

**PENGARUH KOMBINASI 2,4 D DAN THIDIAZURON (TDZ)  
TERHADAP PERTUMBUHAN KALUS DAUN LEGUNDI  
(*Vitex trifolia* Linn) PADA MEDIA MS**

**SKRIPSI**

Oleh :

**NADIA ALFA SAKINAH**

**NIM. 13620076**



**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**

**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI**

**MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**

**2017**

**PENGARUH KOMBINASI 2,4 D DAN THIDIAZURON (TDZ)  
TERHADAP PERTUMBUHAN KALUS DAUN LEGUNDI  
(*Vitex trifolia* Linn) PADA MEDIA MS**

**SKRIPSI**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
untuk Memenuhi Salah satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**OLEH:  
NADIA ALFA SAKINAH  
NIM. 13620076**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2017**

**HALAMAN PERSETUJUAN**

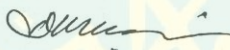
**PENGARUH KOMBINASI 2,4 D DAN THIDIAZURON (TDZ)  
TERHADAP PERTUMBUHAN KALUS DAUN LEGUNDI  
(*Vitex trifolia* Linn) PADA MEDIA MS**

**SKRIPSI**

**OLEH:  
NADIA ALFA SAKINAH  
NIM. 13620076**

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal 22 Desember 2017

Pembimbing I,



Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd.  
NIP. 19630114 1999903 1 001

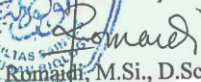
Pembimbing II,



Dr. H. Ahmad Barizi, M.A  
NIP. 19731212 199803 1 001



Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi



Romadhoni, M.Si., D.Sc  
NIP. 19810201 200901 1 019

## HALAMAN PENGESAHAN

**PENGARUH KOMBINASI 2,4 D DAN THIDIAZURON (TDZ)  
TERHADAP PERTUMBUHAN KALUS DAUN LEGUNDI  
(*Vitex trifolia* Linn) PADA MEDIA MS**

## SKRIPSI

**OLEH:  
NADIA ALFA SAKINAH  
NIM. 13620076**

Telah Dipertahankan di Depan Penguji Skripsi  
dan dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan  
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal 22 Desember 2017

Penguji Utama	<u>Dr. Evika Sandi Savitri, M.P</u> NIP. 19741018 200312 2 2002	
Ketua Penguji	<u>Suyono, M.P</u> NIP. 19710622 200312 1 002	
Sekretaris Penguji	<u>Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd.</u> NIP. 19630114 1999903 1 001	
Anggota Penguji	<u>Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.</u> NIP. 19731212 199803 1 001	

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi



Romaidi, M.Si., D.Sc  
NIP. 19810201 200901 1 019

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nadia Alfa Sakinah

NIM : 13620076

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Pengaruh Kombinasi 2,4 D dan Thidiazuron (TDZ) Terhadap  
Pertumbuhan Kalus Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn) Pada Media MS

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar rujukan. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 22 Desember 2017

Yang membuat pernyataan,



Nadia Alfa Sakinah  
NIM. 13620076

## MOTTO

وَأَنْ لَّيْسَ لِلْإِنْسَانِ إِلَّا مَا سَعَى ﴿٣٩﴾

**Artinya: “dan bahwasanya seorang manusia tiada memperoleh selain apa yang telah diusahakannya” (An-Najm: 39).**

**“Karena kita sebagai manusia tidak hanya mengandalkan doa, melainkan ikhtiar sambil berdoa lah yang utama kemudian tawakkal atas hasil yang telah kita kerjakan “**

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah, tiada kata terindah selain syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga saya dapat menimba sebagian dari ilmu-Nya ini. Shalawat dan salam tetap terlimpah curahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW.

Skripsi ini ku persembahkan kepada:

Kedua orang tua ku, bapak H. Ach. Muzakki Ghufron dan ibu Hj. Khusnati yang selalu memberikan dukungan, motivasi, semangat, nasihat dan do'a yang tiada henti dipanjatkan dalam setiap sujudnya. Serta Adikku, Annisa Qotrunnada yang menjadi salah satu motivasiku dan yang selalu cinta kepadaku.

Terima kasih sebanyak-banyaknya Buat teman-teman seperjuanganku Biologi 13 khususnya Muzdalifah, Yayang, Dian Eka, Kamil, Qonita dan *team* KJT (Ismi, Pipit, Fida, Ari, Putro, Mas Beri, Mike, Herlina dan Maya) terima kasih sudah memberi motivasi dan membantu selama penelitian berlangsung.

Tak lupa kepada pengasuh Asrama PPAP "Nurul Ummah", Bapak Drs. H. Sabilul Rosyad dan Ibu Hj. Aminatuz Zahroh terima kasih karena telah diberi kesempatan untuk menimba ilmu di asrama. Tak lupa pula kepada teman-teman asrama fauchil, fifti, isna, aim, caca, ajidah, nindi dan kamar B1 (Nizar, Linda, Manyo, Izza, Mardiyah dan Mia ) yang selalu membuat suasana ceria dan menghiasi kamar dengan canda tawa yang terkadang mengusik ketenanganku :-D

Terima kasih juga teruntuk yang terkasih dan yang tersayang, Muhammad Walied Hisyam yang ikut andil dalam pengerjaan skripsiku terutama saat pengerjaan di laboratorium yang dimana hasil laboratorium juga bergantung pada suasana hati. Dia yang memberiku semangat dan slalu menunggu waktu wisudaku.

Serta semua pihak yang tidak bisa kusebutkan satu persatu yang telah membantu terealisasinya skripsi ini, semoga Allah selalu melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua. Amin..

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum, Wr.Wb.*

Puji syukur Alhamdulillah, penulis panjatkan kehadiran Allah SWT. Atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan rangkaian penyusunan skripsi dengan judul **“Pengaruh Kombinasi 2,4 D dan Thidiazuron (TDZ) Terhadap Pertumbuhan Kalus Daun Legundi (*Vitex trivolia* Linn) Pada Media MS”**. Sholawat beserta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW. Sang revolusioner pembawa cahaya terang bagi peradaban, salah satunya adalah melalui pendidikan yang senantiasa berlandaskan keagungan moral dan spiritual.

Penulis juga haturkan ucapan terima kasih seiring doa dan harapan *Jazakumullah ahsanal jaza'* kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. Abdul Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M.Si.,D.Sc, selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd., dan Dr. H. Ahmad Barizi, M.A selaku dosen pembimbing bidang Biologi dan dosen pembimbing bidang integrasi, yang senantiasa memberikan pengarahan, nasehat, dan motivasi dalam penyelesaian skripsi.
5. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P, selaku dosen wali yang senantiasa memberikan pengarahan dan nasehat.
6. Segenap Dosen dan Sivitas Akademika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
7. Kedua orang tua penulis Bapak H. Ach. Muzakki Ghufro dan Ibu Hj. Khusnati serta adik Annisa Qotrunnada yang senantiasa memberikan kasih



sayang, doa, serta dorongan semangat menuntut ilmu kepada penulis selama ini.

8. Laboran dan staff administrasi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
9. Seluruh teman-teman Biologi angkatan 2013 terima kasih atas kerja sama, motivasi, serta bantuannya selama menempuh studi di Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
10. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah memberikan sumbangan pemikiran, do'a dan semangat hingga terselesaikannya skripsi ini.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas bantuan dan pemikirannya. Sebagai akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi para pembaca. *Amin Ya Robbal 'Alamiin.*

*Wassalamu'alaikum Warahmatullah Wabarakatuh*

Malang, 22 Desember 2017

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGAJUAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN .....</b>	<b>v</b>
<b>MOTTO .....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>vii</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvii</b>
<b>مستخلص البحث.....</b>	<b>xviii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	10
1.3 Tujuan.....	11
1.4 Manfaat.....	11
1.5 Hipotesis.....	12
1.6 Batasan Masalah.....	12
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) .....	14
2.1.1 Kajian Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn) dalam Perspektif Islam ....	14
2.1.2 Klasifikasi Tanaman Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn).....	17
2.1.3 Morfologi Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn).....	17
2.1.4 Habitat Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn) .....	18
2.1.5 Kandungan dan Manfaat .....	18
2.2 Kultur Jaringan Tumbuhan.....	19
2.2.1 Pengertian Kultur Jaringan.....	19
2.2.2 Prinsip Kultur Jaringan.....	20
2.2.3 Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Kultur Jaringan Tumbuhan .....	21
2.2.4 Masalah dalam Kultur Jaringan.....	23
2.2.5 Pemilihan Eksplan.....	24
2.3 Media Kultur Jaringan .....	24
2.4 Zat Pengatur Tumbuh.....	26
2.4.1 Definisi .....	26
2.4.2 Macam-Macam Zat Pengatur Tumbuh.....	28
2.4.3 Penggunaan 2,4 D pada Klutur Jaringan Tumbuhan.....	28
2.4.4 Penggunaan <i>Thidiazuron</i> (TDZ) pada Kultur Jaringan	

Tumbuhan .....	31
2.4.5 Kerja Auksin dan Sitokinin .....	32
2.4.6 Efek Hormon pada Aktivitas Gen .....	34
2.4.7 Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh.....	39
2.4.8 Kalus.....	41
2.4.9 Kualitas Kalus .....	44
2.4.10 Metabolit Sekunder .....	47
2.4.11 Produksi Senyawa Metabolit Sekunder Melalui Teknik Kultur Jaringan.....	49
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	51
3.2 Rancangan Penelitian .....	51
3.3 Alat dan Bahan .....	52
3.3.1 Alat .....	52
3.3.2 Bahan.....	52
3.4 Prosedur Penelitian .....	53
3.4.1 Tahap Persiapan .....	53
1. Sterilisasi Ruang Tanamn.....	53
2. Sterilisasi Alat .....	54
3. Pembuatan Stok Zat Pengatur Tumbuh.....	54
4. Pembuatan Media Dasar.....	55
5. Sterilisasi Media .....	55
3.4.2 Tahap Pelaksanaan .....	56
1. Sterilisasi Eksplan Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn) .....	56
1. Sterilisasi Eksplan di Luar LAF .....	56
2. Sterilisasi Eksplan di Dalam LAF .....	56
2. Penanaman (Inisiasi).....	56
3.4.3 Pengamatan .....	57
3.4.4 Teknik Analisis Data .....	58
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi 2,4 D terhadap Induksi Kalus Daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) secara <i>In Vitro</i> .....	60
4.1.1 Hari Muncul Kalus .....	61
4.1.2 Persentase Kalus.....	62
4.1.3 Berat Kalus .....	64
4.2 Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi TDZ terhadap Induksi Kalus Daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) secara <i>In Vitro</i> .....	66
4.2.1 Persentase Kalus.....	67
4.2.2 Berat Kalus .....	69
4.3 Pengaruh Pemberian Berbagai Kombinasi 2,4 D dan TDZ terhadap Induksi Kalus Daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) secara <i>In Vitro</i> ...	70
4.4 Tekstur dan Warna Kalus Daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) .....	73
4.5 Evaluasi Perlakuan Kombinasi 2,4 D dan TDZ secara Keseluruhan terhadap Pertumbuhan Kalus daun legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) .....	82
4.6 Hasil Induksi Kalus Daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn) dalam Perspektif Islam .....	84

**BAB V PENUTUP**

5.1 Kesimpulan..... 89  
5.2 Saran ..... 89

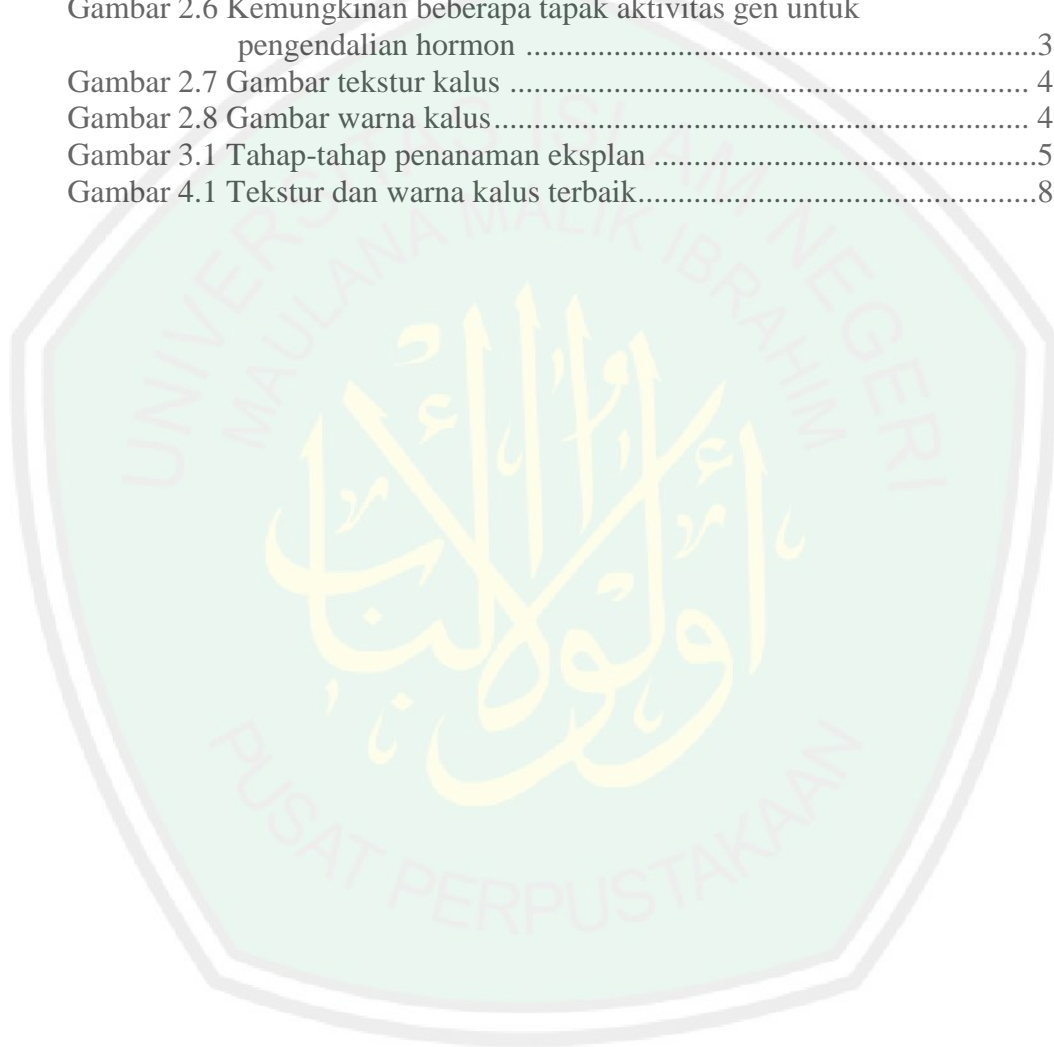
**DAFTAR PUSTAKA** ..... 91

**LAMPIRAN** ..... 97



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Legundi .....	18
Gambar 2.2 Struktur molekul 2,4 D.....	29
Gambar 2.3 pemanjangan sel sebagai respons terhadap auksin : hipotesis pertumbuhan asam .....	31
Gambar 2.4 Rumus bangun TDZ .....	32
Gambar 2.5 Keseimbangan auksin dan sitokinin.....	34
Gambar 2.6 Kemungkinan beberapa tapak aktivitas gen untuk pengendalian hormon .....	38
Gambar 2.7 Gambar tekstur kalus .....	43
Gambar 2.8 Gambar warna kalus.....	46
Gambar 3.1 Tahap-tahap penanaman eksplan .....	53
Gambar 4.1 Tekstur dan warna kalus terbaik.....	80



## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Tabel Kombinasi Perlakuan 2,4 D dan TDZ.....	52
Tabel 4. 1 Ringkasan Hasil Analisis Variansi (ANAVA) Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi 2,4 D terhadap Induksi Kalus Daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) secara <i>In Vitro</i> .....	60
Tabel 4.2 Hasil Uji DMRT 5% pengaruh pemberian 2,4 D terhadap induksi kalus daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) .....	61
Tabel 4.3 Ringkasan Hasil Analisis Variansi (ANAVA) Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi TDZ terhadap Induksi Kalus Daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) secara <i>In Vitro</i> .....	66
Tabel 4.4 Hasil Uji DMRT 5% Pengaruh Pemberian TDZ terhadap Induksi Kalus Daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) .....	67
Tabel 4.5 Ringkasan Hasil Analisis Variansi (ANAVA) Pengaruh Kombinasi Konsentrasi 2,4 D dan TDZ terhadap Induksi Kalus Daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) secara <i>In Vitro</i> .....	70
Tabel 4.6 Hasil Uji DMRT 5% Pengaruh Kombinasi Konsentrasi 2,4 D dan TDZ terhadap Induksi Kalus Daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.) .....	71
Tabel 4.7 Hasil Pengamatan Pengaruh Pemberian 2,4 D dan TDZ terhadap Tekstur dan Warna Kalus Daun Legundi ( <i>Vitex trifolia</i> Linn.).....	73

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Tabel Data Hasil Pengamatan.....	97
Lampiran 2 Hasil Analisis Variansi dan uji Lanjut DMRT 5% .....	99
Lampiran 3 Gambar Hasil Penelitian .....	104
Lampiran 4 Perhitungan Larutan Stok .....	107
Lampiran 5 Perhitungan Pengambilan Larutan Stok .....	108
Lampiran 6 Alat-alat Penelitian .....	108
Lampiran 7 Bahan-bahan Penelitian .....	109
Lampiran 8 Foto Kegiatan.....	110



## ABSTRAK

Sakinah, Nadia Alfa. 2017. **Pengaruh 2,4 D dan Thidiazuron (TDZ) untuk Pertumbuhan Kalus Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn) pada Media MS.** Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd dan Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.

