Eahrthquake.

Key Words : Explant, Induction callus,Regeneration callus, Callus, Shootlet, 2,4-D, Auxin NAA, Cytokinin BAP, Kinetin and *in vitro*.

*) Lectures Agriculture Faculty Andalas University, Padang.

1. Pendahuluan

Populasi tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malacensis*) di Indonesia umumnya dan Sumatera Barat khususnya saat ini semakin mengkhawatirkan, mengingat pemburuan gubal gaharu di hutan masih dilakukan tetapi sedikit sekali masyarakat berusaha membudidayakan tanaman ini. Untuk mendapatkan tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malacensis*) sama dengan induknya, seragam dalam jumlah banyak dan tidak tergantung pada musim maka teknik perbanyakan secara *in vitro* merupakan salah satu mengatasi masalah. Pengetahuan tentang upaya perbanyakan tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malacensis*) secara *in vitro* akan sangat bermanfaat dalam pengembangan strategi pemuliaan tanaman penghasil gaharu secara terpadu, mengingat dengan teknik kultur *in vitro* dapat memperbanyak bibit dalam jumlah banyak, seragam, dalam waktu yang singkat.

Tanaman penghasil gaharu jenis *Aquilaria malacensis* termasuk tanaman yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan saat ini terancam punah, mengingat selama ini masyarakat berupaya memburu dan menebangnya tanpa ada usaha untuk membudidayakannya. Permasalahan diatas dapat diatasi dengan pelestarian plasma nutfah tanaman ini melalui teknik kultur *In Vitro*. Kultur jaringan dapat dijadikan salah satu alternatif untuk menghasilkan bibit gaharu bila dibandingkan dengan perbanyakan vegetatif lain seperti (stek, cabutan dan sambung) dimana melalui perbanyakan dengan kultur *in vitro* dapat menyediakan bibit dalam jumlah yang cukup banyak, seragam, waktu relatif singkat, bahkan bukan tidak mungkin dapat meningkatkan kualitas tanaman, tidak tergantung pada musim, bebas dari penyakit sistemik serta dapat dijadikan sebagai sumber pelestarian plasma nutfah.

Perbanyakan tanaman gaharu biasanya dilakukan secara generatif dengan menggunakan biji tetapi dalam pengembangannya di alam mengalami kendala karena tanaman gaharu baru berbunga dan berbuah umur 7 - 10 tahun, sedangkan umur 5 tahun, petani/penebang sudah mulai memanen tanaman ini dan bila ada pohon yang telah berbuah maka buahnya yang telah masak ada kemungkinan di makan oleh burung sehingga ada yang diterbangkan burung ketempat lain ,dan ada pula yang jatuh ke bawah pohon, disamping itu daya kecambah benih gaharu relative rendah hanya sekitar 47 % ; sedangkan secara vegetatif dengan stek dan cangkok membutuhkan waktu yang lama untuk menghasilkan bibit dalam jumlah banyak, pertumbuhan bibit tidak seragam, tergantung musim, tidak bebas penyakit sistemik, dan persentase tumbuhnya hanya sekitar 55 %.

Perbanyakan tanaman gaharu melalui teknik kultur jaringan merupakan langkah awal menuju kepada kegiatan pemuliaan tanaman gaharu yang lebih cepat, seragam, dalam jumlah banyak, berkualitas lebih baik, dan yang utama dapat dijadikan sumber plasma nutfah tanaman gaharu dibandingkan dengan cara konvensional dengan menggunakan biji maupun stek ataupun cangkok.

Selanjutnya penelitian perbanyakan tanaman gaharu terutama spesies *Aquilaria malaccensis* secara *in vitro* di Indonesia sampai saat ini belum berkembang apalagi di daerah Sumatera Barat, penelitian tentang ini sampai saat ini belum ada yang melaporkannya.

Perbanyakan tanaman gaharu secara *in vitro* sangat ditentukan oleh bahan asal eksplan, media, zat pengatur tumbuh, dan lingkungan tumbuh. Bahan tanam (eksplan) yang diambil dari pohon induk harus memiliki kriteria, antara lain : sehat, kena sinar matahari, bagian yang meristematis.

Media tanam yang dibuat disesuaikan dengan tujuannya, apabila kita ingin membentuk kalus maka sebaiknya kita menggunakan media cair, dan apabila untuk perbanyakan biasa kita menggunakan media padat, selanjutnya bila yang dikulturkan tanaman berkayu seperti tanaman gaharu maka sebaiknya menggunakan media WPM.

Zat pengatur tumbuh yang paling penting diperhatikan dalam kultur jaringan adalah keseimbangan penggunaan konsentrasinya. Keseimbangan konsentrasi Auksin dan Sitokinin dalam media dan eksplan dapat mendorong pertumbuhan dan perkembangan eksplan membentuk plantlet. Konsentrasi Auksin lebih tinggi dari Sitokinin maka mendorong eksplan membentuk kalus dan akar (rootlet), tetapi apabila konsentrasi Sitokinin lebih tinggi dari Auksin maka akan mendorong eksplan membentuk tunas (shootlet).

Supaya teknik perbanyakan gaharu secara *in vitro* dapat digunakan secara baku, untuk memperoleh bibit gaharu yang berkualitas, seragam, dalam waktu relatif singkat, dan sebagai sumber plasma nutfah maka terlebih dahulu ditemukan komposisi Zat pengatur tumbuh yang tepat. Berdasarkan hal di atas maka perlu dilakukan penelitian tentang "Upaya perbanyakan tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malaccensis* L.) secara *in vitro*".

Penelitian dilakukan untuk mengkaji metode kultur yang baku untuk melestarikan tanaman penghasil gaharu secara *in vitro*. Kultur *in vitro* adalah perbanyakan tanaman secara vegetatif buatan yang dimanfaatkan untuk membantu program pemuliaan tanaman, yang salah satunya adalah perbanyakan tanaman penghasil gaharu sehingga mampu mengatasi kelangkaan suatu tanaman.

Sasaran yang ingin dicapai adalah mendapatkan media kultur dan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tepat guna mendorong pertumbuhan dan perkembangan eksplan tanaman penghasil gaharu membentuk kalus, tunas, dan plantlet yang dapat dijadikan sumber plasma nutfah nantinya.

Sasaran akhirnya adalah untuk mendapatkan bibit tanaman penghasil gaharu unggul dengan sistem perakaran yang baik dan tumbuh cepat, sehingga dapat mengatasi masalah terancam punahnya tanaman ini.

2. Metode Penelitian

Percobaan ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Mapeni Indarung Padang dan jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang, dan percobaan ini dimulai dari bulan Mei hingga Desember 2009.

Percobaan disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 kali ulangan. Percobaan terdiri dari 3 tahap : tahap pertama mengetahui respon beberapa eksplan pada berbagai media kultur yang optimal (EM), yang terdiri dari 9 taraf kombinasi perlakuan, yaitu : 1).Tunas+Media MS (EM1); 2). Tunas+Media WPM (EM2) ; 3). Tunas+Media B5 (EM3); 4). Ibu tulang daun +Media MS(EM4); 5). Ibu tulang daun +Media WPM(EM5); Ibu tulang daun+Media B5 (EM6); Petiole+Media MS(EM7); Petiole + Media WPM (EM8) dan petiole+Media B5 (EM9),sehingga seluruhnya ada $9 \times 3 = 27$ satuan percobaan . Setiap satuan percobaan terdiri dari 10 botol kultur, sehingga diperoleh 270 botol kultur.

Percobaan tahap kedua merupakan tahap untuk mendapatkan kombinasi konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh yang tepat (K), merupakan percobaan lanjutan dari percobaan sebelumnya dimana jenis eksplan yang memiliki respon baik pada media kultur yang tepat digunakan pada percobaan ini. Percobaan ini terdiri dari 10 taraf kombinasi perlakuan, yaitu : 1) tanpa ZPT (K0); 2). 2,50 ppm 2,4-D + 0,00 ppm BAP (K1); 3). 2,50 ppm 2,4-D + 1,50 ppm BAP(K2); 4). 2,50 ppm 2,4-D + 3,00 ppm BAP(K3); 5).5,00 ppm 2,4-D + 0,00 ppm BAP (K4); 6).5,00 ppm 2,4-D + 1,50 ppm BAP (K5); 7). 5,00 ppm 2,4-D + 3,00 ppm BAP (K6); 8) 7,50 ppm 2,4-D + 0,00 ppm BAP (K7); 9). 7,50 ppm 2,4-D + 1,50 ppm BAP(K8) dan 7,50 ppm 2,4-D + 3,00 ppm BAP (K9), sehingga seluruhnya ada $3 \times 10 = 30$ satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri dari 7 botol kultur, sehingga diperoleh 210 botol kultur.

Selanjutnya percobaan ketiga merupakan tahap regenerasi kalus dan tunas membentuk plantlet (R) dimana kalus dan tunas yang terbentuk pada percobaan tahap kedua diregenerasi pada percobaan tahap ketiga. Percobaan ini terdiri dari 9 taraf kombinasi perlakuan, yaitu: 1). Tanpa ZPT (R0); 2).0,50 ppm NAA + 1,50 ppm BAP+ 0,10 ppm Kinetin(R1);3).0,50 ppm NAA + 3,00 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (R2); 4). 0,50 ppm NAA + 4,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (R3); 5). 1,00 ppm NAA + 1,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (R4); 6). 1,00 ppm NAA + 3,00 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (R5); 7). 1,00 ppm NAA + 4,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (R6);8). 1,50 ppm NAA + 1,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (R7); 9). 1,50 ppm NAA + 3,00 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (R8) dan 10). 1,50 ppm NAA + 4,50 ppm BAP + 0,10 ppm Kinetin (R9), sehingga seluruhnya ada $3 \times 10 = 30$ satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri dari 7 botol kultur, sehingga diperoleh 210 botol kultur.

Data hasil pengamatan dianalisis dengan sidik ragam, dan bagi yang berbeda nyata dilanjutkan uji Duncan Multiple New Range Test (DMNRT) pada taraf nyata 5 %

Pengamatan tahap pertama dimulai 1 (satu) minggu sampai 5 minggu setelah pengkulturan eksplan, yang meliputi : a. Persentase eksplan yang hidup; b. Saat eksplan membentuk kalus; c. Persentase eksplan yang membentuk kalus; d. Struktur kalus; e. Warna kalus; f. Saat eksplan membentuk tunas; g. Persentase eksplan yang membentuk shootlet; h. Jumlah tunas yang terbentuk.

Peubah yang diamati pada percobaan tahap kedua ini dimulai 1 (satu) minggu sampai 5 minggu setelah tunas dipindahkan pada media multiplikasi, yang meliputi : a. Persentase kalus yang hidup; b. Saat kalus beregenerasi; c. Persentase kalus beregenerasi; d. Struktur kalus; e. Warna kalus; f. Saat kalus membentuk tunas; g. Persentase eksplan yang membentuk shootlet

Peubah yang diamati pada percobaan tahap ketiga mendapatkan kombinasi konsentrasi ZPT yang optimal guna mendorong kalus, shootlet beregenerasi membentuk plantlet meliputi : a. Persentase kalus dan shootlet yang hidup; b. Persentase kalus dan shootlet membentuk plantlet; c. Jumlah plantlet yang terbentuk; d. Tinggi plantlet

3. Hasil Dan Pembahasan

3.1. Percobaan Tahap Pertama

3.1.1. Persentase Eksplan yang Hidup

Hasil pengamatan persentase eksplan hidup selama 5 minggu akibat perlakuan berbagai media kultur dan jenis eksplan tanaman gaharu setelah dianalisis secara statistik, menunjukkan pengaruh berbeda nyata setelah dilanjutkan dengan uji DMNRT pada taraf 5 % yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase eksplan hidup dan saat eksplan membentuk kalus akibat pengaruh berbagai media kultur pada tiga jenis eksplan tanaman gaharu (*Aquilaria malacensis* Lamk)

Perlakuan	Persentase eskplan hidup(%)	Saat eksplan membentuk kalus (hari)
Tunas + MS (K1)	80,00 ab	15,00 f
Tunas + WPM (K2)	80,00 abc	20,67 d
Tunas + B5 (K3)	65,00 d	25,00 b
Ibu tulang daun + MS (K4)	95,00 a	12,67 h
Ibu tulang daun + WPM (K5)	85,00 ab	14,33 g
Ibu tulang daun + B5 (K6)	70,00 d	17,00 f
Petiole + MS (K7)	80,00 ab	18,67 e
Petiole + WPM (K8)	70,00 bcd	22,67 c
Petiole + B5 (K9)	55,00 e	25,00 a
KK (%) =	8,96	5,16

Angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama berbeda tidak nyata menurut DMNRT pada taraf 5%

Tabel 1 memperlihatkan bahwa persentase eksplan yang hidup tertinggi dijumpai pada eksplan ibu tulang daun yang dikulturkan pada media MS(K4) berbeda nyata dengan eskplan pucuk dan Ibu tulang daun, petiole yang dikulturkan pada media B5, dan

eksplan ibu tulang daun, eksplan petiole yang dikulturkan pada media WPM tetapi berbeda tidak nyata pada eksplan pucuk dan petiole yang dikulturkan di media MS, dan eksplan pucuk dan ibu tulang daun yang dikulturkan pada media WPM.

Hal ini disebabkan karena jenis eksplan yang dikulturkan pada berbagai media kultur mampu memberikan respon untuk mempertahankan kehidupan eksplan. Kemampuan hidup eksplan pada kultur *in vitro* sangat tergantung dari jenis eksplan itu sendiri, jenis dan komposisi media yang diberikan serta kandungan zat pengatur tumbuh.

Jenis dan komposisi media sangat mempengaruhi besarnya daya tahan eksplan untuk hidup pada media tersebut, sedangkan zat pengatur tumbuh Auksin dan Sitokinin endogen yang terdapat pada eksplan berpengaruh terhadap besarnya penyerapan zat makanan yang tersedia dalam media kultur sehingga eksplan dapat bertahan hidup lebih lama (George dan Sherrington, 1984), dan bila pertumbuhan eksplan baik dapat meningkatkan daya tahan hidup eksplan (Gunawan, 1988).