Kata Kunci: Kalus Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn.), 2,4 D, TDZ.

---

Tanaman Legundi (*Vitex trifolia* Linn) memiliki beberapa efek farmakologi antara lain antibakteri, antifungi, insektisida, antialergi, antipiretik maupun antikanker. Daun legundi juga mengandung minyak atsiri dan alkaloid. Senyawa-senyawa tersebut dapat diperoleh melalui kultur kalus. Diduga penambahan konsentrasi 2,4 D dan TDZ dapat memengaruhi pertumbuhan kalus Legundi sehingga produksinya meningkat dan dapat dijadikan acuan konsentrasi ZPT yang paling optimal dalam peningkatan metabolit sekunder. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh kombinasi 2,4 D dan TDZ terhadap pertumbuhan kalus daun Legundi secara *in vitro*.

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental, menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 16 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan dalam penelitian ini ada dua faktor yaitu: konsentrasi 2,4 D meliputi 0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, dan 3 mg/l dan konsentrasi TDZ meliputi 0 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l dan 0,75 mg/l. Data dianalisis dengan Uji ANAVA *Two Way*  $\alpha = 5\%$ . Apabila terdapat perbedaan signifikan maka dilanjutkan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf signifikan 5%.

Hasil dari penelitian menunjukkan adanya pengaruh konsentrasi 2,4 D dan konsentrasi TDZ terhadap induksi kalus daun Legundi. Konsentrasi 2,4 D 3 mg/l berpengaruh nyata terhadap induksi kalus yaitu 11 HST, persentase kalus 75,67% dan berat kalus 0,207 gr. Konsentrasi TDZ 0 mg/l berpengaruh nyata terhadap persentase kalus 67,916% berat kalus sebesar 0,316 gr. Kombinasi 2,4 D 2 mg/l + TDZ 0 mg/l hanya berpengaruh nyata terhadap berat kalus sebesar 0,603 gr dengan tekstur remah dan warna kalus putih. Namun kalus yang memenuhi untuk kalus metabolit ialah pada konsentrasi 2,4 D 1 mg/l + 0,5 TDZ dengan warna kuning bertekstur kompak.



## ABSTRACT

Sakinah, Nadia Alfa. 2017. **The Effect 2,4 D and Thidiazuron for callus induction of leaf Legundi (*Vitex trifolia* Linn) at MS media.** Thesis. Department of Biology faculty of Sains and Technology State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor : Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd and Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.

Keywords: Callus of leaf Legundi (*Vitex trifolia* Linn.), 2,4 D, TDZ.

---

Legundi plants (*Vitex trifolia* Linn) have several pharmacological effects such as antibacterial, antifungal, insecticide, allergic, antipyretic or anticancer. Legundi leaves also contain essential oils and alkaloids. These compounds can be obtained through callus cultures. It is suspected that the addition of concentration of 2,4 D and TDZ can affect the growth of Legundi callus so that its production increases and can be used as the most optimal reference of ZPT concentration in the improvement of secondary metabolite. The purpose of this research is to know the effect of combination of 2,4 D and TDZ on Legundi leaf callus growth in vitro.

This research was experimental, using a complete randomized design (RAL) with 16 treatments and 3 replications. The treatments in this study were two factors, namely: 2,4 D concentrations include 0 mg / l, 1 mg / l, 2 mg / l, and 3 mg / l and TDZ concentrations include 0 mg / l, 0.25 mg / l, 0.5 mg / l and 0.75 mg / l. Data were analyzed by ANAVA Two Way Test  $\alpha = 5\%$ . If there are significant differences then continued with Duncan Multiple Range Test (DMRT) with a significant level of 5%.

The results of the study showed that 2,4 D concentration and TDZ concentration effected on Legundi leaf calligence. The concentration of 2,4 D 3 mg / l had significant effect on callus induction ie 11 HST, callus percentage 75,67% and callus weight 0,207 gr. The concentration of TDZ 0 mg / l had a significant effect on callus percentage of 67,916% callus weight of 0.316 gr. The combination of 2,4 D 2 mg / l + TDZ 0 mg / l only had significant effect on callus weight of 0.603 gr with crumbed texture and white callus color. But the callus that fills for metabolite callus is at concentration of 2,4 D 1 ml / L + 0,5 TDZ with a compact textured and yellow color.

## مستخلص البحث

ساذنة؁ نذفة ألف. 2017. تاذر D 2٠4 و Thidiazuron (TDZ) بنمو كالس ورقة لفةونذف (*Vitex trifolia* Linn) على وسائل MS. البءء الءامعف. قسم الءفةة كلفة العلوم والتكنولوءفءة ءامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامفة الءكوففة مالانء. المشرف: الذكنور إفكو بوءف مفرانو الماحسفر وأءمء بارزف الماحسفر. الكلفمات المفافءفة: كالس ورقة لفةونذف (*Vitex trifolia* Linn)، D2٠4 ، TDZ.

أن لفةونذف نبات لها عدة تاذفرات الدوائفة ومنها ضد البكفرفة وضد الوظففة والءشرفة وضد الءساسفة وضد الءمف وضد السرطان. تشمل ورقة لفةونذف زفء الضرورف والقلفوف. أن المركبات مءكسبة من ءلال زرفة الكالس. تقر زفافة تركفز 2٠4 D و TDZ مؤثر نمو الكالس اللفونذف وعلى هذا فرءفء النءاء وفسء اسارة التركفز ZPT الأمءل فف فرفة المسءقلب النءاوف. تسءءم هذه الدراسة لمعرفة تاذفر مءمعة D2٠4 و TDZ بنمو كالس ورقة اللفونذف فف المءفر.

تسءءم الباءءة المنهء التجرفف باسءءام ءءة العشوائفة الشاملة (RAL) وهف 16 معاملاء و 3 تكرارات. فكون العاملف فف هذه الدراسة وهما: تركفز D 2٠4 ءءوف على 10 mg/l ، 1 mg/l ، 2 mg/l ، و 3 mg/l و تركفز TDZ ءءوف على 0 mg/l ، 0٠25 mg/l ، 0٠5 mg/l و 0٠75 mg/l. أما ءءلل البفاناء المسءءمة فهف اءءبار A Two Way NAVA = ٠٠5%. إذا كان المءءلف الملءوظ فلءءءق باءءبار Duncan Multiple Range Test (DMRT) بنسبة الملءوظ ٠٠5%.

ءءل نءاء الدراسة إلى تاذفر التركفز D 2٠4 و 3 mg/l و تركفز TDZ باسءءراء الكالس وورقة اللفونذف. أن تركفز D 2٠4 مؤثر باسءءراء الكالس وهو HST11. ونسبة الكالس ٠67٠75% ووزن الكالس ٠207 gr. تركفز TDZ 0 mg/l مؤثر بنسبة الكالس ٠67٠916% ووزن الكالس على المبلء ٠316 gr. مءمعة D2٠4 و TDZ 10 mg/l مؤثر بوزن الكالس على المبلء ٠603 gr بنسفع الكسرة ولون الكالس الأبيض. بل أن الكالس للكالس المسءقبل وهو على تركفز 2٠4 D و TDZ ٠٠5+ بالون الأصفر بالنسفع الءءفاق.

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Tumbuhan merupakan satu diantara bentuk ciptaan Allah SWT. Penciptaan Allah SWT atas segala sesuatu yang ada di bumi ini termasuk tumbuhan tidak ada yang sia-sia. Segala sesuatunya memiliki manfaat, mulai dari manusia, hewan, dan bahkan tumbuhan. Seperti yang telah dijelaskan dalam Al-Quran Surat Ali-Imron ayat 191 sebagai berikut :

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya : “(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka” (QS. Ali-Imron (3) :191)

Menurut *Tafsir Ibnu Katsir*, ayat tersebut mempunyai makna bahwa tidak sekali-kali Allah SWT ciptakan semuanya sia-sia melainkan dengan sebenarnya, agar orang-orang yang berbuat buruk dalam perbuatannya Allah SWT berikan balasan yang setimpal kepada mereka, dan Allah SWT berikan pahala yang baik kepada orang-orang yang berbuat baik. Kemudian orang-orang mukmin menyucikan Allah SWT dari perbuatan sia-sia dan penciptaan yang batil. Untuk itu

mereka mengatakan yang disitir oleh firman-Nya : *Subhanaka faqinaa 'adzab al-naar* yaitu Maha Suci Engkau dari perbuatan menciptakan sesuatu dengan sia-sia.

Tafsir tersebut di atas juga bermakna bahwa segala ciptaan Allah SWT mempunyai fungsi dan manfaat masing-masing. Sebagai contoh dalam hal ini ialah tumbuhan. Tumbuh-tumbuhan mempunyai banyak sekali manfaat bagi kehidupan manusia misalnya untuk kebutuhan pangan, sandang, papan, juga dapat digunakan sebagai obat. Sehubungan dengan fungsi tumbuhan sebagai obat, Allah SWT dalam Al-Quran telah berfirman dalam bahwa Dia telah menciptakan berbagai tumbuhan yang baik di bumi. Firman Allah tersebut dalam surat As-syu'ara (26) ayat 7 sebagai berikut :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَخْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

*Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”*

Menurut *Tafsir Ibnu Katsir* (2007) , Allah ta'ala mengingatkan kebesaran kekuasaan-Nya dan keagungan kemampuan-Nya. Dialah yang Maha Agung, Maha Perkasa yang telah menciptakan bumi dan menumbuhkan didalamnya tumbuh-tumbuhan yang baik berupa tanam-tumbuhan, buah-buahan, dan hewan. *“Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda”*. yaitu tanda kekuasaan Maha Pencipta.

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah benar-benar telah menciptakan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik. Tumbuhan yang baik disini mempunyai arti bahwa berbagai tumbuhan tersebut tidak hanya sekedar

ditumbuhkan di bumi ini, melainkan dapat digunakan untuk keperluan manusia karena mempunyai manfaat. Satu dari sekian banyak tumbuhan ciptaan Allah SWT adalah Legundi (*Vitex trifolia* Linn).

Legundi ialah tumbuhan yang tergolong pada famili Verbenaceae. Legundi merupakan tumbuhan perdu atau pohon kecil yang berpotensi sebagai salah satu sumber fitomarka Indonesia (Agusta, 2000).

Tumbuhan berkhasiat sebagai tumbuhan obat sudah dikemukakan dalam Hadits riwayat Imam Muslim dari Jabir bin Abdillah dia berkata bahwa Nabi bersabda,

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أَصَابَ الدَّوَاءُ الدَّاءَ، بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

*Artinya : “Setiap penyakit pasti memiliki obat. Bila sebuah obat sesuai dengan penyakitnya maka dia akan sembuh dengan seizin Allah Subhanahu wa Ta’ala.”* (HR. Muslim).

Hadits tersebut diatas bermakna bahwa ada ciptaan Allah SWT yang berkhasiat sebagai obat. Rasulullah SAW sendiri telah bersabda bahwa segala macam penyakit ada obatnya. Tumbuhan ini dilaporkan mempunyai beberapa aktivitas farmakologi antara lain antibakteri, antifungi, insektisida, antikanker, antialergi maupun antipiretik. Bahkan, senyawa-senyawa aktif dari tumbuhan tersebut sudah dapat diisolasi dan diidentifikasi (Nugroho, dkk,2007).

Legundi telah banyak diteliti kandungan bioaktifnya dan memiliki beberapa efek farmakologi khususnya sebagai antikanker. Salah satunya adalah penelitian yang dilakukan oleh Hernández , *et.,al*, (1999) bahwa ekstrak n-heksana dan diklorometana dari batang dan daun spesies *Vitex trifolia* (Legundi)

terbukti sangat toksik terhadap sel kanker. Kandungan senyawa bioaktifnya adalah jenis flavonoid yaitu jenis persikogenin, artemetin, luteolin, penduletin, vitexicarpin dan chrysoplenol-D. Keenam flavonoid tersebut mampu menghambat proliferasi sel kanker dengan mekanisme penghambatan siklus sel dan menginduksi apoptosis (Li, *et.,al*, 2005).

Legundi mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai pestisida nabati, bagian tumbuhan yang dapat digunakan daun dan batang. Daun legundi mengandung minyak atsiri dan alkaloid. Kandungan alkaloid pada daun 8,7% dan kandungan minyak atsiri pada daun berkisar 0,28% . Minyak atsiri yang tersusun dari seskuiterpen, terpenoid, senyawa ester, vitrisin, glikosida flavonoid (persikogenin, artemetin, luteolin, penduletin, viteksikarpin dan krisosplenol-D) dan komponen non flavonoid friedelin,  $\beta$ -sitosterol, glukosida dan senyawa hidrokarbon, selain itu daun legundi mengandung alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid (Lina, 2006).

Legundi dapat dikembangbiakkan dengan cara vegetatif maupun generatif. Secara vegetatif umumnya diperbanyak melalui stek batang. Perkembangbiakkan secara generatif dapat dilakukan dengan menggunakan biji. Kendala yang dihadapi pada penggunaan biji untuk perbanyakan Legundi adalah lama waktu untuk terjadinya perkecambahan yaitu kurang lebih 8 minggu setelah disemai. Oleh karena itu, diperlukan perbanyakan tumbuhan secara vegetatif sehingga metabolit sekundernya dapat dihasilkan lebih banyak dan cepat. Menurut Yuwono (2006), tumbuhan juga dapat diperbanyak secara vegetatif menggunakan kultur *in vitro* dengan teknik kultur kalus. Kalus adalah massa sel yang aktifitas pembelahannya

tidak terorganisasi dan belum terdeferensiasi. Sel-sel ini secara alamiah dapat terbentuk dari bagian tumbuhan yang terluka atau dari kultur yang telah dilukai.

Menurut Yuwono (2006) budidaya *in vitro* dengan cara menginduksi kalus merupakan salah satu langkah penting. Santoso dan Nursandi (2003) mengemukakan, ada beberapa tujuan yang bisa dicapai dengan kultur kalus, diantaranya dapat digunakan untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder. Pada pendekatan ini, budidaya kalus tidak sekedar diarahkan untuk proliferasi kalus, akan tetapi diarahkan bagaimana kalus dapat memproduksi metabolit lebih tinggi.

Sehubungan dengan produksi metabolit dari kalus ini, Sitorus (2002) menyatakan bahwa metabolit yang dihasilkan dari kalus seringkali memiliki kadar lebih tinggi daripada bila diambil langsung dari tumbuhannya. Sebagaimana penelitian Alemi, *dkk.* (2013) bahwa kandungan *Thymoquinone* pada tumbuhan Jinten hitam (*Nigella sativa* L.) yang dihasilkan dari ekstrak biji hanya 0,74 mg/ml sedangkan yang dihasilkan dari ekstrak kalus daun sebanyak 8,78 mg/ml. Oleh karena itu, pertumbuhan kalus melalui kultur jaringan menjadi hal yang penting untuk produksi metabolit sekunder.

Senyawa metabolit sekunder memang dapat diperoleh secara konvensional yaitu dengan ekstraksi langsung dari organ tumbuhan. Namun cara tersebut tidak efisien karena membutuhkan budidaya tumbuhan dalam skala besar sehingga memerlukan lahan yang luas untuk membudidayakan tumbuhan tersebut. Di samping itu, proses ekstraksi, isolasi, dan pemurniannya membutuhkan tumbuhan

legundi yang cukup banyak untuk menghasilkan banyak senyawa metabolit sekundernya. Oleh karena itu, usaha-usaha untuk mendapatkan metabolit sekunder terus menerus dilakukan dan penelitian-penelitian dengan memanfaatkan kultur jaringan tumbuhan saat ini merupakan pilihan yang tepat untuk dikembangkan (Lenny, 2006).

Kultur jaringan memiliki kelebihan dalam produksi senyawa bioaktif dibanding dengan budidaya tumbuhan secara utuh, sebab melalui kultur jaringan tidak dibatasi oleh iklim, tidak memerlukan lahan yang luas, dan senyawa bioaktif dapat dihasilkan secara terus menerus dalam keadaan yang terkendali (Collin dan Edward, 1998). Selain itu, melalui kultur kalus juga dapat menjamin kesinambungan kerja kultur, yang artinya dengan tindakan kultur kalus suatu produk dari kegiatan kultur yang terdahulu akan tetap punya fungsi terhadap kegiatan kultur selanjutnya. Ketersediaan kalus akan selalu ada tanpa harus melalui inisiasi ulang, disamping juga untuk memperbanyak jumlah kalus itu sendiri yang berguna baik untuk produksi metabolit sekunder maupun perbanyakan tumbuhan.