Bagian tanaman yang banyak mengandung persediaan makanan serta bahan lain seperti ZPT endogen untuk pertumbuhan akan lebih mudah untuk beregenerasi dibanding bagian tanaman yang kurang mengandung persediaan makanan, namun makin besar ukuran eksplan bervariasi tergantung dari tanamannya, umumnya ukuran eksplan yang baik berkisar antara 0,5 – 1,0 cm, apabila lebih kecil maka daya tahannya terhadap stress akibat proses pengkulturan akan semakin berkurang (Katuuk, 1989).

Perimbangan konsentrasi zat pengatur tumbuh Auksin dan Sitokinin dalam jaringan eksplan dapat meningkatkan kemampuan hidup, pertumbuhan dan perkembangan jaringan eksplan (Satria, Dwipa, dan Jamsari, 1999)

Unsur hara makro mutlak dibutuhkan oleh eksplan untuk pertumbuhan. Unsur hara makro yang utama dalam kultur *in vitro* adalah N,P,K,Ca,Mg, dan S serta media yang baik bagi tanaman adalah adanya keseimbangan anatara ion-ion unsur makro tersebut. Unsur hara makro umumnya dibutuhkan dalam jumlah milimol (George dan Sherrington, 1984).

Selain itu juga perlu ditambahkan sukrosa sebagai sumber energi dan karbon. Konsentrasi sukrosa pada media antara 2 % sampai 3 % tergantung dari eksplan yang digunakan (Gamborg dan Shyluk, 1981; Gunawan, 1988). Vitamin sering digunakan dalam media kultur *in vitro*, pada konsentrasi tertentu dapat menunjang perkembangan sel (Hendaryono, dan Wijayani, 1994).

3.1.2. Saat Eksplan membentuk Kalus

Hasil pengamatan saat eksplan membentuk kalus akibat perlakuan berbagai media kultur dan jenis eksplan tanaman gaharu setelah dianalisis secara statistic, sidik ragamnya disajikan pada Lampiran 1, menunjukkan pengaruh berbeda nyata setelah dilanjutkan dengan uji DMNRT pada taraf 5 % yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 memperlihatkan bahwa saat eksplan membentuk kalus tercepat dijumpai pada eksplan ibu tulang daun yang dikulturkan pada media MS(K4) berbeda nyata dengan perlakuan lainnya.

Respon perubahan eksplan ibu tulang daun setelah dikulturkan pada media MS dapat dikatakan cukup cepat. Pada mulanya, eksplan berubah dari putih kekuningan menjadi coklat pada bagian bekas pemotongan dan menjadi kehijauan pada bagian yang tidak mengalami pelukaan. Pada pengamatan 1 minggu setelah kultur, eksplan membengkak kemudian ujung eksplan merekah, dan 1 minggu kemudian terbentuk kalus. Sesuai penelitian Priyono et al. (2000), eksplan dapat membentuk kalus pada beberapa minggu setelah penaburan. Terbentuknya kalus disebabkan adanya rangsang luka (Fowler, 1983). Rangsang tersebut menyebabkan keseimbangan pada dinding sel berubah arah, sebagian protoplas mengalir ke luar sehingga mulai terbentuk kalus.

Untuk pembentukan kalus, tergantung pada jenis eksplan yang digunakan, komposisi media kultur, dan kandungan hormone auksin endogen dan eksogen dimana sebaiknya dipakai kadar auksin tinggi (Suryowinoto, 1985 dalam Ambarwati, 1987).

Menurut Priyono et al. (2000) pada kultur jaringan bakal buah pisang, bakal buah mampu beregenerasi tanpa tambahan auksin dari luar, diduga dalam buah pisang telah terkandung auksin endogen yang cukup untuk memobilisasi sel-selnya guna membentuk individu-individu baru.

3.1.3. Persentase eksplan yang membentuk kalus

Hasil pengamatan persentase eksplan membentuk kalus selama 5 minggu akibat perlakuan berbagai media kultur dan jenis eksplan tanaman gaharu setelah dianalisis secara statistik, menunjukkan pengaruh berbeda nyata setelah dilanjutkan dengan uji DMNRT pada taraf 5 % yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase eksplan membentuk kalus, struktur kalus dan warna kalus akibat pengaruh berbagai media kultur pada tiga jenis eksplan tanaman gaharu (*Aquilaria malacensis* Lamk)

Perlakuan	Persentase eskplan membentuk kalus	Struktur kalus	Warna Kalus
Tunas pucuk + MS (K1)	30,67 ab	remah	Putih kekuningan
Tunas pucuk + WPM (K2)	26,67 bc	remah dan kompak	Putih kekuningan
Tunas pucuk + B5 (K3)	20,67 cd	remah dan kompak	Putih kecoklatan
<i>Ibu tulang daun + MS (K4)</i>	<i>56,33 a</i>	<i>remah</i>	<i>Putih kehijauan</i>
<i>Ibu tulang daun + WPM (K5)</i>	<i>40,00 a</i>	<i>remah dan kompak</i>	<i>Putih kehijauan</i>
<i>Ibu tulang daun + B5 (K6)</i>	<i>25,33 ab</i>	<i>remah dan kompak</i>	<i>Putih kehijauan</i>
Petiole + MS (K7)	25,67 bc	Kompak	Putih kekuningan
Petiole + WPM (K8)	13,67 de	Kompak	Putih kecoklatan
Petiole + B5 (K9)	10,33 e	remah dan kompak	Putih kecoklatan
KK (%) =	23,05		

Angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama berbeda tidak nyata menurut DMNRT pada taraf 5%

Tabel 2 memperlihatkan bahwa persentase eksplan membentuk kalus tertinggi dijumpai pada eksplan ibu tulang daun yang dikulturkan pada media MS(K4) berbeda nyata dengan eksplan pucuk yang dikulturkan pada media WPM dan media B5, dan, eksplan petiole yang dikulturkan pada media MS, media WPM dan media B5 tetapi berbeda tidak nyata pada eksplan pucuk yang dikulturkan di media MS, dan eksplan ibu tulang daun yang dikulturkan pada media WPM dan media B5.

Eksplan ibu tulang daun yang dikulturkan pada media MS telah menghasilkan persentase eksplan membentuk kalus tertinggi yaitu sebesar 50,00%. Hal ini memperlihatkan bahwa adanya respon yang kuat dari ibu tulang daun dalam menyerap unsure hara yang ada pada media MS dan hormon endogen yang terdapat pada eksplan ibu tulang daun sehingga merangsang perkembangan jaringan untuk membentuk kalus. Selain itu terbentuknya kalus yang tinggi pada jenis eksplan ini disebabkan ibu tulang daun mempunyai banyak jaringan pengangkut yang berfungsi sebagai jalur transportasi fotosintat sehingga banyak mengandung nutrisi dan hormon endogen. Dengan adanya zat pengatur tumbuh endogen sehingga mengakibatkan proses proliferasi sel mengarah pada pembentukan kalus yang tinggi. Sesuai dengan pendapat Warneing dan Philips (1981) bahwa hormon endogen saja yang terdapat dalam jaringan eksplan akan mempengaruhi proses fisiologis dan morfologis tanaman.