Di sisi lain, keberhasilan dalam penggunaan metode kultur jaringan sangat tergantung pada media yang digunakan, dalam hal ini penambahan zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh adalah senyawa organik yang dapat merangsang, menghambat atau mengubah pola tumbuhan dari perkembangan tumbuhan (Gunawan, 1992). Menurut Gunawan (1992), saat melakukan kultur jaringan *in vitro* selain media yang digunakan juga zat pengatur tumbuh yang ditambahkan.

Di dalam kultur jaringan, ada dua golongan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang mempunyai pengaruh penting yaitu sitokinin dan auksin. ZPT yang diberikan dalam



media dan yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur, sehingga mempengaruhi proses-proses pertumbuhan dan morfogenesis (Astuti dan Andayani, 2005). ZPT auksin mendorong pembentukan ke arah akar dan ZPT sitokinin dapat mendorong pembentukan ke arah tunas. Zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin tidak bekerja sendiri-sendiri, tetapi kedua ZPT tersebut saling terinteraksi dalam mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Karjadi dan Buchory, 2007). Penggunaan sitokinin mempunyai peranan penting jika bersamaan dengan auksin yaitu merangsang pembelahan sel dalam jaringan yang disebut eksplan serta merangsang pertumbuhan tunas dan daun (Yuswindasari, 2010). Kombinasi antara hormon sitokinin dan juga auksin digunakan karena hormon sitokinin dapat bekerja dalam membantu pembelahan sel pada tumbuhan, sedangkan hormon auksin bekerja dalam diferensiasi dan pemanjangan sel.

Kombinasi ZPT yang digunakan harus diperhatikan karena jumlah konsentrasi ZPT yang digunakan akan mempengaruhi pertumbuhan eksplan yang ditumbuhkan. Permasalahan konsentrasi sebenarnya sudah disinggung dalam Al-Quran Surat Al-Qomar ayat 49 sebagai berikut :

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Artinya : “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*” (QS. Al-Qamar (54) : 49)

Ayat tersebut diatas menurut tafsir Ibnu Katsir dapat dijelaskan bahwa Allah SWT menetapkan suatu ukuran terhadap semua makhluk ciptaan-Nya. “ukuran”

dalam penelitian ini adalah konsentrasi ZPT yang tepat untuk menumbuhkan kalus *Legundi (Vitex trifolia Linn)*.

Di dalam penelitian ini digunakan ZPT 2,4 D sebagai bentuk dari auksin. Hal ini dilandasi pemikiran Hendaryono dan Wijayani (1994) bahwa 2,4- D merupakan golongan auksin sintesis yang mempunyai sifat lebih stabil daripada IAA, karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel atau pemanasan pada proses sterilisasi. Penambahan auksin dalam jumlah yang lebih besar, atau penambahan auksin yang lebih stabil, seperti 2,4-D cenderung menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi pucuk tumbuhan (Wetherell, 1982). Peran auksin adalah merangsang pembelahan dan perbesaran sel yang terdapat pada pucuk tumbuhan dan menyebabkan pertumbuhan pucuk-pucuk baru. Kurniati (2012) menyatakan, zat pengatur tumbuh 2,4-D memiliki sifat yang lebih baik dibandingkan jenis auksin sintetik lainnya, karena lebih mudah diserap tanaman, tidak mudah terurai dan berfungsi memicu aktivitas morfogenik. Selain itu 2,4-D juga merupakan auksin yang tahan terhadap fotooksidasi. Maneses (2005) menambahkan, 2,4-D Senyawa 2,4-D berperan dalam memacu hipermethylasi pada DNA, sehingga pembelahan sel selalu dalam fase mitosis. Dengan demikian maka pembentukan kalus menjadi optimal. 2,4-D merupakan auksin yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tumbuhan (Bhojwani dan Razdan, 1996).

Di samping itu, pada penelitian ini hormon sitokinin yang digunakan adalah TDZ. TDZ adalah senyawa yang mirip dengan sitokinin yang dapat menginduksi

perbanyak tunas lebih cepat daripada sitokinin jenis lain dan mempunyai pengaruh yang sangat cepat dalam menumbuhkan eksplan. TDZ sering digunakan untuk memberikan sebuah ‘pemicu awal’ pada kultur baru, terutama tumbuhan berkayu. Hal ini sesuai dengan penggunaan TDZ pada penelitian ini yakni pada tumbuhan Legundi yang merupakan tumbuhan berkayu (Khawar *et al.*, 2003). George (1984) menyatakan bahwa TDZ dapat menginduksi pembelahan sel secara cepat pada sel maristem sehingga terbentuk primordia tunas. Senyawa organik tersebut merupakan derivat urea yang tidak mengandung rantai purin yang umumnya dimiliki oleh sitokinin. TDZ juga lebih efektif daripada zeatin dalam kemiripan dengan aktivitas sitokinin endogen (Bollmark *et al.*, 1998). TDZ juga terbukti dapat menginduksi kalus daun Legundi tanpa auksin meskipun tidak maksimal. Dibandingkan dengan penelitian Muzdalifah (2017) pada kombinasi 0 mg/l Picloram + 0-3 mg/l Kinetin tidak dapat menginduksi kalus sama sekali artinya kalus tidak muncul pada eksplan daun Nilam Aceh.

Penelitian mengenai Legundi masih hanya sebatas tentang kalus untuk perbanyak yaitu kalus embriogenik. Puspitasari (2002) menyatakan pada penelitiannya bahwa konsentrasi paling sesuai untuk penumbuhan kalus legundi dengan inisiasi yang efektif ialah pada kombinasi 1 mg/l 2,4 D + 1 mg/l Kinetin melalui eksplan daun. Dalam penelitian Arulanandam (2011) menunjukkan bahwa kombinasi 2,4 D 1,5 mg/l + Kinetin 0,3 mg/l memberikan persentase kalus tumbuh tertinggi yaitu sebesar 88% dari eksplan daun. Dalam penelitian Samantaray (2013) menunjukkan bahwa eksplan daun yang diberi perlakuan kombinasi 9,05 - 11,3  $\mu$ M

2,4 D + 0,04- 0,44  $\mu$ M BA menyebabkan kalus tumbuh paling cepat yaitu selama 4 minggu.

Penggunaan TDZ memberikan pengaruh yang cepat pada eksplan yang merupakan tumbuhan berkayu seperti *Azalea*, *Prunus* maupun *Acer*, dan pada spesies berbatang lunak seperti *Asteraceae* dan *Liliaceae* (Pelletier *et al.*, 2004). Hasil penelitian Lima, *dkk* (2006) menunjukkan bahwa kombinasi ZPT 2,4 D 2 mg/l dan TDZ 0,5 mg/l pada eksplan daun *Croton urucurana* Baill mampu menginduksi kalus terbaik yakni kalus yang kompak yang dapat menghasilkan metabolit sekunder.

Pierik (1987) menyatakan bahwa struktur pada kalus dapat bervariasi dari kompak hingga remah, tergantung pada jenis tumbuhan yang digunakan, komposisi nutrien media, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan kultur. Oleh karena itu, pada penelitian ini ditetapkan konsentrasi ZPT beserta konsentrasinya yakni 2,4 D dan TDZ. Berdasarkan latar belakang masalah diatas maka penelitian yang berjudul pengaruh kombinasi 2,4 D dan TDZ terhadap pertumbuhan kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) ini penting untuk dilakukan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini ialah sebagai berikut :

1. Apakah terdapat pengaruh pemberian berbagai konsentrasi 2,4 D terhadap induksi kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) secara *in vitro* ?
2. Apakah terdapat pengaruh pemberian berbagai konsentrasi TDZ terhadap induksi kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) secara *in vitro* ?

3. Apakah terdapat pengaruh interaksi 2,4 D dan TDZ terhadap induksi kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) secara *in vitro* ?

### 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini ialah sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi 2,4 D terhadap induksi kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi TDZ terhadap induksi kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) secara *in vitro*.
3. Untuk mengetahui adanya pengaruh interaksi 2,4 D dan TDZ terhadap induksi kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) secara *in vitro*.

### 1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ialah sebagai berikut :

1. Mendapatkan ilmu pengetahuan khususnya di bidang kultur *in vitro* yang berkaitan dengan kultur kalus tumbuhan Legundi (*Vitex trifolia* Linn).
2. Memperoleh konsentrasi kombinasi 2,4-D dengan TDZ yang terbaik untuk memacu pertumbuhan kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) secara kultur *in vitro* sehingga dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang optimal dibandingkan dengan cara memperoleh metabolit sekunder dari tumbuhannya langsung.
3. Sebagai tambahan informasi untuk penelitian selanjutnya di bidang kultur jaringan tumbuhan, yang berkaitan dengan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kalus metabolit.

### 1.5 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini ialah sebagai berikut :

1. Terdapat pengaruh pemberian berbagai konsentrasi 2,4 D terhadap induksi kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) secara *in vitro*.
2. Terdapat pengaruh pemberian berbagai konsentrasi TDZ terhadap induksi kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) secara *in vitro*.
3. Terdapat pengaruh interaksi 2,4 D dan TDZ terhadap induksi kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) secara *in vitro*.

### 1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini ialah sebagai berikut :

1. Penelitian ini hanya terbatas pada pertumbuhan kalus meliputi hari muncul kalus yang diamati mulai dari hari setelah tanam, berat basah dan persentase kalus yang diukur pada 30 HST, warna kalus dan tekstur kalus diamati setiap hari selama masa tanam.
2. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS.
3. Zat pengatur tumbuh yang digunakan yaitu, 2,4-D dan TDZ.
4. Kombinasi konsentrasi 2,4 D meliputi 0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, dan 3 mg/l.  
Konsentrasi TDZ meliputi 0 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, dan 0,75 mg/l.
5. Bagian tumbuhan yang digunakan sebagai eksplan adalah daun muda yang berwarna hijau muda nomer 3 dari pucuk tumbuhan Legundi (*Vitex trifolia* Linn) yang diperoleh dari Materia Medica, Batu-Malang.

6. Parameter yang diamati secara kualitatif meliputi warna kalus dan tekstur kalus. Sedangkan secara kuantitatif meliputi hari muncul kalus, persentase tumbuh kalus dan berat basah kalus.
7. Kalus yang diinginkan ialah yang bertekstur kompak dan berwarna kuning atau kuning kecoklatan.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Legundi (*Vitex trifolia* Linn.)

##### 2.1.1 Kajian Legundi (*Vitex trifolia* Linn.) dalam Perspektif Islam

Tumbuhan adalah salah satu dari berbagai ciptaan Allah SWT yang ada di bumi. Tumbuhan tercipta dengan karakteristik dan manfaatnya masing-masing, hal ini menyebabkan tumbuhan tidak dapat terpisahkan dari kehidupan manusia. Allah SWT menumbuhkan tumbuhan yang bermacam-macam, seperti yang tertera dalam Al-Quran Surat Thaha (20) : 53 yang berbunyi :

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا  
مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

*Artinya : “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan Yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” (QS. Thaha (20) : 53).*

Ayat tersebut diatas ditafsirkan oleh Maraghi (1993) bahwa Allah menurunkan air hujan untuk menumbuhkan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan, seperti palawija, buah-buahan, dengan berbagai rasa, baik manis maupun asam. Allah SWT juga menyertakan berbagai manfaat dalam tumbuh-tumbuhan bagi manusia maupun bagi hewan. فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا mengandung arti bahwa Allah menciptakan segala sesuatu di dunia ini berpasang-pasangan. Syanqithi (2007) menafsirkan نَبَاتٍ شَتَّى sebagai jenis tumbuhan yang bermacam-macam manfaat,



bentuk warna, ukuran, bau, dan rasa. Sehingga dapat diartikan bahwa Allah menciptakan tumbuhan yang mempunyai berbagai macam manfaat. Dalam ayat lain Allah SWT berfirman tentang penumbuhan tumbuh-tumbuhan yang baik dalam Al-Quran surat Asy-Syu'ara' (26):7 yang berbunyi :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik”.

Penafsiran dari ayat tersebut dapat diartikan dengan 3 poin. Yakni poin pertama pada lafadz *أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ* , poin kedua *كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا* , poin ketiga *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* . Adapun *أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ* mengandung makna perintah untuk meneliti. *كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا* mengandung makna dunia tumbuhan. Dimana *أَنْبَتْنَا* , disertai dengan isim dlomir *نَا* yang berarti ada campur tangan antara Allah SWT dengan makhluknya. Yang dimana manusia sebagai khalifah di bumi ini juga mengambil peranan dalam penumbuhan tumbuh-tumbuhan seperti halnya dalam penelitian ini dengan melalui kultur jaringan tumbuhan. *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* mengandung makna bahwa segala sesuatu di dunia ini diciptakan berpasang-pasangan. Dalam hal ini di biologi sebagaimana contoh ialah ekologi yakni harus ada keseimbangan. *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* menurut Al-Sheikh (2000) juga diartikan sebagai tumbuhan yang baik dan indah dipandang. Adapun juga kalimat diatas mengandung makna tumbuh-tumbuhan yang baik juga dapat diartikan sebagai tumbuhan yang bermanfaat. Bermanfaat

disini juga dapat berfungsi untuk makanan maupun obat-obatan untuk menyembuhkan juga dapat disebut sebagai tumbuhan herbal. Fitryah (2013) mengartikan kata herbal sebagai tumbuhan yang dapat dijadikan sebagai obat baik akar, batang, daun, bunga, buah, maupun bijinya. Lebih luas dapat dimaknai sebagai tumbuhan yang seluruh bagiannya mengandung senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai obat.

Dijelaskan dalam *Tafsir Al-Misbah* (Shihab, 2001), bahwa ayat diatas meminta manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seluruh bumi, dengan aneka keajaiban yang terhampar pada tumbuh-tumbuhannya.

Ayat ini menurut *Tafsir Ibnu Katsir* (2007), Allah ta'ala mengingatkan kebesaran kekuasaan-Nya dan keagungan kemampuan-Nya. Dialah yang Maha Agung, Maha Perkasa yang telah menciptakan bumi dan menumbuhkan didalamnya tumbuh-tumbuhan yang baik berupa tanam-tanaman, buah-buahan, dan hewan. “*Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda*”. yaitu tanda kekuasaan Maha Pencipta.

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah benar-benar telah menciptakan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik. Tumbuhan yang baik disini mempunyai arti bahwa berbagai tumbuhan tersebut tidak hanya sekedar ditumbuhkan di bumi ini, melainkan dapat digunakan untuk keperluan manusia karena mempunyai manfaat. Satu dari sekian banyak tumbuhan ciptaan Allah SWT adalah Legundi (*Vitex trifolia* Linn).

### 2.1.2 Klasifikasi Tanaman Legundi (*Vitex trifolia* Linn.)

Nama Daerah : Gendarasi (palembang), Lagundi, Lilegundi (Minangkabau), Lagondi (sunda), Legundi (jawa), Galumi (sumbawa), Sangari (bima), Lenra (makasar), Lawarani (bugis), Ai tuban (ambon) Nama Asing : Man Jing ( Cina), simpleleaf shrub chastetree (inggris) (Heyne, 1981). Berdasarkan taksonomi legundi termasuk dalam (Ahmed, 2012) :

Kerajaan : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Kelas : Dicotyledonae

Bangsa : Lamiales

Suku : Verbenaceae

Marga : Vitex

Jenis : *Vitex trifolia* Linn.

### 2.1.3 Morfologi Legundi (*Vitex trifolia* Linn.)

Legundi merupakan tumbuhan anggota Verbenaceae. Perdu, tumbuh tegak, tinggi 1-4 m, batang berambut halus. Daun majemuk menjari beranak daun tiga, bertangkai, helaian anak daun berbentuk bulat telur sungsang, ujung dan pangkal runcing, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan atas berwarna hijau, permukaan bawah berambut rapat warna putih, panjang 4-9,5 cm, lebar 1,75-3,75 cm. Bunga majemuk berkumpul dalam tandan, berwarna ungu muda, keluar dari ujung tangkai. Buahnya berbentuk bulat. Daun berbau aromatik khas dan dapat

digunakan untuk menghalau serangga atau kutu lemari (Dalimartha, 2000). Bentuk morfologi dari daun legundi sebagai gambar berikut ini :



**Gambar 2.1 Tanaman Legundi (Ahmed, 2012)**

#### **2.1.4 Habitat Legundi (*Vitex trifolia* Linn.)**

Legundi tumbuh pada tempat-tempat yang tandus, panas dan berpasir. Ditemukan tumbuh liar di hutan jati, hutan sekunder, semak belukar, atau dipelihara sebagai tanaman pagar (Heyne, 1981).

#### **2.1.5 Kandungan dan Manfaat**

Beberapa senyawa kimia yang terkandung dalam legundi diantaranya camphene, L- $\alpha$ -pinene, silexicarpin, casticin, terpenyl acetate, luteolin-7-glucoside flavopurposid, vitrisin, dihidroksi asam benzoate dan vitamin A. Efek farmakologis legundi diantaranya sebagai obat influenza, demam, migren, sakit kepala, sakit gigi, sakit perut, mata merah, diare, rematik, beri-beri, batuk, luka terpukul, luka berdarah, muntah darah, eksim, haid tidak teratur, dan pembunuh serangga (Hariana, A. 2009). Daun legundi berkhasiat sebagai analgesik, antipiretik, obat luka, peluruh kencing, peluruh kentut, pereda kejang, germicide (pembunuh kuman), batuk kering, batuk rejan, beri-beri, sakit tenggorokan, muntah darah, obat cacing, demam nifas, sakit kepala, TBC, turun peranakan, tipus dan peluruh keringat. Pada pemakaian luar digunakan untuk mengatasi eksim dan kurap

(Sudarsono *dkk*, 2002). Demikian pula Legundi, daun tumbuhan ini sering digunakan untuk obat analgesik, obat luka, obat cacing, obat tipus, pereda kejang, menormalkan siklus haid, dan pembunuh kuman (Sudarsono, *dkk*, 2002).

## **2.2 Kultur Jaringan**

### **2.2.1 Pengertian Kultur Jaringan**

Kultur jaringan adalah teknik perbanyakan tanaman dengan cara memperbanyak jaringan mikro tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* menjadi tanaman yang sempurna dalam jumlah yang tidak terbatas. Prinsip dasar kultur jaringan adalah totipotensi sel, yaitu bahwa setiap sel organ tanaman mampu tumbuh menjadi tanaman yang sempurna bila ditempatkan di lingkungan yang sesuai yakni dengan iklim, suhu, media dan ZPT pada media kultur jaringan (Yuliarti, 2010).

Kultur jaringan tanaman adalah upaya mengisolasi bagian-bagian tanaman (protoplas, sel, jaringan, dan organ), kemudian mengkulturkannya pada nutrisi buatan yang steril di bawah kondisi lingkungan terkendali sehingga bagian-bagian tanaman tersebut dapat beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali. Penggunaan istilah yang lebih spesifik, yaitu *mikropropagasi* terhadap pemanfaatan teknik kultur jaringan dalam upaya perbanyakan tanaman, dimulai dari pengkulturan bagian tanaman yang sangat kecil (eksplan) secara aseptik di dalam tabung kultur atau wadah yang serupa (Zulkarnain, 2009). Kultur *in vitro* adalah suatu metode untuk mengisolasi potongan jaringan tanaman dari kondisi alami pada media nutrisi dalam kondisi aseptik, yang dapat menjadi tanaman lengkap dan potongan jaringan yang diambil mampu mengadakan pembelahan sel perpanjangan (pembesaran sel)

sehingga membentuk shootlet (tunas), rootlet (akar), atau planlet (tanaman lengkap) (Azriati, 2010).

Beberapa keuntungan dari penggunaan teknik kultur jaringan adalah untuk produksi senyawa metabolit sekunder antara lain: tidak tergantung musim, sistem produksi dapat diatur sesuai kebutuhan, lebih konsisten, dan mengurangi penggunaan lahan (Sutini, 2008). Keuntungan perbanyak tanaman dengan menggunakan teknik kultur jaringan adalah (1) waktu perbanyak lebih cepat (2) jumlah benih yang dihasilkan tidak terbatas (3) jumlah eksplan yang digunakan sedikit (4) bebas hama dan penyakit (5) memerlukan lahan sempit (6) genotip sama dengan induknya (Surachman, 2011).

### **2.2.2 Prinsip Kultur Jaringan**

Beberapa prinsip dasar yang harus diperhatikan dalam melaksanakan teknik kultur jaringan, diantaranya mengetahui totipotensi sel yang dikemukakan oleh Schleiden dan Swann yaitu sel mempunyai kemampuan *outonom*, bahkan mempunyai kemampuan totipotensi. Totipotensi adalah kemampuan setiap sel, yang diambil dari suatu tempat dan apabila diletakkan pada tempat yang lain dapat tumbuh menjadi tanaman yang sempurna (Yusnita, 2003). Hubungan totipotensi ini dengan kultur jaringan lebih pada kemampuan sel untuk hidup. Oleh karena itu, dengan mengetahui totipotensi sel tumbuhan, dapat dipertimbangkan cara teknik pengkulturuannya karena kultur tumbuhan berarti meletakkan tumbuhan baik berupa sel maupun jaringan dari tumbuhan agar dapat tumbuh menjadi tumbuhan yang sempurna.

Memahami sifat kompeten, diferensiasi dan determinasi di mana suatu sel akan dikatakan kompeten apabila sel atau jaringan tersebut mampu memberikan tanggapan terhadap signal lingkungan atau signal secara kultur jaringan serta mampu memahami tata cara perbanyakan tanaman secara kultur jaringan (Yusnita, 2003). Signal lingkungan tersebut dapat ditandai dengan kemampuan sel atau jaringan untuk bertahan hidup saat dilakukan pengkulturan. Hal tersebut biasanya ditandai dengan tumbuhnya tunas, akar, maupun kalus dan tidak terjadi kematian sel atau jaringan. Konsep Skoog dan Miller yang menyatakan bahwa regenerasi tunas dan akar *in vitro* dikontrol secara hormonal oleh Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) sitokinin dan auksin. Pembentukan regenerasi tunas, akar, maupun kalus termasuk dalam organogenesis. Sebagaimana pendapat Yusnita (2003) Organogenesis adalah proses terbentuknya organ seperti tunas atau akar baik secara langsung dari permukaan eksplan atau secara tidak langsung dari permukaan eksplan atau melalui pembentukan kalus terlebih dahulu.

### **2.2.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Kultur Jaringan**

Menurut Santoso dan Nursandi (2004), ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan diantaranya ialah (1) Genotif (2) Eksplan (3) Komposisi media (4) Kondisi lingkungan. Genotif pada beberapa jenis tumbuhan embrio mudah tumbuh akan tetapi pada beberapa jenis tumbuhan embrio mudah tumbuh akan tetapi pada beberapa jenis tumbuhan lain sukar untuk tumbuh. Hal ini disebabkan oleh perbedaan genetik dari jaringan yang sama (Santoso dan Nursanti, 2004).

Eksplan dapat berupa sel, jaringan atau organ yang digunakan sebagai bahan inokulum dan ditanam dalam media kultur, bagian yang digunakan sebagai eksplan adalah sel yang aktif membelah, dari tanaman induk sehat dan berkualitas tinggi. Ukuran eksplan kecil memiliki ketahanan yang kurang baik dan bila eksplan terlalu besar, akan mudah terkontaminasi (Santoso dan Nursanti, 2004). Komposisi media juga mempengaruhi keberhasilan dalam kultur jaringan, karena media sebagai sumber makanan harus mengandung senyawa organik dan anorganik, seperti nutrisi makro dan mikro dalam kadar dan perbandingan tertentu, gula, air, asam amino, vitamin, dan ZPT (Santoso dan Nursandi, 2004).

Kondisi lingkungan sangat menentukan terhadap tingkat keberhasilan pembiakan tanaman dengan kultur jaringan. Kondisi lingkungan yang harus dibentuk adalah lingkungan yang aseptis. Lingkungan aseptis akan menurunkan tingkat kontaminasi pada eksplan sehingga meningkatkan keberhasilan dalam proses kultur jaringan (Santoso dan Nursandi, 2004)

Oksigen dan cahaya juga merupakan dua faktor yang mempengaruhi keberhasilan tidaknya kultur jaringan. Suplai oksigen yang sangat menentukan laju multiplikasi tunas dalam usaha perbanyakan secara *in vitro*. Selain itu intensitas cahaya yang rendah dapat mempertinggi embriogenesis dan organogenesis. Intensitas cahaya optimum pada kultur 0-1000 lux (inisiasi), 1000-10000 (multiplikasi), 10000-30000 (pengakaran) dan <30000 untuk aklimatisasi. Perkembangan embrio membutuhkan tempat gelap kira-kira selama 7-14 hari. Baru dipindahkan ke tempat terang untuk pembentukan klorofil (Santoso dan Nursandi, 2004).



Tumbuhan juga membutuhkan temperatur yang optimum. Secara normal temperatur yang digunakan adalah antara 22°C-28°C. Sel-sel yang dikembangkan dengan kultur jaringan memiliki toleransi pH yang relatif sempit dan tidak normal antara 5-6. Apabila eksplan sudah tumbuh biasanya pH media umumnya akan naik (Santoso dan Nursandi, 2004).

#### 2.2.4 Masalah dalam Kultur Jaringan

Pada kultur jaringan tidak sedikit masalah yang dapat terjadi sebagai penyebab kegagalan. Masalah dalam kultur jaringan menurut Mariska dan Sukmadja (2003) diantaranya ialah (1) Kontaminasi (2) *Browning* (3) Verifikasi (4) Mutasi. Kontaminasi adalah gangguan yang sering terjadi pada kultur. Kontaminasi dapat dilihat dari jenis kontaminan, seperti bakteri, jamur, dan virus. Selain itu, dapat berdasarkan waktunya yaitu hitungan jam, hitungan hari, dan minggu, serta berdasarkan sumber kontaminan dari media atau eksplan (Mariska dan Sukmadjaja, 2003).

*Browning* atau pencoklatan adalah karakter yang dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan (hitam atau coklat). Terjadi perubahan aktif eksplan disebabkan pengaruh fisik maupun biokimia (memar, luka, atau serangan penyakit) (Mariska dan Sukmadjaja, 2003).

Verifikasi umumnya terjadi akibat kegagalan pada proses pembentukan daging sel dan hambatan pada proses pembentukan lignin. Hal ini dapat diatasi dengan cara menaikkan sukrosa, menambah pektin, memindahkan eksplan pada suhu 40 °C selama 15 hari (Mariska dan Sukmadjaja, 2003).

Kendala yang sering ditemukan sebagai penghambat antara lain, adanya mutasi pada bibit yang dihasilkan sehingga berbeda dengan induknya, keberhasilan induksi perakaran dari tunas yang telah dibentuk secara *in vitro* sedikit, aklimatisasi sering gagal, tingkat keanekaragaman di setiap generasi turun terutama apabila sering dilakukan sebkultur (Mariska dan Sukmadjaja, 2003).

### **2.2.5 Pemilihan Eksplan**

Pertumbuhan dan morfogenesis dalam mikropropagasi sangat dipengaruhi oleh keadaan jaringan tanaman yang digunakan sebagai eksplan. Selain faktor genetik eksplan yang telah disebutkan di atas, kondisi eksplan yang mempengaruhi keberhasilan teknik mikropropagasi adalah jenis eksplan, ukuran, umur dan fase fisiologis jaringan yang digunakan sebagai eksplan. Meskipun masing-masing sel tanaman memiliki kemampuan totipotensi, namun masing-masing jaringan memiliki kemampuan yang berbeda-beda untuk tumbuh dan beregenerasi dalam kultur jaringan (Fatimah, 2011). Gunawan (1995), menyatakan bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai eksplan adalah: pucuk muda, batang muda, daun muda, kotiledon, hipokotil. Bagian-bagian tersebut digunakan dikarenakan pada sel-sel yang masih muda dan masih hidup serta masih dapat tumbuh dan berdiferensiasi dalam media kultur.

### **2.3 Media Kultur Jaringan**

Media menurut Nugrahani (2011) merupakan faktor utama dalam perbanyakan dengan kultur jaringan, media adalah tempat bagi jaringan untuk tumbuh dan mengambil nutrisi dan mengambil nutrisi yang mendukung kehidupan

jaringan. Media tumbuh menyediakan berbagai bahan yang diperlukan untuk hidup dan memperbanyak dirinya.

Nugrahani (2011) menambahkan bahwa media yang digunakan biasanya terdiri dari unsur hara makro dan mikro dalam bentuk garam mineral, vitamin, dan Zat Pengatur Tumbuh (hormon). Selain itu diperlukan juga bahan tambahan seperti gula, agar, arang aktif, bahan organik lain (air kelapa, bubur pisang, ekstrak buah, ekstrak kecambah). Media yang sudah jadi ditempatkan pada tabung reaksi atau botolo kaca dan disterilisasi. Komposisi media yang digunakan tergantung dari tujuan dan jenis tanaman yang dikulturkan.

Media kultur jaringan pada awalnya memiliki komposisi yang didasarkan pada bahan yang digunakan untuk kegiatan *hydroponic* yang berkembang sebelumnya. Biasanya dalam kultur jaringan unsur hara diberikan dalam kultur jaringan dalam bentuk garam organik. Pada perkembangan selanjutnya para peneliti mulai menambahkan vitamin, senyawa kompleks, dan Zat pengatur Tumbuh (ZPT) (Santoso, 2004).

Menurut Hendryono dan Wijayanti (1994), dalam kultur jaringan ada beberapa jenis media diantaranya Media dasar B5 (Gamborg) untuk subkultur suspensi sel kedelai dan alfafa, medium dasar white biasanya digunakan untuk kultur akar, medium VW biasanya digunakan khusus untuk media anggrek, media WPM biasanya digunakan untuk tanaman berkayu dan medium MS adalah media yang paling umum dan banyak digunakan.

## 2.4 Zat Pengatur Tumbuh

### 2.4.1 Definisi

Zat pengatur tumbuh juga dapat disebut hormon. Hormon berasal dari bahasa Yunani yaitu hormaein yang mempunyai tumbuh arti merangsang atau mendorong timbulnya suatu aktivitas biokimia. Fitohormon didefinisikan sebagai senyawa organik yang bekerja aktif dalam jumlah sedikit, ditransportasikan ke seluruh bagian tanaman sehingga dapat mempengaruhi pertumbuhan atau proses fisiologi tanaman (Sumiarsi, 2002). Kehadiran zat pengatur tumbuh ini, dalam kultur *in vitro* sangatlah nyata pengaruhnya. Sangat sulit untuk menerapkan teknik kultur *in vitro* pada upaya perbanyak tanaman tanpa melibatkan zat pengatur tumbuhnya.

Zat pengatur tumbuh (ZPT) pada tanaman adalah senyawa organik yang bukan termasuk unsur hara (nutrisi), yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung (promote), menghambat (inhibit), dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. Zat pengatur tumbuh pada tanaman terdiri dari lima kelompok, yaitu auksin, giberellin, sitikoinin, etilen, dan inhibitor dengan ciri khas dan berpengaruh yang berlainan terhadap proses fisiologis. Pada kultur kalus zat pengatur tumbuh yang biasanya dipakai adalah dari golongan auksin dan sitokinin (Abidin, 1983).

Menurut Zulkarnain (2009) Auksin adalah sekelompok senyawa yang fungsinya merangsang pemanjangan sel-sel pucuk yang spektrum aktivitasnya menyerupai IAA (*Indole-3acetic acid*) Pierik (1997) menyatakan bahwa pada umumnya auksin meningkatkan pemanjangan sel, pembelahan sel, dan pembentukan akar adventif. Sedangkan sitokinin menurut Zulkarnain (2009) adalah senyawa yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta

mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Peranan auksin dan ditokinin sangat nyata dalam pengaturan pembelahan sel, pemanjangan sel, diferensiasi sel, dan pembentukan organ.

Giberelin menurut Zulkarnain (2009) ialah kelompok zat pengatur tumbuh yang terdiri atas kira-kira 60 macam senyawa, GA3 merupakan yang paling banyak dijumpai di dalam tanaman. Asam giberelat tidak begitu sering digunakan dalam kultur jaringan karena senyawa tersebut tidak tahan panas dan tidak dapat diautoklaf. Etilen menurut Zulkarnain (2009) adalah zat pengatur tumbuh yang strukturnya sederhana dan berbentuk gas.

Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan propagul *in vitro* antara lain eksplan, media tanam, kondisi fisik media, zat pengatur tumbuh, dan lingkungan tumbuh (Gunawan, 1998). Menurut Krishnamoorthy (1981) dan Wattinema (1998) zat pengatur tumbuh tanaman atau sering disebut *plant growth substance* adalah senyawa organik bukan nutrisi yang aktif dalam jumlah kecil ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$  mM) yang disintesis menuju bagian tertentu tanaman. Zat pengatur tumbuh ditranslokasikan ke bagian lain dari tanaman dimana zat tersebut akan menimbulkan tanggapan secara biokimia, fisiologis, dan morfologis.

Wattinema (1998) menyatakan bahwa suatu zat dapat dikategorikan zat pengatur tumbuh jika memenuhi beberapa syarat antara lain: senyawa organik yang terbentuk merupakan hasil kerja tanaman itu sendiri, harus dapat ditranslokasikan, tempat sintesis dan tempat bekerja suatu zat pengatur tumbuh berbeda, serta zat tersebut harus aktif dalam konsentrasi rendah.

### 2.4.2 Macam-macam ZPT

Zat pengatur tumbuh diperlukan untuk mengatur diferensiasi tanaman. Ada beberapa zat pengatur tumbuh yang biasa dipergunakan dalam kultur jaringan diantaranya golongan auxin meliputi IAA, NAA, IBA, 2,4-D ; golongan cytokinin meliputi Kinetin, BAP/BA, 2 i-p, zeatin, thidiazuron, PBA; golongan giberellin seperti GA3 (Nugrahani, 2011).