Disamping itu menurut Mandang (2000) bahwa media MS merupakan jenis media yang paling banyak dipakai dalam kultur jaringan dimana keistimewaan dari media MS adalah kandungan nitrat, kalium dan ammonium yang tinggi (Kyte, 1990).

Empat factor yang mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis tanaman dalam kultur jaringan yaitu genotype, media, lingkungan tumbuh dan fisiologi jaringan tanaman sebagai eksplan (Wattimena, et al, 1991).

Pada dasarnya setiap tanaman dapat digunakan sebagai sumber eksplan, tetapi sel-sel yang telah mengalami differensiasi lebih sukar ditumbuhkan dibandingkan dengan sel meristematik. Scheiden dan Schwan mengatakan bahwa sel mempunyai kemampuan otonom dan totipotensi. Totipotensi adalah kemampuan setiap sel darimana saja sel itu diambil, bila ditempatkan dalam lingkungan yang sesuai akan tumbuh menjadi tanaman yang sempurna (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Persentase terbentuknya kalus yang tinggi pada eksplan ibu tulang daun dibandingkan eksplan pucuk dan petiole juga disebabkan fenol yang dikeluarkan oleh kedua jenis eksplan di atas, sehingga menyebabkan persentase eksplan yang bertahan hidup lebih sedikit dan peluang untuk berkembang membentuk kalus lebih kecil dibandingkan dengan eksplan ibu tulang daun.

Rendahnya persentase terbentuknya kalus disebabkan terganggunya keseimbangan hormone endogen atas batas optimum, sehingga proses proliferasi sel akhirnya menjadi terganggu dan akibatnya jumlah eksplan yang membentuk kalus menjadi menurun. Secara umum persentase terbentuknya kalus yang rendah juga

disebabkan besarnya pengaruh fenol yang dikeluarkan oleh semua jenis eksplan. Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh bahwa ternyata kemampuan eksplan tunas pucuk gaharu untuk membentuk kalus lebih rendah dibandingkan pada eksplan ibu tulang daun. Kenyataan ini bertolak belakang dengan pendapat para ahli terdahulu yang menyatakan bahwa untuk beberapa tanaman tunas pucuk dan tunas aksilar terbukti sebagai eksplan yang paling memuaskan dalam pembentukan kalus dan pada umumnya jaringan tanaman yang sedang tumbuh aktif cenderung untuk tumbuh lebih baik dibandingkan bagian tanaman yang lebih tua (Drew, 1980). Selanjutnya Gunawan (1988) menyatakan bahwa eksplan yang dapat menghasilkan terutama kalus adalah hipokotil, kotiledon, tunas pucuk, mebrion muda, tunas samping dan jaringan yang masih aktif membelah.

Rendahnya persentase terbentuknya kalus pada eksplan tunas pucuk dan petiole dibandingkan dengan eksplan ibu tulang daun karena pengaruh fenol yang dikeluarkan oleh eksplan ini lebih banyak dibandingkan fenol yang dikeluarkan oleh eksplan ibu tulang daun. Akibatnya kemampuan eksplan yang hidup lebih sedikit dan peluang terbentuknya kalus juga lebih sedikit walaupun umumnya tunas pucuk adalah jaringan meristematis yang mudah ditumbuhkan.

Kesulitan dalam mengembangkan tanaman berkayu adalah mendapatkan eksplan yang steril, karena tanaman induk tumbuh di lapangan, kemampuan regenerasi yang sangat lemah serta sering mengeluarkan senyawa fenol yang menyebabkan racun terhadap media tanam dan tanaman itu sendiri sehingga mengganggu pertumbuhan dan perkembangan kultur (Gunawan, 1988). Induksi kalus diawali dengan pengkerutan eksplan kemudian diikuti dengan munculnya kalus pada permukaan eksplan yang mengalami perlukaan. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) kalus merupakan sel-sel yang belum terdeferensiasi yang terbentuk pada salah satu atau seluruh irisan eksplan. Dari hasil penelitian yang diperoleh, secara umum menunjukkan bahwa metode yang digunakan belum mampu memberikan hasil yang maksimal, namun data dijadikan sebagai informasi awal bagi pemuliaan tanaman dalam upaya kegiatan penyelamatan dan pelestarian tanaman penghasil gaharu secara *in vitro*.

Menurut Gunawan (1988) kemampuan pembentukan kalus dari jaringan tergantung antara lain; umur fisiologis dan jaringan waktu diisolasi, bagian tanaman yang dipakai sebagai sumber eksplan dan jenis tanaman. Pembentukan kalus terjadi jika perbandingan antara konsentrasi Auksin dan Sitokinin dalam keadaan seimbang baik endogen maupun eksogen (Rao, Sin, Kothagoda, and Hutchinson, 1981 ; dan Widiastoety, 1985).

Selanjutnya perbedaan bagian bahan eksplan akan mempengaruhi kemampuan eksplan membentuk kalus, sebagaimana pendapat Wiendi, Wattimena, dan Gunawan (1991) bahwa kemampuan eksplan membentuk kalus dan laju pertumbuhannya dapat berbeda antar bagian jaringan eksplan. Hal ini sesuai dengan hasil percobaan Masyudi

(1993) yang mana terdapat perbedaan kemampuan eksplan membentuk kalus dan daya regenerasi kalus antara bagian-bagian dari jaringan eksplan.

Faktor lain yang berpengaruh adalah lingkungan tempat tumbuh, yang paling utama cahaya dan suhu ruang kultur. Temperatur ruangan dapat mempengaruhi proses fisiologis eksplan. Murashige menggaris bahwa suhu ruang kultur in vitro hendaknya 20 – 25 oC, walaupun beberapa jenis spesies tanaman ada yang dapat tumbuh dengan suhu yang samanapun tiap jenis tanaman memiliki suhu optimal untuk pertumbuhan dan perbanyakkan (Wattimena, et al, 1991). Pertumbuhan organ tanaman secara in vitro yang optimal seringkali memerlukan adanya cahaya, namun tidak demikian dengan proses pembelahan. Awal pembelahan sel dari eksplan yang dikulturkan dan pertumbuhan kalus kadang-kadang dihambat oleh adanya cahaya (Wattimena et al., 1991).

3.1.4. Struktur Kalus dan Warna kalus

Pengamatan struktur kalus dan warna kalus dilakukan secara visual dan menggunakan pinset. Struktur kalus yang dihasilkan pada berbagai jenis eksplan (tunas pucuk, ibu tulang daun dan petiole) ditampilkan pada Tabel 2 .

Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa respon berbagai jenis eksplan yang dikulturkan pada berbagai media kultur memperlihatkan perbedaan terhadap struktur kalus dan warna kalus tanaman penghasil gaharu. Umumnya struktur kalus yang terbentuk pada percobaan ini berbentuk kompak dan mempunyai warna yang berbeda.