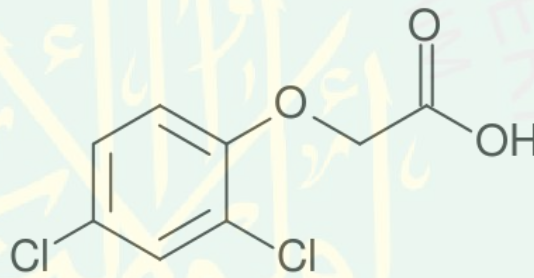
Pada umumnya, hormon yang banyak dipergunakan adalah golongan auksin dan sitokinin. Perbandingan komposisi antara kedua hormon tersebut akan menentukan perkembangan tanaman. Jika dosis auksin lebih tinggi dari sitokinin akan memicu perkembangan akar, sedangkan ketika dosis sitokinin lebih tinggi dari auksin maka akan memicu perkembangan tunas serta ketika dosis auksin seimbang dengan sitokinin maka akan memicu pertumbuhan kalus (Wattimena, 1998).

### 2.4.3 Penggunaan 2,4 D pada Kultur Jaringan Tumbuhan

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) merupakan jenis dari auksin sintetik yang banyak ditambahkan ke dalam media kultur jaringan (Gambar 2.2). 2,4-D merupakan senyawa sintesis yang dapat digunakan sebagai zat pengatur tumbuh maupun sebagai herbisida. Pemberian 2,4-D dalam jumlah kecil dapat memberikan respon pertumbuhan tapi jika diberikan dalam jumlah yang banyak dapat berfungsi sebagai herbisida yang menyebabkan kematian pada jaringan. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), 2,4-D bersifat stabil karena ZPT ini tidak mudah mengalami kerusakan jika terkena cahaya maupun pemanasan pada saat sterilisasi. 2,4-D sebagai auksin menyebabkan perluasan dan pemanjangan sel tidak terjadi tetapi memicu pembelahan sel. Pembelahan sel yang berlebihan dan

tidak diikuti dengan perluasan dan pemanjangan mengakibatkan terjadinya kalus. Pemberian 2,4-D pada medium dasar kultur *in-vitro* dapat menginduksi kalus dan menyebabkan pertumbuhan kalus terus berlangsung (Krinkorian 1995 dalam Darwati, 2007).

2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman (Bhojwani dan Razdan, 1996 dalam Syahid, 2007). Pemberian ZPT 2,4-D secara tunggal dapat merespon terjadinya inisiasi pembentukan kalus.



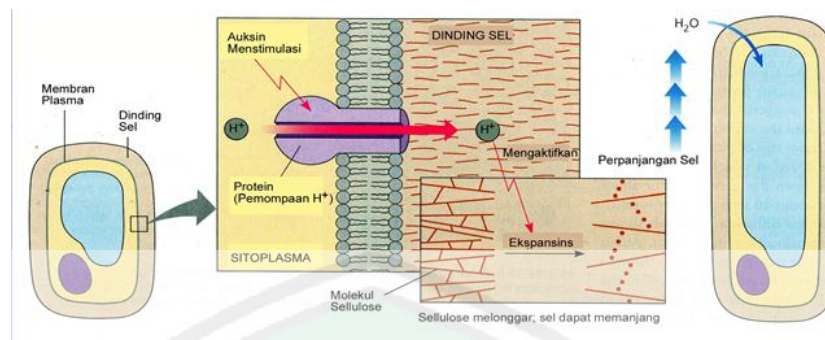
**Gambar 2.2 Struktur Molekul 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (Zulkarnain, 2009).**

Peran auksin dalam pemanjangan sel, walaupun auksin mempengaruhi beberapa aspek perkembangan tumbuhan, salah satu fungsi utamanya adalah untuk merangsang pemanjangan sel-sel didalam tunas-tunas muda yang sedang berkembang. Hormon tersebut merangsang pertumbuhan sel, barangkali dengan berikatan ke suatu reseptor di dalam membran plasma. auksin merangsang pertumbuhan hanya dalam konsentrasi tertentu, berkisar  $10^{-8}$  sampai  $10^{-4}$  M. Pada konsentrasi lebih tinggi auksin dapat menghambat pemanjangan sel, juga dapat

menginduksi produksi hormon etilen, yaitu sejenis hormon yang umumnya menghambat pemanjangan sel (Campbell, 2014).

Berdasarkan sebuah model yang disebut *hipotesis pertumbuhan asam (acid growth hypothesis)*, pompa pompa proton berperan utama di dalam respon pertumbuhan sel-sel terhadap auksin. Pada daerah pemanjangan tunas, auksin merangsang pompa proton ( $H^+$ ) di membran plasma. Pemompaan  $H^+$  ini meningkatkan voltase di kedua sisi membran (potensial membran) dan menurunkan PH di dalam dinding sel dalam waktu beberapa menit. Pengasman dinding sel mengaktifasi enzim-enzim yang disebut ekspansin yang mematahkan tautan silang (ikatan-ikatan hidrogen) antara mikrofibril-mikrofibril selulosa dan penyusun-penyusun dinding sel yang lain, sehingga melonggarkan materi dinding sel. Peningkatan potensial membran akan menambah pengambilan ion ke dalam sel, yang menyebabkan pengambilan osmotik air dan peningkatan turgor. Turgor dan plastisitas dinding sel memungkinkan sel untuk memanjang. Auksin juga mengubah ekspresi gen dengan cepat, sehingga menyebabkan sel-sel di daerah pemanjangan menghasilkan protein-protein baru dalam waktu beberapa menit. Beberapa dari protein-protein ini adalah faktor-faktor transkripsi berusia pendek yang menekan atau mengaktifasi ekspresi gen-gen yang lain. Untuk menjamin pertumbuhan yang berkelanjutan setelah ledakan pertumbuhan awal ini, sel harus membuat lebih banyak sitoplasma dan materi dinding. Auksin juga merespon pertumbuhan yang berkelanjutan ini (Campbell,2014). Sebagaimana pada gambar dibawah ini (gambar 2.3)

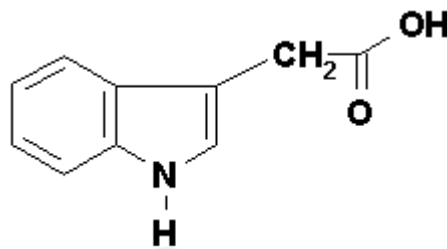




**Gambar 2.3 Pemanjangan sel sebagai respons terhadap auksin : hipotesis pertumbuhan asam**

#### 2.4.4 Penggunaan *Thidiazuron* (TDZ) pada Kultur Jaringan Tumbuhan

Sitokinin merupakan senyawa organik yang menyebabkan pembelahan sel yang dikenal dengan proses sitokinesis. Menurut Wattimena (1988), sitokinin mempengaruhi berbagai proses fisiologis di dalam tanaman terutama mendorong pembelahan sel. Selain itu sitokinin juga berpengaruh dalam ploriferasi tunas ketiak, penghambatan pertumbuhan akar dan induksi umbi mikro pada kentang. Sitokinin yang biasa digunakan adalah kinetin, zeatin, 2iP (N6-2-Isopentanyl Adenin), BAP (6-Benzyl Amino Purin), PBA, 2C 1-4 PU, 2,6-C1-4 dan TDZ (*thidiazuron*) (Gunawan, 1987). Adapun TDZ lebih efektif daripada zeatin dalam kemiripan dengan aktivitas sitokinin endogen (Bollmark, et al., 1988). Struktur TDZ disajikan pada (gambar 2.7)



**Gambar 2.4 Rumus bangun TDZ (Yusnita, 2003)**

Di samping sitokinin BA atau kinetin, penggunaan thidiazuron (TDZ) dapat pula meningkatkan kemampuan multiplikasi tunas. Thidiazuron dapat menginduksi pembentukan tunas adventif dan proliferasi tunas aksilar. Diduga *thidiazuron* mendorong terjadinya perubahan sitokinin ribonukleotida menjadi ribonukleosida yang secara biologis lebih aktif (Capella et al. dalam Lu, 1993). Thidiazuron merupakan senyawa organik yang banyak digunakan dalam perbanyakan *in vitro* karena aktivitasnya menyerupai sitokinin (Pierik, 1988). Thidiazuron berpotensi memacu frekuensi regenerasi pada kacang tanah (*Arachis hipogaea*) secara *in vitro*, dan memacu pembentukan tunas adventif pada beberapa jenis tumbuhan karena dapat menginduksi proses pembelahan sel secara cepat pada kumpulan sel meristem sehingga terbentuk primordia tunas. Senyawa organik tersebut merupakan derivat urea yang tidak mengandung rantai purin yang umumnya dimiliki oleh sitokinin (George, 1984).

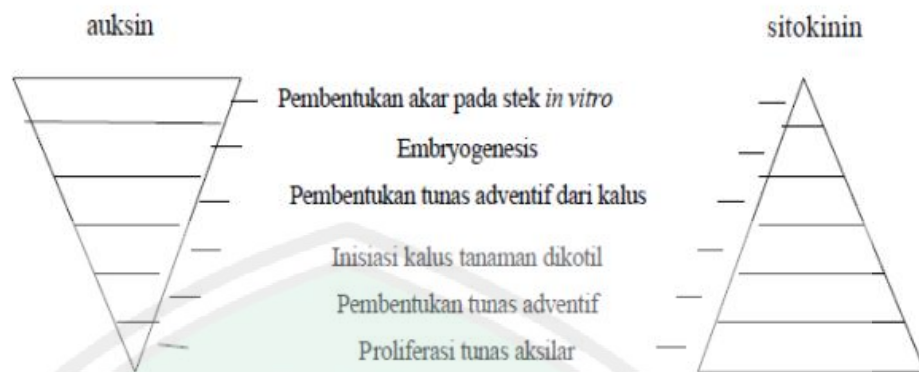
#### **2.4.5 Kerja Auksin dan Sitokinin**

Penggunaan sitokinin dan auksin dalam satu media dapat memacu proliferasi tunas karena adanya pengaruh sinergisme antara zat pengatur tumbuh tersebut (Davies, 1995). Penggunaan sitokinin mempunyai peranan penting jika

bersamaan dengan auksin yaitu merangsang pembelahan sel dalam jaringan yang dibuat eksplan serta merangsang pertumbuhan tunas dan daun (Wetherell 1982 dalam Yuswindasari 2010).

Zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin tidak bekerja sendiri-sendiri, tetapi kedua ZPT tersebut bekerja secara berinteraksi dalam mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Sitokinin merangsang pembelahan sel tanaman dan berinteraksi dengan auksin dalam menentukan arah diferensiasi sel. Apabila perbandingan konsentrasi sitokinin lebih besar dari auksin, maka pertumbuhan tunas dan daun akan terstimulasi. Sebaliknya apabila sitokinin lebih rendah dari auksin, maka mengakibatkan menstimulasi pada pertumbuhan akar. Apabila perbandingan sitokinin dan auksin berimbang, maka pertumbuhan akan tumbuh kalus (Karjadi dan Buchory, 2007).

Quainoo (2012) menyatakan pada penelitiannya bahwa kombinasi ZPT 2,4 D 2 mg/l dan 10  $\mu$ g/l pada tanaman *Cocoa* mampu menghasilkan kalus terbaik untuk menghasilkan kalus somatik embrio yakni kalus yang remah. Lima, *dkk* (2006) juga menyatakan pada penelitiannya bahwa kombinasi ZPT 2,4 D 2 mg/l dan TDZ 0,5 mg/l pada tanaman *Croton urucurana* Baill mampu menginduksi kalus terbaik yakni kalus yang kompak yang dapat menghasilkan metabolit sekunder.



**Gambar 2.5 Keseimbangan Auksin dan Sitokinin (George dan Sherrington, 1984)**

#### 2.4.6 Efek Hormon pada Aktivitas Gen

Lintasan transduksi sinyal merupakan suatu mekanisme yang menghubungkan suatu sinyal (stimulus) mekanik ataupun sinyal (stimulus kimia) menjadi suatu respon fisiologis seluler yang spesifik. Dipacu oleh hormon tumbuhan dan stimulus lingkungan. Tahapan-tahapan lintasan transduksi sinyal (Pangaribuan, 2013) :

##### 1. Resepsi (penerimaan)

Proses ini berlangsung di dalam membran plasma sel. Sinyal internal ataupun sinyal eksternal pertama kali dideteksi oleh reseptor. Reseptor adalah suatu protein yang mengalami perubahan penyesuaian di dalam respon terhadap stimulus yang spesifik. Reseptor yang terlibat pada respons greening disebut fitokrom.

## 2. Transduksi (pengalihan)

Proses ini berlangsung di dalam sitoplasma. Fitokrom mengaktifkan protein G yang tidak aktif (yaitu protein G yang mengikat GDP) menjadi protein yang aktif (yaitu protein G yang mengikat GTP).

Pada lintasan yang pertama :

- Protein G yang aktif mengaktifkan guanil siklase yaitu enzim yang menghasilkan GMP siklik (cGMP), yang berupa mesenjer ke dua.
- cGMP akan mengaktifkan untaian protein kinase

Pada lintasan yang ke dua :

- Protein G yang aktif menyebabkan saluran  $\text{Ca}^{+2}$  pada membran plasma membuka dan mempengaruhi perubahan di dalam  $\text{Ca}^{+2}$  sitosolik
- $\text{Ca}^{+2}$  kemudian mengikat protein kecil yang disebut kalmodulin dan membentuk kompleks kalmodulin  $\text{Ca}^{+2}$  sebagai mesenjer ke dua.
- Kompleks Kalmodulin  $\text{Ca}^{2+}$  akan mengaktifkan protein kinase spesifik.

## 3. Respons (tanggapan)

Berlangsung di dalam nukleus. Faktor transkripsi diaktifkan oleh fosforilasi . Pengaktifan faktor transkripsi ada yang tergantung pada cGMP dan ada yang tergantung kalmodulin  $\text{Ca}^{+2}$  . Faktor transkripsi langsung mengikat daerah spesifik dari DNA dan mengontrol transkripsi gen spesifik. Suatu sinyal akan mempengaruhi pertumbuhan yang tergantung pada:

- Pengaktifan faktor transkripsi positif (yang meningkatkan transkripsi gen spesifik)
- Pengnonaktifkan faktor transkripsi negatif (yang menurunkan transkripsi gen spesifik)
- Pengaktifan faktor transkripsi positif dan pengnonaktifkan faktor transkripsi negatif.

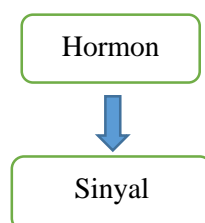
Transkripsi, translasi dan modifikasi protein adalah suatu peristiwa penting yang berhubungan dengan *greening*. Setelah translasi protein dimodifikasi oleh fosforilasi yang dikatalisis oleh protein kinase. Untaian protein kinase akan merangkaikan stimulus inisial ke respon seluler pada tahapan ekspresi gen melalui fosforilasi factor transkripsi. Akhirnya lintasan sinyal dapat mengatur sintesis protein baru dengan merangkaikan atau memutus gen spesifik.

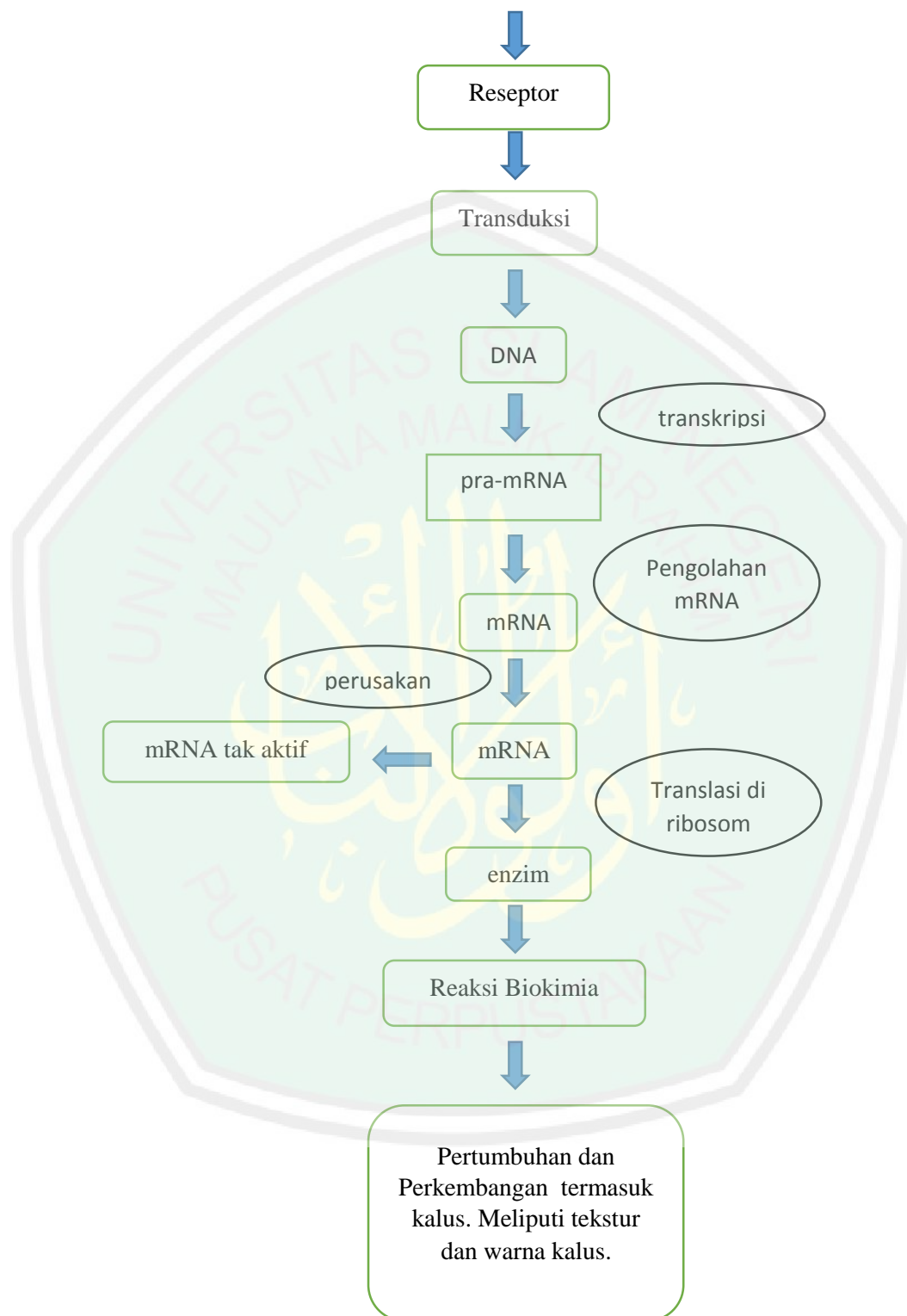
Jenis protein yang diaktifkan oleh fosforilasi selama proses *greening* yaitu Enzim yang berfungsi langsung dalam fotosintesis Enzim yang terlibat dalam mensuplai prekursor kimia yang dibutuhkan untuk pembentukan klorofil Enzim yang mempengaruhi tingkatan hormon tumbuhan yang mengatur pertumbuhan. Pemutusan lintasan sinyal yang berhubungan dengan *greening* dapat dikendalikan oleh protein fosfatase yaitu enzim yang mendefosforilasi protein spesifik.

Adapun salah satu hal yang dikerjakan hormon tumbuhan adalah mengendalikan aktivitas gen. Perlu ditekankan bahwa pengaktifan gen mengandung arti terjadi proses penguatan yang tinggi. Ini karena transkripsi berulang DNA menjadi menjadi DNA-kurir (mRNA), yang diikuti oleh translasi

mRNA menjadi enzim yang memiliki aktivitas katalisis yang tinggi pada konsentrasi rendah, dapat menghasilkan banyak salinan produk sel yang penting. Lalu, produk ini menentukan jenis organismenya, dan tentu saja wujud penampilannya (fenotipnya). Ada berbagai titik kendali dalam aliran informasi genetik, dari DNA sampai menjadi sebuah produk molekul. Salah satunya, yang barangkali paling penting, terdapat pada tingkat transkripsi. Titik kendali lainnya, juga terdapat di inti, mencakup pengolahan mRNA, sebab sebagian besar molekul mRNA terurai sebagian dan beberapa bagiannya terangkai kembali sebelum mereka meninggalkan inti. Langkah pengendalian ini dikendalikan oleh enzim yang kerjanya pasti diatur, dan mungkin hormon berperan dalam pengaturan ini. Selanjutnya mRNA meninggalkan inti, barangkali melalui pori inti. Di sitosol mRNA dapat ditranslasikan pada ribosom atau dirusak oleh ribonuklease. Jika mRNA ditranslasi menjadi enzim, perubahan pascatranslasi enzim tersebut dapat melalui berbagai proses, seperti fosforilasi, metilasi, asetilasi, glikosidasi, dan sebagainya. Pemacu hormon pertama akhirnya menyebabkan perubahan aktivitas enzim, proses metabolik yang berbeda, dan akhirnya jenis sel yang berbeda secara fisiologis dan morfologis. Berbagai perubahan seperti itu, yang disebabkan oleh berbagai macam hormon dan pemacu lingkungan, berinteraksi untuk membantu membentuk jaringan, organ, atau tumbuhan yang berlainan (Salisbury, 1991) .

Dijelaskan pada gambar 2.6 dibawah ini :





**Gambar 2.6** Kemungkinan beberapa tapak aktivitas gen untuk pengendalian hormon (Salisbury, 1991).



Gunawan (1992) menyatakan bahwa zat pengatur Tumbuh 2,4 D dan TDZ yang terlarut dalam media akan berdifusi masuk ke dalam sel-sel eksplan daun tumbuhan melalui luka pada ujung-ujung eksplan. Kedua zat pengatur tumbuh tersebut akan memacu pelunakan dinding sel dengan cara mengaktivasi pompa proton ion ( $H^+$ ) yang terletak pada membran plasma sehingga menyebabkan PH pada bagian dinding sel lebih rendah yaitu mendekati PH pada membran plasma sekitar (PH 4,5). Aktifnya pompa proton tersebut dapat memutuskan ikatan hidrogen diantara mikrofil selulosa dinding sel. Putusnya ikatan hidrogen menyebabkan dinding sel mudah merenggang sehingga tekanan dinding sel akan menurun dan mengakibatkan pelenturan sel. Mendegradasi bermacam-macam protein atau polisakarida yang menyebar pada dinding sel yang lunak dan lentur, sehingga pembesaran sel terjadi yakni menjadi kalus.

#### 2.4.7 Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh

Konsentrasi yang digunakan dalam kultur jaringan ini dengan kombinasi zat pengatur tumbuh yang harus tepat sasaran. Permasalahan konsentrasi sebenarnya sudah disinggung dalam Al-Quran Surat Al-Qamar/54 ayat 49 sebagai berikut :

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Artinya : “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*” (QS. Al-Qamar (54) : 49)

Ayat tersebut diatas menurut Ibnu Katsir dijelaskan bahwa Dia menetapkan suatu ukuran dan memberikan petunjuk terhadap semua makhluk kepada ketetapan

tersebut. “ukuran” disini dapat diartikan sebagai ukuran yg digunakan pada penelitian ini yakni konsentrasi ZPT. Dibalik kata “ukuran” tersebut harus lebih dikaji lagi. Sama halnya pentingnya mengkaji kombinasi ZPT dengan masing-masing konsentrasi yang tepat untuk menumbuhkan kalus pada tanaman legundi (*Vitex trifolia* Linn.).

Menentukan konsentrasi ZPT dapat menggunakan acuan konsentrasi ZPT pada penelitian sebelumnya. Penelitian ini berpacu pada penelitian Quainoo (2012) menyatakan pada penelitiannya bahwa kombinasi ZPT 2,4 D 2 mg/l dan 10  $\mu$ g/l pada tanaman *Cocoa* mampu menghasilkan kalus terbaik untuk menghasilkan kalus somatik embrio yakni kalus yang remah. Lima, *dkk* (2006) juga menyatakan pada penelitiannya bahwa kombinasi ZPT 2,4 D 2 mg/l dan TDZ 0,5 mg/l pada tanaman *Croton urucurana* Baill mampu menginduksi kalus terbaik yakni kalus yang kompak. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan kombinasi konsentrasi 2,4 D sebesar 0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, dan 3 mg/L. Sedangkan konsentrasi TDZ yang digunakan sebesar 0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, dan 0,75 mg/L.

Konsentrasi tersebut digunakan karena sitokinin harus lebih tinggi daripada auksin. Hal tersebut dikarenakan dalam pembentukan tunas, sitokininlah yang lebih bekerja. Hormon sitokinin bekerja pada pembelahan sel sedangkan auksin bekerja untuk diferensiasi yakni membantu pemanjangan seperti halnya dalam penelitian ini ialah tunas aksilar. Jika konsentrasi auksin lebih tinggi, maka yang terbentuk bukanlah akar namun lebih menginisiasi akar yang akan terbentuk. Hal ini didukung oleh pernyataan Karjadi dan Buchory (2007) bahwa apabila sitokinin lebih rendah dari auksin, maka mengakibatkan menstimulasi pada pertumbuhan

akar. Apabila perbandingan sitokinin dan auksin berimbang, maka pertumbuhan tunas, daun, dan akar akan berimbang pula.

#### 2.4.8 Kalus

Kalus adalah suatu kumpulan sel amorphous yang terbentuk dari sel-sel jaringan awal yang membelah diri secara terus-menerus. Pertumbuhan kalus dapat terjadi pada organ tumbuhan yang mengalami luka, sel-sel parenkim yang letaknya berdekatan dengan luka tersebut bersifat meristematik dan dapat membentuk massa sel yang tidak terdiferensiasi (Pandiangan, 2011).

Munculnya kalus diawali dengan menggembungnya eksplan daun dan mulai menggulung kemudian membengkak dan semakin besar. Kalus muncul dimulai dari bagian bekas dari perlukaan sampai semua eksplan menjadi kalus sebagai akibat dari proliferasi sel-sel penyusun kalus. Menurut Zulkarnain (2009) bahwa terbentuknya kalus merupakan akibat dari pelukaan pada permukaan eksplan dan pengaruh perlakuan zat pengatur tumbuh yang diberikan pada medium kultur. Utami *et al* (2007) menyatakan bahwa terjadinya kaus ditempat irisan bertujuan untuk menutup luka. Evans *et al.* (2003) menambahkan bahwa ketika tanaman dilukai maka kalus akan terbentuk akibat selnya mengalami kerusakan dan terjadi *autolisis* (pemecahan), dan dari sel di lapisan berikutnya sehingga terbentuk gumpalan sel-sel yang terdiferensiasi. Diketahui juga dari hasil pengamatan, kebanyakan kalus muncul awal melalui ujung tulang daun. Hal ini sesuai dengan pernyataan Nurwahyuni *dalam* Intias (2012) bahwa pertumbuhan kalus pada eksplan semakin meningkat apabila tulang-tulang daun yang mengandung bekas

atau jaringan pengangkut, hal ini disebabkan karena pada jaringan pengangkut tersebut terdapat nutrisi yang lebih banyak bila dibanding dengan jaringan daun yang tidak mempunyai berkas pengangkut.

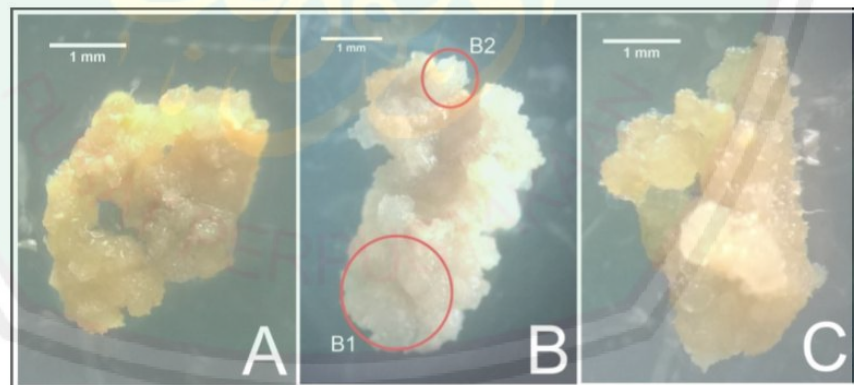
Pertumbuhan kalus dapat digambarkan dalam bentuk kurva sigmoid. Phillips (1995) membagi lima fase pertumbuhan kalus, yaitu: Fase lag, dimana sel-sel mulai membelah. Kedua ialah fase eksponensial, dimana laju pembelahan sel berada pada puncaknya. Ketiga ialah fase linear, pembelahan sel mengalami perlambatan tetapi laju ekspansi sel meningkat. Keempat ialah fase deselerasi, laju pembelahan dan pemanjangan sel menurun. Kelima ialah fase stasioner, dimana jumlah dan ukuran sel tetap.

Metabolit sekunder pada umumnya meningkat pada fase stasioner. Hal ini dimungkinkan karena adanya peningkatan vakuola sel atau akumulasi. Menurut Darmawati (2007), Pada fase stasioner pertumbuhan terhenti dan terjadi kematian sel, hal ini karena sejumlah nutrisi telah berkurang atau terjadi senyawa toksik yang dikeluarkan kalus ke dalam medium. Pada fase ini harus dilakukan subkultur pada kalus agar tetap hidup.

Kalus merupakan sekumpulan sel yang masih aktif tumbuh dan membelah dan belum terdeferensiasi untuk membentuk tunas maupun akar. Ada dua kategori kalus yaitu kompak dan remah. Pada kalus kompak sel-sel teragregasi secara padat, sedangkan kalus remah sel-selnya longgar satu sama lainnya sehingga mudah terurai (Suhariyanto, 2011). Menurut Pandiangan (2011), kalus juga dibedakan menjadi dua berdasarkan tekstur dan komposisi tubuhnya yaitu kalus kompak dan meremah. Kalus kompak bertekstur padat dan keras dari sel-sel kecil yang tersusun

sangat rapat, sedangkan kalus meremah bertekstur lunak dan tersusun dari sel-sel dengan ruang sel yang banyak. Perbedaan tekstur kalus menimbulkan adanya perbedaan kemampuan untuk memproduksi metabolit sekunder lebih banyak dari kalus meremah.

Turhan (2004), menyatakan bahwa tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam, yaitu: kompak (non friable), intermediet dan remah (friable). Syahid (2010), penggunaan 2,4-D secara tunggal pada semua konsentrasi yang diaplikasikan menghasilkan kalus dengan struktur sebagian remah (friable) dan sebagian kompak. Kalus dengan struktur remah (friable) merupakan kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang mudah lepas sedangkan kalus kompak terdiri dari sekumpulan sel yang kuat. Struktur kalus remah sangat berkorelasi dengan kecepatan daya tumbuh kalus sehingga produksi metabolit sekunder tertentu yang ingin diperoleh lebih cepat dicapai.



**Gambar 2.7** Tekstur Kalus Stevia (A) kalus kompak, (B) kalus intermediet (B1= kalus kompak, B2= kalus remah) (C) kalus remah (Putri, 2015)

Gambar 2.7 menunjukkan bahwa tekstur kalus stevia (*Stevia rebaudiana*) menghasilkan tiga macam kalus yaitu kompak (*non friable*), intermediet dan remah

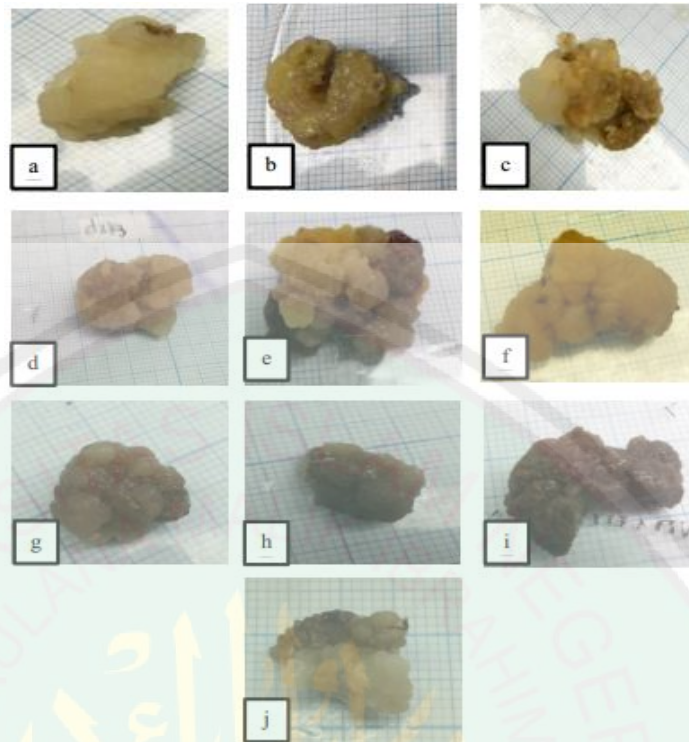
(*friable*). Kalus kompak yaitu dicirikan dengan teksturnya padat, tidak bisa dipisahkan. Sedangkan kalus remah dicirikan dengan nampak bergranul sehingga mudah untuk dipisahkan. Sementara kalus intermediet merupakan kalus campuran antara kalus kompak dan remah. Pada gambar 2.7 bagian B1 menunjukkan teksturnya padat dan pada bagian B2 tampak terdapat granul (mudah terpisah).