Berdasarkan hasil yang beranekaragam tersebut struktur kalus yang diperoleh pada percobaan ini data dipengaruhi oleh genotip eksplan yang digunakan serta media kultur yang digunakan. Wattimena et al(1992) menyatakan bahwa pembentukan kalus atau organ pada kultur in vitro lebih dipengaruhi oleh genotype, inisiasi kultur, lingkungan tumbuh dan fisiologi jaringan yang digunakan. Bentuk, tekstur, warna dan kemampuan morfogenetik serta diferensiasi sel tergantung pada umur dan kemurnian jaringan yang digunakan sebagai eksplan. Perbedaan yang terjadi akan lebih besar jika eksplan tersusun lebih dari satu jenis sel(George dan Sherrington, 1984).

Kalus dari berbagai spesies dapat berbeda tekstur, viabilitas dan warna dan pembentukan kalus ditandai dengan perubahan tekstur eksplan menjadi kasar dan permukaannya mengkilat saat terpantul cahaya (Wetherell, 1982). Berdasarkan hasil percobaan di atas menunjukkan bahwa umumnya struktur kalus tersebut kompak maka jenis kalus ini cocok dimanfaatkan untuk organogenesis. Triatminingsih , Karsinah dan Wahyuni (2000) menyatakan bahwa bentuk dan warna kalus akan menentukan arah morfogenesis selanjutnya. Kalus yang remah cocok dimanfaatkan untuk embriogenesis sedangkan kalus yang kompak untuk organogenesis.

Struktur kalus kompak yang diperoleh pada penelitian ini menggambarkan bahwa peluang kalus untuk dikembangkan dan ditumbuhkan lebih lanjut menjadi tanaman utuh(plantlet) secara langsung lebih besar. Hal ini dapat menjadi suatu nilai tambah

bagi pemuliaan tanaman dalam rangka upaya mengatasi kelangkaan tanaman penghasil gaharu secara in vitro.

3.2. Percobaan Tahap II

3.2.1. *Persentase eksplan kalus bertahan hidup*

Hasil sidik ragam terhadap persentase kalus tanaman *Aquilaria malacensis* Lamk sebagai penghasil gaharu yang bertahan hidup, setelah kalus yang terbentuk pada percobaan seri pertama disubkultur pada perlakuan berbagai kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP. Faktor kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap persentase kalus bertahan hidup, setelah dilanjutkan dengan uji DMNRT pada taraf 5 % yang disajikan pada Tabel 3.

Hasil analisis ragam menunjukkan pengaruh berbagai konsentrasi 2,4-D terhadap persentase eksplan yang hidup umur 5 minggu setelah tanam berbeda nyata dan . Hasil pengamatan setelah diuji dengan DMNRT disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Persentase eksplan kalus bertahan hidup umur 5 minggu setelah kalus disubkultur pada kombinasi konsentrasi 2,4-D (ppm) + BAP(ppm)

Kombinasi Konsentrasi 2,4-D (ppm) + BAP (ppm)	<u>Rerata</u>
0,00 + 0,00 (K0)	50,00 c
2,50 + 0,00 (K1)	58,30 bc
2,50 + 1,50 (K2)	62,50 ab
2,50 + 3,00 (K3)	79,17 a
5,00 + 0,00 (K4)	60,67 ab
5,00 + 1,50 (K5)	54,17 bc
5,00 + 3,00 (K6)	54,17 bc
7,50 + 0,00 (K7)	40,50 d
7,50 + 1,50 (K8)	38,17 d
7,50 + 3,00 (K9)	35,20 d
KK = 16,59%	

Angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama berbeda tidak nyata menurut DMNRT pada taraf 5%

Tabel 3 memperlihatkan bahwa persentase eksplan yang hidup tetinggi dijumpai pada pemberian kombinasi konsentrasi 2,50 ppm 2,4-D + 3,00 BAP (K3) berbeda tidak nyata dengan 2,50 ppm 2,4-D + 1,50 ppm BAP (K2), dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya.

Hal ini disebabkan karena berbagai kombinasi konsentrasi Auksin(2,4-D) dan Sitokinin (BAP) mampu mendorong pertumbuhan dan perkembangan eksplan sehingga eksplan mempunyai kemampuan untuk dapat dapat hidup.

Moore (1979) ; George dan Sherrington (1984) melaporkan bahwa pemberian zat pengatur tumbuh Auksin dan Sitokinin pada konsentrasi rendah mampu merangsang pertumbuhan dan perkembangan eksplan serta mempertahankan daya hidup jaringan

eksplan, tetapi pada konsentrasi yang tinggi zat pengatur tumbuh dapat bersifat menghambat perkembangan morfogenesis eksplan.

Perimbangan konsentrasi zat pengatur tumbuh Auksin dan Sitokinin dalam jaringan eksplan dapat meningkatkan kemampuan hidup, pertumbuhan dan perkembangan jaringan eksplan (Satria, Dwipa, dan Jamsari, 1999)

Jenis dan komposisi media sangat mempengaruhi besarnya daya tahan eksplan untuk hidup pada media tersebut, sedangkan zat pengatur tumbuh Auksin dan Sitokinin endogen yang terdapat pada eksplan dan eksogen yang ditambahkan berpengaruh terhadap besarnya penyerapan zat makanan yang tersedia dalam media kultur sehingga eksplan dapat bertahan hidup lebih lama (George dan Sherrington, 1984). Bila pertumbuhan eksplan baik dapat meningkatkan daya tahan hidup eksplan (Gunawan, 1988).

3.2.2. *Persentase eksplan kalus yang mengalami pencoklatan*

Hasil sidik ragam menunjukkan pengaruh berbagai konsentrasi 2,4-D terhadap persentase eksplan yang mengalami pencoklatan umur 5 minggu setelah tanam berbeda nyata. Hasil pengamatan setelah diuji dengan DMNRT pada taraf nyata 5 % disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4 memperlihatkan bahwa persentase eksplan yang mengalami pencoklatan terendah dijumpai pada pemberian konsentrasi 2,500 ppm 2,4-D + 3,00 ppm BAP (K2) berbeda nyata dengan perlakuan yang lain.