#### 2.4.9 Kualitas Kalus Hasil Kultur

Kualitas kalus dapat dilihat dari tekstur dan warna kalus. Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang digunakan untuk menilai suatu kualitas kalus. Sutjahjo (1994) menjelaskan bahwa terdapat dua macam kalus yang terbentuk dalam kultur *in vitro* suatu tanaman, yaitu (1) kalus embriogenik dan (2) kalus non embriogenik. Kalus embriogenik adalah kalus yang mempunyai potensi untuk beregenerasi menjadi tanaman melalui organogenesis atau embryogenesis. Sedangkan kalus non embriogenik adalah kalus yang mempunyai kemampuan sedikit atau tidak mempunyai kemampuan untuk beregenerasi menjadi tanaman. Kalus embriogenik yang mempunyai struktur kompak, tidak tembus cahaya dan pertumbuhan relatif lambat merupakan tipe yang dikehendaki dalam seleksi *in vitro* tanaman. Menurut Green (1984) dalam Sutjahjo (1994), kalus seperti ini disebut kalus tipe-I, sebaliknya kalus yang kurang kompak, friabel, dan pertumbuhannya cepat disebut kalus tipe-II. Kemampuan regenerasi kalus umumnya menurun sesuai lamanya jaringan dikulturkan, namun beberapa kultur kalus kemampuan regenerasinya dapat bertahan dalam jangka waktu relatif panjang. Tekstur kalus kompak merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel

berbentuk nodular, dengan struktur yang padat dan mengandung cukup banyak air (Manuhara, 2011 dalam Hayati, 2010). Kalus remah merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel yang panjang berbentuk tubular dimana struktur sel-selnya renggang, tidak teratur dan mudah rapuh. Struktur kalus remah sangat berkorelasi dengan kecepatan daya tumbuh kalus sehingga produksi metabolit sekunder tertentu yang ingin diperoleh lebih cepat dicapai (Syahid, 2010).

Warna kalus juga merupakan indikator pertumbuhan eksplan pada budidaya *in vitro* yang menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui apakah suatu kalus masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Hendaryono dan Wijayani (1994) menyatakan bahwa perbedaan warna kalus dapat disebabkan beberapa hal yaitu pigmentasi, intensitas cahaya, dan sumber eksplan dari bagian tanaman yang berbeda. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda, seperti warna kekuning-kuningan, putih, dan hijau. Warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik (Fatmawati, 2008 dalam Dwi, 2012), sedangkan kalus yang berwarna coklat merupakan kalus yang mengalami proses penuaan.



**Gambar 2.8** Warna Kalus Kopi Liberika Tungkal Jambi (*Coffea liberica* Var. *Liberica* Cv. Tungkal Jambi) yang berumur 12 Minggu Setelah Kultur. a) kalus warna putih (2 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin), b) kalus warna putih kekuningan (3 ppm 2,4- D + 0,5 ppm kinetin), c) kalus warna putih kecoklatan (3 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin), d) kalus warna kuning kecoklatan (4 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin), e) kalus warna kuning kehitaman (2 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin), f) kalus warna kuning (4 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin), g) kalus warna coklat (2 ppm 2,4-D + 1 ppm kinetin), h) kalus warna coklat kehitaman (4 ppm 2,4-D + 1,5 ppm kinetin), i) kalus warna hitam (2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin), j) kalus warna putih kehitaman (3 ppm 2,4-D + 0,5 ppm kinetin) (Azizah, 2017).

Warna kalus dalam penelitian yang dilakukan oleh Azizah (2017) pada kalus daun kopi liberika tungkal jambi (*Coffea liberica* Var. *Liberica* Cv. Tungkal Jambi) memberikan warna yang berbeda-beda. Warna yang terbentuk yaitu putih, putih kekuningan, putih kecoklatan, kuning kecoklatan, kuning kehitaman, kuning, coklat, coklat kehitaman, hitam dan putih kehitaman. Kalus yang berwarna



kecoklatan atau kehitaman merupakan kalus non-embriogenik dimana kalus ini tidak memiliki kemampuan untuk beregenerasi.

Berdasarkan perubahan ukuran sel, metabolisme dan penampakan kalus, proses perubahan dari eksplan menjadi kalus dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu tahapan induksi, proliferasi, dan diferensiasi. Tahapan induksi sel pada eksplan yang mengalami dediferensiasi dan memulai pembelahan. Pada tahapan proliferasi pembelahan sel terjadi secara cepat, sedangkan pada tahapan diferensiasi terjadinya proses metabolisme atau organogenesis (Aitchison, 1977 dalam Shoaib, 1999)

#### **2.4.10 Metabolit Sekunder**

Metabolit sekunder adalah senyawa produk atau hasil metabolisme sekunder. Metabolisme sekunder memanfaatkan metabolit primer pada awal dalam jalur metabolismenya (Pandiangan, 2011). Metabolit sekunder merupakan hasil dari metabolisme tanaman yang bukan hasil metabolisme utama. Pada tanaman tingkat tinggi menghasilkan tingkat metabolit sekunder yang beragam. Kandungan metabolit sekunder juga dipengaruhi oleh keadaan lingkungan tempat tumbuhan tersebut hidup.

Herbert (1995), metabolit sekunder merupakan hasil metabolisme yang memiliki karakteristik khusus untuk setiap makhluk hidup dan dibentuk melalui jalur khusus dari metabolit primer seperti karbohidrat, lemak, asam amino. Metabolit sekunder dibentuk untuk meningkatkan pertahanan diri. Tumbuhan pada kondisi yang normal tanaman hanya bisa mensintesis sedikit metabolit sekunder, tapi bagaimana jika tanaman diperlakukan pada beberapa keadaan yang berbeda seperti pencahayaan dan stres cahaya (gelap) dan berbagai

konsentrasi hormon. Untuk mendapatkan metabolit sekunder yang dihasilkan dalam jaringan tanaman, dapat juga dalam sel-sel yang dilakukan dengan cara teknik kultur jaringan (Nugroho dan Sugito, 2004).

Sintesis metabolit sekunder merupakan salah satu fungsi protektif tanaman ketika ada beberapa patogen dengan meningkatkan fitoaleksin. Mekanisme pertahanan tanaman meliputi: 1) deteksi sinyal patogen, 2) aktivasi H<sup>+</sup>-ATPase, 3) peningkatan aliran kalsium ke dalam sel, 4) aktivasi CDPK (calcium dependent proteinkinase), 5) aktivasi NADPH oksidase. Radikal oksigen yang aktif dihasilkan oleh NADPH oksidase yang akan mengaktifkan MAP kinase sehingga terjadi peningkatan tingkat ekspresi gen biosintesis metabolit sekunder (Bulgakov et.al., 2003).

Jalur metabolisme primer biasanya merupakan jalur umum yang terdapat pada semua organisme, sedangkan jalur metabolisme sekunder merupakan jalur khusus untuk masing-masing spesies. Menurut Sastrohamirdjojo (1996), menyatakan bahwa pada dasarnya tidak ada perbedaan yang tajam antara metabolit primer dengan metabolit sekunder. Gula-gula yang lazim seperti, glukosa, fruktosa, manosa dimasukkan dalam metabolit primer sedangkan gula-gula yang lebih spesifik seperti, khalkosa, steptosa, mikaminosa yang diketahui sebagai konstituen antibiotik dikategorikan sebagai metabolit sekunder. Metabolit sekunder yang terdapat pada bahan alam merupakan hasil metabolit primer yang mengalami reaksi yang spesifik sehingga menghasilkan senyawa-senyawa tertentu. Senyawa metabolit primer merupakan senyawa awal atau senyawa induk atau dikenal

sebagai precursor untuk metabolit sekunder. Berikut ini adalah bagan yang menunjukkan hubungan antara metabolit primer dengan metabolit sekunder.

#### **2.4.11 Produksi Senyawa Metabolit Sekunder Melalui Teknik Kultur Jaringan**

Teknik kultur jaringan merupakan salah satu cara untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder. Teknik ini ditujukan pada budidaya secara *in vitro* terhadap berbagai bagian tanaman yang meliputi batang, daun, akar, bunga, kalus, sel, protoplas dan embrio. Bagian-bagian tersebut yang diistilahkan sebagai eksplan, diisolasi dari kondisi *in vivo* dan dikultur pada medium buatan yang steril sehingga dapat beregenerasi dan berdeferensiasi menjadi tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009).

Kultur jaringan dapat digunakan sebagai sarana penghasil metabolit sekunder. Hal ini disebabkan karena metabolit sekunder merupakan hasil dari proses-proses biokimia yang terjadi dalam tubuh tanaman, sedangkan proses tersebut juga terjadi pada kultur jaringan. Senyawa ini terdapat pada kalus atau bagian yang lain, misalnya akar (Dalimonthe, 1987 dalam Parti, 2004).

Produksi metabolit sekunder dengan menggunakan teknik *in vitro* memiliki keuntungan dibandingkan dengan teknik konvensional antara lain senyawa sekunder yang dihasilkan dapat diproduksi pada lingkungan yang terkendali, bebas dari deraan lingkungan, bebas dari hama, dapat mengasihkan senyawa spesifik, produksi dapat dilakukan sesuai kebutuhan, kalitas dan

produksinya dapat lebih konsisten serta lahan yang dibutuhkan tidak luas, mengurangi upah buruh (Dalimonthe, 1987 dalam Darwati, 2007).

Menurut Rahmawati (1999), sebelum inisiasi kultur jaringan, terjadi 3 fase, 1) fase penyesuaian, fase 2) fase pembelahan sel, fase 3) fase stasioner (fase dimana tidak ada lagi pertumbuhan). Senyawa metabolit sekunder biasanya terbentuk pada fase stasioner, sebagai akibat keterbatasan nutrisi dalam medium akan merangsang dihasilkannya enzim-enzim yang berperan untuk pembentukan metabolit sekunder dengan memanfaatkan metabolit primer guna mempertahankan kelangsungan hidup. Produksi metabolit sekunder pada fase stasioner ini mungkin juga disebabkan adanya peningkatan vakuola sel untuk akumulasi senyawa tinggi. Pemanfaatan kultur sel untuk produksi agro industri, telah banyak digunakan, dan telah dilakukan secara komersial sejak tahun 1950, seperti perbanyakan sel tembakau dan sayur-sayuran yang telah dilakukan sejak akhir tahun 1950an dan awal tahun 1960an di US, Canada dan Eropa. Senyawa-senyawa seperti shikonin dan saponin ginseng sudah diproduksi dalam skala industri di Jepang, sedangkan beberapa senyawa lain juga diproduksi di Eropa (Misawa, 1994). Dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Syahid dan Hadipoentyanti (2002), kandungan kurkumin tanaman temulawak hasil kultur *in vitro*, ternyata lebih tinggi dibandingkan koleksi plasma nutfah yang diperbanyak secara konvensional.

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. pada bulan Oktober sampai dengan November 2017.

#### 3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor perlakuan, yaitu konsentrasi 2,4 D dan TDZ. Kombinasi perlakuan disajikan pada Tabel 3.1. Masing-masing unit perlakuan dilakukan dalam tiga kali ulangan.

Faktor 1 : konsentrasi 2,4 D

- a. D0 : 0 mg/L
- b. D1 : 1 mg/L
- c. D2 : 2 mg/L
- d. D3 : 3 mg/L

Faktor 2 : konsentrasi TDZ

- a. T0 : 0 mg/L
- b. T1 : 0,25 mg/L
- c. T2 : 0,5 mg/L
- d. T3 : 0,75 mg/L

**Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan**

Konsentrasi TDZ mg/L	Konsentrasi 2,4 D mg/L			
	0	1	2	3
0	D0T0	D1T0	D2T0	D3T0
0,25	D0T1	D1T1	D2T1	D3T1
0,5	D0T2	D1T2	D2T2	D3T2
0,75	D0T3	D1T3	D2T3	D3T3

Keterangan : Kontrol adalah perlakuan tanpa 2,4 D dan TDZ (Hanya media MS)

D = 2,4 D ; T = TDZ

### 3.3 Alat dan Bahan

#### 3.3.1 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, batang pengaduk, botol kultur, alat-alat diseksi (scapel, pinset, gunting), LAF (*Laminar Air Flow*), timbangan analitik, oven, autoklaf, lampu bunsen, penyemprot alkohol (*sprayer*), pH meter (indikator pH), lemari pendingin, rak kultur, AC (*Air Conditioner*), lampu neo, *hot plate* and *magnetik stirer*, rak kultur, tisu, aluminium foil, plastik wrap, kertas label, karet, plastik, kompor, dan panci pemanas.

#### 3.3.2 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan utama yang digunakan meliputi eksplan berupa tanaman Legundi (*Vitex trifolia* Linn) pada organ berupa daun muda yang berwarna hijau muda nomer tiga dari pucuk daun

Legundi yang diperoleh dari UPT Materia Medica, Kota Batu, Malang, Jawa Timur, detergen, alkohol 70% dan 96%, bayclin 15%, Media MS (*Murashige & skoog*), Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan yaitu 2,4 D yang dikombinasikan dengan TDZ, aquades steril, gula, agar, dan Tipol untuk mencuci alat.

### 3.4 Prosedur Penelitian

Langkah kerja dalam penelitian secara keseluruhan tersaji pada Gambar 3.1. dibawah ini :



**Gambar 3.1. Tahap-Tahap Penanaman Eksplan**

#### 3.4.1 Tahap Persiapan

##### 1. Sterilisasi Ruang Tanam

Langkah kerja dalam sterilisasi ruang tanam adalah sebagai berikut :

1. Lantai pada ruang dipel dengan karbol yang telah dicampur dengan air
2. Lantai dipel dengan karbol murni.

3. Meja LAF (*Laminar Air Flow*) dibersihkan dengan alkohol 70% kemudian dinyalakan sinar UV selama 1 jam.
4. Saat akan digunakan lampu UV dimatikan, lampu TL dan kipas angin dinyalakan.

## 2. Sterilisasi Alat

Langkah kerja dalam sterilisasi alat adalah sebagai berikut :

1. *Disecting set* (scapel, pinset, gunting), alat-alat gelas dan botol kultur dicuci dengan detergen dan dibilas dengan air bersih.
2. Alat-alat *disecting set*, alat-alat gelas dan botol kultur direndam didalam tipol selama 1x24 jam.
3. Alat-alat *disecting set*, alat-alat gelas, dan botol kultur dibilas dengan air bersih.
4. Alat-alat *disecting set*, alat-alat gelas, dan botol kultur dikeringkan dengan oven selama 2 jam dengan suhu 120°C
5. Alat-alat *disecting set* dibungkus dengan alumunium foil kemudian dalam plastik tahan panas. Sedangkan alat-alat gelas ditutup dengan plastik tahan panas dan cawan petri dibungkus dengan kertas. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 2 jam.

## 3. Pembuatan Stok Zat Pengatur Tumbuh

Pembuatan larutan stok bertujuan untuk memudahkan dalam pembuatan media. Langkah kerja dalam pembuatan larutan stok hormon dengan konsentrasi 100 ppm dalam 100 ml aquades yakni yang pertama ialah serbuk 2,4 D ditimbang sebanyak 10 ml, kemudian ditambahkan aquades sebanyak



100 ml, kemudian dihomogenkan sampai larutan tercampur merata, kemudian digunakan rumus  $M_1.V_1=M_2.V_2$  untuk pengambilan larutan stok (sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan, yaitu 2,4 D 0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, dan 3 mg/L. Sedangkan TDZ yaitu 0 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, dan 0,75 mg/L.

Adapun cara menghitung konsentrasi masing-masing ZPT dalam 100 ml aquades ialah :

$$2,4 D = 1. M_1.V_1=M_2.V_2 ; 100.V_1=1.100 ; V_1=1$$

#### 4. Pembuatan Media Dasar

Langkah kerja dalam pembuatan media sebanyak 1 liter adalah sebagai berikut : Media *Murashighe & Skoog* (MS) ditimbang sebanyak sebanyak 4,43 gram, gula sebanyak 30 gram, dan agar sebanyak 8 gram, bahan-bahan seperti biasa media MS, gula, dan zat pengatur kemudian tumbuh (ZPT) kemudian dihomogenkan dengan stirer di atas hot plate, setelah homogen, diukur pH media sebesar 5,8 dengan indikator pH. Jika pH kurang 5,8 maka ditambahkan larutan NaOH 0,1 N dan jika lebih 5,8 maka ditambahkan HCl 0,1 N, kemudian ditambahkan agar sebanyak 8 gram, kemudian media dipanaskan dan diaduk hingga mendidih, media yang telah masak, dimasukkan ke dalam botol kultur ukuran kecil masing-masing sebanyak 12,5 ml, setelah itu botol kultur yang berisi media ditutup dengan plastik dan diikat dengan karet.

#### 5. Sterilisasi Media

Media kultur yang telah dibuat, kemudian disterilkan dengan cara diautoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

### 3.4.2 Tahap Pelaksanaan

#### 1. Sterilisasi Eksplan Legundi (*Vitex trifolia* Linn)

##### 1. Sterilisasi Eksplan di Luar LAF

Eksplan yang telah dipilih dicuci dengan detergen. Kemudian direndam dengan fungisida selama 5 menit lalu dibilas air. Kemudian direndam antibakterisida selama 5 menit lalu dibilas air. Kemudian dialiri air selama 1 jam.

##### 2. Sterilisasi Eksplan dalam LAF

Eksplan dibawa ke dalam LAF kemudian direndam dalam larutan alkohol 15% selama 30 detik, dibilas dengan aquades steril tiga kali. Kemudian direndam larutan *baycline* 15% selama 3 menit lalu ditanam.