Tabel 4. Persentase eksplan yang browning umur 5 minggu setelah tanam pada Kombinasi Konsentrasi 2,4-D (ppm) + BAP (ppm)

Kombinasi Konsentrasi 2,4-D (ppm) + BAP (ppm)	<u>Rerata</u>
0,00 + 0,00 (K0)	25,00 c
2,50 + 0,00 (K1)	20,83 c
2,50 + 1,50 (K2)	4,83 a
2,50 + 3,00 (K3)	12,33 b
5,00 + 0,00 (K4)	12,33 b
5,00 + 1,50 (K5)	10,33 b
5,00 + 3,00 (K6)	12,33 b
7,50 + 0,00 (K7)	12,33 b
7,50 + 1,50 (K8)	12,33 b
7,50 + 3,00 (K9)	10,33 b
KK = 13,24 %	

Angka-angka pada lajur yang sama diikuti oleh kecil yang sama adalah berbeda tidak nyata menurut DMNRT pada taraf nyata 5 %

Hal ini diduga bahwa eksplan yang ditanam pada media kultur yang ditambahkan zat pengatur tumbuh pada kombinasi konsentrasi 2,5 ppm 2,4-D + 3,00 ppm BAP

tersebut telah mampu untuk mengatasi senyawa fenol yang dihasilkan oleh eksplan. Hal ini sesuai dengan yang dikatakan oleh George and Sherrington (1984) ; Zaid (1995) ; dan Satria (1995) bahwa kombinasi konsentrasi auksin (2,4-D) dan Sitokinin (BAP) yang tinggi dapat menunda sintesa senyawa polyfenol dan mengurangi pencoklatan pada eksplan Selanjutnya penambahan arang aktif 2,00 gram/liter pada pra perlakuan kemungkinan besar telah menyerap senyawa polifenol yang dikeluarkan oleh jaringan eksplan yang luka sehingga persentase eksplan yang mencoklat tidak terlalu tinggi. Hal ini sesuai dengan yang dikatakan oleh George and Sherrington (1984) ; dan Satria, Fauza, Kasli (1999) bahwa arang aktif dapat menyerap senyawa polifenol yang dikeluarkan dari dalam eksplan, dan biasanya dapat memhambat pertumbuhan eksplan.

3.2.3. Saat kalus mulai beregenerasi

Hasil sidik ragam terhadap saat kalus tanaman *Aquilaria malacensis* Lamk sebagai penghasil gaharu beregenerasi , setelah kalus yang terbentuk pada percobaan seri pertama disubkultur pada perlakuan berbagai kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP. Faktor kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap saat kalus beregenerasi, setelah dilanjutkan dengan uji DMNRT pada taraf 5 % yang disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5 memperlihatkan bahwa saat eksplan kalus mulai beregenerasi setelah disubkultur pada media MS tercepat, yaitu 10,00 hari dijumpai pada eksplan kalus yang disubkulturkan pada media MS yang diperkaya dengan kombinasi konsentrasi 2,50 ppm 2,4-D + 3,00 ppm BAP (K2) berbeda nyata dengan eksplan kalus yang disubkulturkan pada media MS yang diperkaya dengan seluruh kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP.

Tabel 5. Saat kalus mulai beregenerasi, dan persentase kalus membentuk shootlet akibat pemberian berbagai kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP pada kalus tanaman *Aquilaria malacensis* Lamk sebagai penghasil gaharu) setelah sub kultur.

Kombinasi Konsentrasi 2,4-D (ppm) + BAP (ppm)	Saat kalus beregenerasi (hari)	Persentase kalus Membentuk shootlet (%)
0,00 + 0,00 (K0)	23,00 a	6,67 e
2,50 + 0,00 (K1)	15,00 c	10,00 e
2,50 + 1,50 (K2)	14,33 cd	33,33 bc
2,50 + 3,00 (K3)	10,00 g	56,67 a
5,00 + 0,00 (K4)	12,67 ef	3,33 e
5,00 + 1,50 (K5)	13,00 f	26,67 cd
5,00 + 3,00 (K6)	13,00 ef	36,67 b
7,50 + 0,00 (K7)	13,33 de	3,33 e
7,50 + 1,50 (K8)	15,33 bc	23,33 d
7,50 + 3,00 (K9)	16,67 b	30,00 bcd
KK (%) =	28,65	22,45

Angka-angka pada kolom yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama berbeda tidak nyata menurut DMNRT pada taraf 5%

Saat eksplan kalus beregenerasi dipengaruhi oleh tiga faktor yaitu faktor eksplan, media, dan lingkungan (George dan Sherrington, 1984). Setiawan (2001) menyatakan bahwa hormon yang dihasilkan oleh eksplan dan ZPT eksogen yang ditambahkan cukup untuk kalus beregenerasi membentuk organ.

Keberadaan auksin dan sitokinin di dalam media kultur pada komposisi tertentu akan menentukan arah pertumbuhan eksplan yang dikulturkan. Secara umum penambahan auksin pada konsentrasi rendah akan memacu pembentukan kalus, sebaliknya jika perbandingan auksin dan sitokinin di dalam media lebih tinggi akan memacu eksplan kalus beregenerasi membentuk organ.

Auksin (2,4-D) secara selular adalah meningkatkan sintesa nukleotida DNA dan RNA, sintesa protein dan enzim, peningkatan pertukaran proton, muatan membrane dan pengambilan kalium, dan dengan adanya kenaikan sintesa protein maka dapat digunakan sebagai sumber tenaga dalam pertumbuhan (Gardner et al., 1991 dan Gunawan, 1990).

3.2.4. Persentase kalus *Aquilaria malacensis* Lamk membentuk shootlet setelah Sub Kultur

Hasil sidik ragam terhadap jumlah kalus dan persentase kalus tanaman *Aquilaria malacensis* Lamk sebagai penghasil gaharu membentuk shootlet, setelah kalus yang terbentuk pada percobaan seri pertama disubkultur pada perlakuan berbagai kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP. Faktor kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap jumlah kalus dan persentase kalus membentuk shootlet, setelah dilanjutkan dengan uji DMNRT pada taraf 5 % yang disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5 memperlihatkan bahwa persentase eksplan kalus membentuk shootlet yang terbentuk tertinggi, yaitu 56,67% dan jumlah shootlet yang terbentuk terbanyak, dijumpai pada eksplan kalus yang disubkulturkan pada media MS yang diperkaya dengan kombinasi konsentrasi 2,500 ppm 2,4-D + 3,00 ppm BAP (S3) berbeda nyata dengan eksplan kalus yang disubkulturkan pada media MS yang diperkaya dengan seluruh kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP.

Perbedaan kombinasi konsentrasi 2,4-D + BAP memberikan pengaruh terhadap persentase eksplan kalus membentuk shootlet dan jumlah shootlet yang terbentuk.

Pemberian kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D 2,50 ppm dan 3,00 ppm BAP dalam keadaan seimbang mendorong pertumbuhan eksplan dan perkembangan eksplan membentuk shootlet yang lebih tinggi. Perbanyakkan dengan menggunakan kalus diharapkan terjadinya organogenesis yang merupakan salah sumber keragaman genetic dengan terjadinya kemungkinan variasi somaklonal (Wattimena et al., 1991).

Wattimena (1988) dan Satria (1999) mengatakan bahwa kalus dapat beregenerasi membentuk shootlet apabila terjadi keseimbangan antara zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin. Agusta, (1995) melaporkan bahwa sitokinin berfungsi dalam merangsang pembentukan tunas, berpengaruh terhadap metabolisme sel dan merangsang sel.

Selanjutnya Wiendi, Wattimena, dan Winata (1991); dan Wattimena 1988 melaporkan bahwa Pertumbuhan dan morfogenesis tanaman membentuk shootlet dan plantlet secara in vitro dikendalikan oleh keseimbangan dari zat pengatur tumbuh Auksin dan Sitokinin dalam jaringan eksplan.

Jika pemberian zat pengatur tumbuh melebihi konsentrasi optimum, dapat menyebabkan jumlah shootlet yang terbentuk sedikit. Hal ini didukung oleh pernyataan Tiwari et al., (2000) bahwa konsentrasi sitokinin yang tinggi menyebabkan jumlah shootlet yang terbentuk sedikit, dan BAP melebihi kadar optimum yang dibutuhkan tanaman umumnya menyebabkan perkembangan tajuk atau shootlet terhambat, dan Satria et al (2005) menyatakan bahwa konsentrasi BAP yang tinggi dapat menyebabkan panjang shootlet terhambat. Damayanti (2004) juga menyatakan bahwa BAP tidak memperpanjang shootlet tanaman *Dianthus caryophyllus*, bahkan sebaliknya menyebabkan shootlet terlihat lebih pendek dan kerdil.

3.3. Percobaan Tahap III

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap percobaan tahap 3 ternyata peubah: Persentase kalus dan shootlet yang hidup 7 minggu setelah sub kultur kedua; Persentase kalus dan shootlet membentuk plantlet 7 minggu setelah subkultur ke- 2; Jumlah plantlet yang terbentuk 10 minggu setelah sub kultur ke- 2 dan Tinggi plantlet tidak dapat diukur sehubungan terjadinya bencana Gempa Bumi di Padang Khususnya dan Sumbar Umumnya. Seluruh botol kultur yang berisi kalus dan shootlet pecah dan berantakan dan seluruh kalus dan shootlet, jaringannya mengalami kekeringan dan mati sehingga tak dapat digunakan untuk pengamatan.

Selanjutnya peneliti telah mencoba mengulang kembali penelitian dari awal tetapi hasilnya masih sama dengan percobaan tahap1 (tahapinduksi kalus).

4. Kesimpulan dan saran

4.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai induksi kalus dan regenerasi kalus tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis*, L.) pada berbagai jenis eksplan dan media pada percobaan tahap 1 dan kombinasi konsentrasi 2,4-D + BAP pada percobaan tahap 2 serta berbagai kombinasi konsentrasi NAA dan BAP pada percobaan tahap 3, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

- a. Eksplan ibu tulang daun yang dikulturkan pada media MS menunjukkan persentase eksplan yang hidup, persentase ekplan membentuk kalus tertinggi, dan mampu membentuk kalus yang remah dan warna kalusu putih kehijauan.
- b. Perlakuan kombinasi konsentrasi 2,50 ppm 2,4-D + 3,00 ppm BAP menunjukkan persentase kalus dapat bertahan hidup lebih tinggi, dalam jangka waktu yang singkat

d. Struktur kalus

Pengamatan terhadap struktur kalus dilakukan pada akhir percobaan, yaitu 5 minggu setelah dikulturkan, dan struktur kalus yang diamati adalah kompak atau remah.

e. Warna kalus

Pengamatan dilakukan berdasarkan warna yang ditampilkan, dan diamati pada 5 minggu setelah dikulturkan. Warna kalus yang terbentuk pada umumnya kuning, kuning muda, kuning kehijauan, putih, hijau, atau coklat.

6.2. Peubah yang diamati pada percobaan tahap kedua mendapatkan konsentrasi ZPT yang optimal

Peubah yang diamati pada percobaan ini dimulai 1 (satu) minggu sampai 5 minggu setelah tunas dipindahkan pada media multiplikasi, yang meliputi :

a. Persentase kalus yang hidup

Persentase kalus yang hidup dihitung pada 5 minggu setelah dikulturkan (MSD) dan dihitung dengan cara kalus yang hidup tiap perlakuan dibagi jumlah kalus semuanya dikali 100 %. Kalus yang hidup ditandai dengan keadaan kalus yang masih segar, kokoh dan berwarna putih kehijauan, dan tidak kering.

b. Persentase Eksplan Kalus yang Mengalami Pencoklatan

c. Saat kalus beregenerasi

Pengamatan persentase kalus beregenerasi dilakukan pada 1 minggu setelah dikulturkan kalus. Kalus beregenerasi di tandai dengan terbentuknya lempeng yang remah atau kompak, berwarna putih, kuning, kuning kehijauan, hijau, coklat, dan dihitung dengan menjumlahkan semua kalus beregenerasi dengan seluruh kalus di kali 100%.

d. *Persentase eksplan yang membentuk shootlet*

Pengamatan persentase kalus membentuk shootlet dilakukan berdasarkan kriteria panjang tunas yang terbentuk 5 mm, pengamatan dilakukan pada akhir pengamatan umur 12 minggu setelah eksplan ditanam, dan dihitung dengan menjumlahkan semua kalus yang membentuk shootlet dibagi seluruh kalus yang hidup dikali 100%.

6.3. Peubah yang diamati pada percobaan tahap ketiga mendapatkan kombinasi konsentrasi ZPT yang optimal guna mendorong kalus, shootlet beregenerasi membentuk plantlet

a. *Persentase kalus dan shootlet yang hidup*

Persentase kalus dan shootlet yang hidup dihitung pada 7 minggu setelah dikulturkan (MSD) dan dihitung dengan cara kalus dan shootlet yang hidup tiap perlakuan dibagi jumlah kalus semuanya dikali 100 %. Kalus yang hidup ditandai dengan keadaan kalus yang masih segar, kokoh dan berwarna putih kehijauan, dan tidak kering.

b. *Persentase kalus dan shootlet membentuk plantlet*

c. *Jumlah plantlet yang terbentuk*

Jumlah plantlet yang dihitung adalah jumlah plantlet yang muncul pada setiap perlakuan, perhitungan dilakukan 2 minggu sekali sampai 12 minggu setelah regenerasi kalus.

d. *Tinggi plantlet*

Tinggi plantlet diukur mulai dari pangkal leher akar yang berada di atas permukaan media sampai ke titik tumbuh. Plantlet dikeluarkan dari botol dan setelah itu dilakukan pengukuran. Pengukuran dilakukan pada 12 minggu setelah regenerasi kalus.

3.7. LUARAN PENELITIAN YANG DIHARAPKAN

Hasil percobaan ini diharapkan dapat memberikan sumbangan pada pengembangan ilmu tanaman, khususnya ilmu pemuliaan tanaman. Sumbangan tersebut antara lain :

1. Memberikan informasi tentang metode baku kultur *in vitro* (respon eksplan pada media kultur dan kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tepat) untuk perbanyakan tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malacensis* Lamk)
2. Memberikan sumbangan positif bagi perkembangan ilmu dan teknologi budidaya tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malacensis* Lamk) secara *in vitro* dan menjadi acuan dalam perbanyakan, serta sumber plasma nutfah
3. Artikel hasil penelitian dipublikasikan pada jurnal akreditasi nasional

Media	WPM (K1)	MS (K2)	MS (K3)
MS (K1)	20,00 ab	15,00 a	15,00 a
WPM (K2)	30,00 ab	20,67 b	20,67 b
MS (K3)	40,00 abc	25,00 c	25,00 c
MS (K4)	50,00 abc	30,00 d	30,00 d
WPM (K5)	60,00 abcd	35,00 e	35,00 e
MS (K6)	70,00 abcd	40,00 e	40,00 e
MS (K7)	80,00 abcd	45,00 e	45,00 e
MS (K8)	90,00 abcd	50,00 e	50,00 e
MS (K9)	100,00 abcd	55,00 e	55,00 e
MS (K10)	110,00 abcd	60,00 e	60,00 e
MS (K11)	120,00 abcd	65,00 e	65,00 e
MS (K12)	130,00 abcd	70,00 e	70,00 e
MS (K13)	140,00 abcd	75,00 e	75,00 e
MS (K14)	150,00 abcd	80,00 e	80,00 e
MS (K15)	160,00 abcd	85,00 e	85,00 e
MS (K16)	170,00 abcd	90,00 e	90,00 e
MS (K17)	180,00 abcd	95,00 e	95,00 e
MS (K18)	190,00 abcd	100,00 e	100,00 e
MS (K19)	200,00 abcd	105,00 e	105,00 e
MS (K20)	210,00 abcd	110,00 e	110,00 e
MS (K21)	220,00 abcd	115,00 e	115,00 e
MS (K22)	230,00 abcd	120,00 e	120,00 e
MS (K23)	240,00 abcd	125,00 e	125,00 e
MS (K24)	250,00 abcd	130,00 e	130,00 e
MS (K25)	260,00 abcd	135,00 e	135,00 e
MS (K26)	270,00 abcd	140,00 e	140,00 e
MS (K27)	280,00 abcd	145,00 e	145,00 e
MS (K28)	290,00 abcd	150,00 e	150,00 e
MS (K29)	300,00 abcd	155,00 e	155,00 e
MS (K30)	310,00 abcd	160,00 e	160,00 e
MS (K31)	320,00 abcd	165,00 e	165,00 e
MS (K32)	330,00 abcd	170,00 e	170,00 e
MS (K33)	340,00 abcd	175,00 e	175,00 e
MS (K34)	350,00 abcd	180,00 e	180,00 e
MS (K35)	360,00 abcd	185,00 e	185,00 e
MS (K36)	370,00 abcd	190,00 e	190,00 e
MS (K37)	380,00 abcd	195,00 e	195,00 e
MS (K38)	390,00 abcd	200,00 e	200,00 e
MS (K39)	400,00 abcd	205,00 e	205,00 e
MS (K40)	410,00 abcd	210,00 e	210,00 e
MS (K41)	420,00 abcd	215,00 e	215,00 e
MS (K42)	430,00 abcd	220,00 e	220,00 e
MS (K43)	440,00 abcd	225,00 e	225,00 e
MS (K44)	450,00 abcd	230,00 e	230,00 e
MS (K45)	460,00 abcd	235,00 e	235,00 e
MS (K46)	470,00 abcd	240,00 e	240,00 e
MS (K47)	480,00 abcd	245,00 e	245,00 e
MS (K48)	490,00 abcd	250,00 e	250,00 e
MS (K49)	500,00 abcd	255,00 e	255,00 e
MS (K50)	510,00 abcd	260,00 e	260,00 e
MS (K51)	520,00 abcd	265,00 e	265,00 e
MS (K52)	530,00 abcd	270,00 e	270,00 e
MS (K53)	540,00 abcd	275,00 e	275,00 e
MS (K54)	550,00 abcd	280,00 e	280,00 e
MS (K55)	560,00 abcd	285,00 e	285,00 e
MS (K56)	570,00 abcd	290,00 e	290,00 e
MS (K57)	580,00 abcd	295,00 e	295,00 e
MS (K58)	590,00 abcd	300,00 e	300,00 e
MS (K59)	600,00 abcd	305,00 e	305,00 e
MS (K60)	610,00 abcd	310,00 e	310,00 e
MS (K61)	620,00 abcd	315,00 e	315,00 e
MS (K62)	630,00 abcd	320,00 e	320,00 e
MS (K63)	640,00 abcd	325,00 e	325,00 e
MS (K64)	650,00 abcd	330,00 e	330,00 e
MS (K65)	660,00 abcd	335,00 e	335,00 e
MS (K66)	670,00 abcd	340,00 e	340,00 e
MS (K67)	680,00 abcd	345,00 e	345,00 e
MS (K68)	690,00 abcd	350,00 e	350,00 e
MS (K69)	700,00 abcd	355,00 e	355,00 e
MS (K70)	710,00 abcd	360,00 e	360,00 e
MS (K71)	720,00 abcd	365,00 e	365,00 e
MS (K72)	730,00 abcd	370,00 e	370,00 e
MS (K73)	740,00 abcd	375,00 e	375,00 e
MS (K74)	750,00 abcd	380,00 e	380,00 e
MS (K75)	760,00 abcd	385,00 e	385,00 e
MS (K76)	770,00 abcd	390,00 e	390,00 e
MS (K77)	780,00 abcd	395,00 e	395,00 e
MS (K78)	790,00 abcd	400,00 e	400,00 e
MS (K79)	800,00 abcd	405,00 e	405,00 e
MS (K80)	810,00 abcd	410,00 e	410,00 e
MS (K81)	820,00 abcd	415,00 e	415,00 e
MS (K82)	830,00 abcd	420,00 e	420,00 e
MS (K83)	840,00 abcd	425,00 e	425,00 e
MS (K84)	850,00 abcd	430,00 e	430,00 e
MS (K85)	860,00 abcd	435,00 e	435,00 e
MS (K86)	870,00 abcd	440,00 e	440,00 e
MS (K87)	880,00 abcd	445,00 e	445,00 e
MS (K88)	890,00 abcd	450,00 e	450,00 e
MS (K89)	900,00 abcd	455,00 e	455,00 e
MS (K90)	910,00 abcd	460,00 e	460,00 e
MS (K91)	920,00 abcd	465,00 e	465,00 e
MS (K92)	930,00 abcd	470,00 e	470,00 e
MS (K93)	940,00 abcd	475,00 e	475,00 e
MS (K94)	950,00 abcd	480,00 e	480,00 e
MS (K95)	960,00 abcd	485,00 e	485,00 e
MS (K96)	970,00 abcd	490,00 e	490,00 e
MS (K97)	980,00 abcd	495,00 e	495,00 e
MS (K98)	990,00 abcd	500,00 e	500,00 e
MS (K99)	1000,00 abcd	505,00 e	505,00 e
MS (K100)	1010,00 abcd	510,00 e	510,00 e

Tabel 1. Sumbangan positif bagi perkembangan ilmu dan teknologi budidaya tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malacensis* Lamk) secara *in vitro* dan menjadi acuan dalam perbanyakan, serta sumber plasma nutfah

Tabel 1. Sumbangan positif bagi perkembangan ilmu dan teknologi budidaya tanaman penghasil gaharu (*Aquilaria malacensis* Lamk) secara *in vitro* dan menjadi acuan dalam perbanyakan, serta sumber plasma nutfah