#### 2. Penanaman (Inisiasi)

Penanaman (inisiasi) eksplan dilakukan didalam LAF (Laminar Air Flow). Adapun langkah kerja dalam penanaman (inisiasi) adalah sebagai berikut:

1. Tangan disemprot dengan alkohol 70% diluar LAF dan dibersihkan dengan tisu dan alkohol 70%.
2. Alat-alat seperti pinset, scapel, gunting yang diperlukan dalam kultur dicelupkan dalam alkohol 96% dan dibakar dengan api bunsen.
3. Setelah itu diletakkan di atas tutup kotak *stainless steel* (dimasukkan ke dalam aquades steril) dan dibiarkan dingin.
4. Anggota tubuh yang masuk dalam LAF disemprot dengan alkohol 70%.

5. Eksplan yang ditanam dalam media kultur adalah eksplan yang mengandung satu atau dua nodus.
6. Eksplan ditanam dalam media perlakuan dengan menggunakan pinset atau scapel.
7. Botol kultur yang telah diinisiasi eksplan ditutup dengan plastik wrap, plastik tahan panas dan diikat dengan karet.
8. Botol-botol yang telah ditanami eksplan diinkubasi dalam ruang kultur pada suhu 23°C serta diamati setiap hari selama 1 bulan. Keadaan ruang kultur harus steril.

#### **3.4.3 Pengamatan**

Pengamatan eksplan hasil penanaman kultur dilakukan dalam tiga taraf pengamatan yaitu:

1. Pengamatan setiap hari dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya perkembangan dan munculnya kalus pertama kali pada eksplan. Selain itu juga untuk melihat apabila ada kontaminasi pada eksplan, dan hasil pengamatan di dokumentasi.
2. Pengamatan kedua yaitu pengamatan interval 2 minggu sekali untuk mengetahui tekstur dan warna kalus.
3. Pengamatan ketiga, merupakan pengamatan akhir yang dilakukan untuk mengamati persentase eksplan yang membentuk kalus serta berat kalus.

### Parameter pengamatan:

1. Pengamatan munculnya kalus pertama kali dinyatakan dalam HST (hari setelah tanam) yang ditandai dengan membengkaknya eksplan dan munculnya bintik-bintik putih.
2. Pengamatan kontaminasi diamati secara langsung yang terjadi pada media dan eksplan yang dapat diakibatkan oleh mikroorganisme (jamur ataupun bakteri).
3. Pengamatan warna kalus yang dilakukan setiap hari dengan diamati perubahan warna yang terjadi pada setiap kalusnya, misalnya warna kalus hijau muda keputihan (HP), kekuningan (K), kecoklatan (C), dan hijau (H).
4. Tekstur kalus diamati secara visual pada penampakan kalus yaitu, melihat tekstur kalus remah (R), kalus kompak (K), dan kalus campuran
5. Parameter berat basah kalus adalah massa kalus basah yang diukur menggunakan timbangan analitik dengan satuan gram (g). Berat seluruh kalus dan dicari berat rata-ratanya. Sedangkan pengamatan persentase kalus yang dilakukan dengan menghitung banyaknya eksplan yang membentuk kalus dalam satuan persen (%), dengan rumus hitung sebagai berikut:

Luas eksplan berkalus

$$\% \text{ eksplan berkalus} = \frac{\text{Luas eksplan berkalus}}{\text{Luas total eksplan yang ditanam}} \times 100 \%$$

Luas total eksplan yang ditanam

#### 3.4.4 Teknik Analisis Data

Data pengamatan pada penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif.

Data kualitatif berupa pengamatan secara visual meliputi hari muncul kalus dan

morfologi kalus. Sedangkan data kuantitatif berupa berat kalus persentase kalus. Data kualitatif dianalisis secara deskriptif dan data kuantitatif dianalisis dengan menggunakan analisis variansi (ANAVA) untuk mengetahui adanya pengaruh konsentrasi kombinasi 2,4-D dan TDZ yang tepat untuk menginduksi kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) pada masing-masing unit percobaan dalam media MS. Apabila dari hasil analisis variansi diperoleh adanya pengaruh yang signifikan dari pelakuan maka dilanjutkan dengan uji beda nyata DMRT pada taraf 5%.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Pengaruh Pemberian Berbagai konsentrasi 2,4 D terhadap Induksi Kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn.) secara *In Vitro*

Hasil analisis variasi (ANOVA) menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4 D berpengaruh nyata terhadap induksi kalus daun Legundi. Ringkasan hasil analisis variasi disajikan pada **Tabel 4.1**

**Tabel 4.1 Ringkasan Hasil Analisis Variansi (ANOVA) Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi 2,4 D terhadap Induksi Kalus Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn.) secara *In Vitro*.**

Variabel Pengamatan	F Hitung	Sig. (p)
Hari Muncul Kalus	3,450*	0,028
Persentase Pertumbuhan Kalus	44,063*	0,000
Berat Kalus	12,142*	0,000

Keterangan : \*Konsentrasi 2,4 D berpengaruh nyata terhadap variabel pengamatan.

Nilai signifikan ( $p < 0,05$ ) maka ada pengaruh nyata.

Berdasarkan hasil ANOVA (Tabel 4.1) diketahui bahwa nilai P pada seluruh variabel pengamatan lebih kecil dari 0,05 yang artinya ialah terdapat pengaruh terhadap semua variabel yaitu hari muncul kalus, persentase pertumbuhan kalus, dan berat kalus. Oleh karenanya perlu dilakukan uji DMRT 5%. Hasil uji lanjut DMRT 5% disajikan pada **Tabel 4.2**.

**Tabel 4.2 Hasil Uji DMRT 5% pengaruh pemberian 2,4 D terhadap induksi kalus daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn.)**

<b>Konsentrasi 2,4 D (mg/l)</b>	<b>Hari Muncul Kalus (HST)</b>	<b>Persentase Pertumbuhan Kalus (%)</b>	<b>Berat Kalus (g)</b>
0	16,75b	11,1667a	0,0325a
1	13,5ab	61,6667b	0,1975b
2	14ab	76,0833c	0,2508b
3	11,33a	75,6667c	0,2075b

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan pada uji lanjut DMRT 5%.

#### 4.1.1 Hari Muncul Kalus

Hasil uji lanjut DMRT 5% hari muncul kalus menunjukkan bahwa perlakuan pemberian konsentrasi 2,4 D sebesar 0 mg/l berbeda nyata terhadap pemberian 2,4 D sebesar 3 mg/l. Sedangkan perlakuan pemberian konsentrasi 2,4 D 1 mg/l dan 2 mg/l tidak mempunyai perbedaan nyata. Munculnya kalus pada daun Legundi ini dengan perlakuan pemberian 2,4 D 0 mg/l mempunyai rata-rata 17 HST, pada konsentrasi 1 mg/l mempunyai rata-rata 13 HST, pada konsentrasi 2 mg/l 14 HST, dan pada konsentrasi 3 mg/l mempunyai rata-rata 11 HST. Dari data tersebut dapat diketahui bahwa pemberian 2,4 D (auksin saja) sudah cukup untuk menumbuhkan kalus daun Legundi. Diketahui juga bahwa konsentrasi yang paling optimum pada hari munculnya kalus ialah 3 mg/l.

Berdasarkan diatas dapat disimpulkan bahwa yang memiliki kemampuan lebih cepat memunculkan kalus ialah pada konsentrasi 2,4 D 3 mg/l dan yang paling lambat dalam memunculkan kalus ialah pada konsentrasi 0 mg/l. Diketahui pada

penelitian ini semakin tinggi konsentrasi maka akan semakin cepat pertumbuhan kalus. Berkurangnya konsentrasi 2,4 D juga akan mengurangi rangsangan untuk pertumbuhan kalus. Hal ini sesuai dengan Zulkarnain (2014) bahwa konsentrasi auksin yang tinggi akan meningkatkan pembentukan kalus. Jadi semakin tinggi konsentrasi 2,4 D akan lebih cepat menumbuhkan kalus. Sedangkan apabila konsentrasi 2,4 D diturunkan akan mempengaruhi kecepatan tumbuh kalus. Hal ini sesuai dengan Zulkarnain (2014) bahwa konsentrasi auksin yang rendah meningkatkan pembentukan akar adventif. Namun pada konsentrasi 0 mg/l eksplan daun Legundi masih dapat menumbuhkan kalus meskipun hanya sedikit. Hal ini terjadi dikarenakan pada sel daun Legundi diduga tersedia auksin yang cukup untuk menumbuhkan kalus.

Perbedaan kadar yang optimum pada berbagai spesies tumbuhan dikarenakan kadar hormon endogen yang terkandung dalam setiap tanaman berbeda-beda. Perbedaan kadar hormon endogen tersebut akan mempengaruhi kecepatan induksi kalus pada setiap tanaman. Hal ini sesuai dengan pernyataan Indah dan Ermavitalini (2013) bahwa kombinasi antara hormon endogen dan eksogen dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus. Pemberian hormon eksogen yang kurang tepat dapat menghambat pertumbuhan kalus.

#### **4.1.2 Persentase Pertumbuhan Kalus**

Pemberian konsentrasi 2,4 D 0 mg/l memberikan pengaruh beda nyata terhadap konsentrasi 1 mg/l, 2 mg/l, dan 3 mg/l untuk persentase pertumbuhan kalus pada eksplan daun Legundi. Sedangkan konsentrasi 1 mg/l berbeda nyata dengan



konsentrasi 2 mg/l dan 3 mg/l. Namun konsentrasi 2 mg/l dan 3 mg/l tidak berbeda nyata. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa persentase pertumbuhan kalus tertinggi yaitu pada perlakuan pemberian 2,4 D 2 mg/l sebesar 76,0833 %. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Quainoo (2012) menyatakan pada penelitiannya bahwa kombinasi ZPT 2,4 D 2 mg/l paling efektif dalam menumbuhkan kalus terbanyak pada tanaman *Cocoa*. Diketahui juga pada konsentrasi 0 mg/l persentase tumbuh kalus sebesar 11,667 %, 1 mg/l sebesar 61,6667 %, 3 mg/l sebesar 75,6667 %. Dari data tersebut dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi akan semakin banyak pula persentase kalus yang tumbuh pada eksplan. Namun apabila konsentrasi terlalu tinggi juga dapat menghambat pertumbuhan kalus. Dapat diketahui pada hasil penurunan persentase dari konsentrasi 2 mg/l dengan 3 mg/l. Diduga apabila semakin ditambah konsentrasi melebihi 3 mg/l maka akan semakin berkurang pula persentase kalus yang tumbuh pada eksplan. Menurut Aprisa (2012) 2,4 D bersifat herbisida. Sehingga 2,4 D merupakan salah satu auksin yang digunakan induksi kalus yang aktif pada konsentrasi rendah pada banyak genotipe. Sedangkan pada konsentrasi 2,4 D yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan dan pembelahan sel. Elaleem (2009) menyatakan bahwa 2,4 D merupakan zat pengatur tumbuh yang dapat bekerja untuk menginduksi kalus. Menurut hasil penelitiannya konsentrasi 2,4 D 1 mg/l hingga konsentrasi 5 mg/l dapat menginduksi kalus sebanyak 100% persentase kalus pada potatos (*Solanum tuberosum* L.). Persentase kalus diperoleh dari hasil pengamatan pada eksplan daun yang ditumbuhi kalus.

Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa persentase eksplan berkalus terbesar ialah pada konsentrasi 2 mg/l daripada konsentrasi 3 mg/l yang lebih

sedikit. Hal ini sesuai dengan Tu *et al* (2001) bahwa auksin dalam konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menghambat pembelahan dan pertumbuhan sel. Dan konsentrasi auksin yang rendah dapat menstimulasi sintesis RNA, DNA, dan protein dalam mengontrol pembelahan dan pertumbuhan sel.

#### 4.1.3 Berat Kalus

Dalam hal berat basah kalus daun Legundi, 2,4 D juga memberikan pengaruh nyata yaitu konsentrasi 0 mg/l berbeda nyata terhadap semua perlakuan. Namun ketiga konsentrasi yaitu 1 mg/l, 2mg/l, dan 3 mg/l tidak mempunyai perbedaan nyata. Dari hasil pengamatan dapat diketahui bahwa konsentrasi optimum dalam memberikan pengaruh berat basah kalus ialah pada konsentrasi 2 mg/l sebesar 0,2508 gr. Hal ini sesuai dengan penelitian Al-ajlouni (2012) bahwa konsentrasi optimum 2,4 D untuk mempengaruhi berat basah kalus ialah 2 mg/l sebesar 289.4 mg/l pada Barley (*Hordeum vulgare* L.). Berat kalus diperoleh dari hasil penimbangan kalus basah dengan menggunakan timbangan analitik. Menurut Sitorus (2011) menyatakan bahwa pembelahan sel yang optimal akan menyebabkan pertumbuhan kalus yang optimal dan akan meningkatkan berat basah kalus. Sehingga dapat diketahui bahwa konsentrasi optimal dalam hal ini ialah pada konsentrasi 2 mg/l dimana pada konsentrasi 2 mg/l ini sudah cukup menambah auksin endogen untuk penumbuhan kalus.

Berdasarkan data penelitian ini diketahui pada konsentrasi 0 mg/l mempunyai berat kalus sebesar 0,0325 gr, 1 mg/l sebesar 0,1975 gr, 2 mg/l sebesar 0,2508 gr, dan 3 mg/l sebesar 0,2075 gr. Dari data diatas dapat disimpulkan bahwa terjadi

penurunan berat kalus dari konsentrasi 2 mg/l ke konsentrasi 3 mg/l. Hal ini sama dengan persentase kalus, semakin tinggi konsentrasi 2,4 D semakin rendah pula pertumbuhan kalus.

Satu diantara banyak hal yang mempengaruhi berat kalus adalah jenis eksplan. Dalam penelitian ini eksplan yang digunakan adalah daun muda ketiga. Dimana pada daun muda terkandung banyak auksin didalamnya. Sebagaimana menurut Campbell (2014) bahwa tempat utama sintesis auksin terdapat pada jaringan meristematis tunas apikal dan daun-daun muda. Pemberian zat pengatur tumbuh akan mempengaruhi konsentrasi hormon yang ada di dalam sel. Pemberian hormon yang kurang tepat dapat menghambat pertumbuhan kalus. Sehingga perlu dilakukan optimasi dalam pemberian zat pengatur tumbuh.

Rahayu *et al* (2003) menyatakan bahwa berat segar kalus yang besar disebabkan karena kandungan airnya tinggi, selain itu berat basah yang dihasilkan juga tergantung pada kecepatan sel-sel membelah diri, memperbanyak diri, morfologi kalus, dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus. Namun juga perlu diketahui menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) bahwa kadar hormon auksin yang terlalu tinggi lebih bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan. Pemberian 2,4 D yang termasuk auksin ini akan menambah konsentrasi auksin endogen. Sehingga pada taraf tertentu konsentrasi auksin dalam sel akan banyak dan menjadi jenuh. Keadaan hormon auksin yang terlalu banyak akan menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan kemunculan kalus. Sebagaimana menurut Campbell (2014) bahwa auksin merangsang pertumbuhan hanya dalam konsentrasi tertentu, berkisar  $10^{-8}$  sampai  $10^{-4}$  M. Pada konsentrasi lebih tinggi auksin dapat

menghambat pemanjangan sel, juga dapat menginduksi produksi hormon etilen, yaitu sejenis hormon yang umumnya menghambat pemanjangan sel.

#### 4.2 Pengaruh Pemberian Berbagai konsentrasi TDZ terhadap Induksi Kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn.) secara *In Vitro*

Hasil analisis variansi (ANOVA) menunjukkan bahwa konsentrasi TDZ berpengaruh nyata terhadap induksi kalus daun Legundi. Ringkasan hasil analisis variansi disajikan pada Tabel 4.3

**Tabel 4.3 Ringkasan Hasil Analisis Variansi (ANOVA) Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi TDZ terhadap Induksi Kalus Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn.) secara *In Vitro*.**

Variabel Pengamatan	F Hitung	Sig. (p)
Hari Muncul Kalus	0,504*	0,683
Persentase Pertumbuhan Kalus	4,151*	0,014
Berat Kalus	12,942*	0,000

Keterangan : \*Konsentrasi TDZ berpengaruh nyata terhadap variabel pengamatan. Nilai signifikan ( $p < 0,05$ ) maka ada pengaruh nyata.

Berdasarkan hasil ANOVA (tabel 4.1) diketahui bahwa pemberian berbagai konsentrasi TDZ berpengaruh nyata terhadap dua variabel yaitu persentase pertumbuhan kalus dan berat kalus. Hal ini dapat diketahui karena hasil dari nilai signifikan dua variabel tersebut mempunyai nilai lebih kecil dari 0,05. Oleh karenanya perlu dilakukan uji DMRT 5%. Konsentrasi TDZ tidak mempengaruhi hari muncul kalus. Hal ini disebabkan tidak semua jenis hormon bisa mempengaruhi aspek pertumbuhan. Adapun yang berpengaruh ialah jenis hormon

dan kadar konsentrasi hormon yang diberikan. Dalam kultur jaringan sitokinin mempunyai dua peran penting, yaitu merangsang morfogenesis eksplan serta merangsang pembentukan tunas muda (Hopkins, 1999). Wetherell (1982) menyatakan bahwa sitokinin dapat mendorong pembelahan sel serta menentukan arah terbentuknya diferensiasi sel hanya pada saat bersamaan dengan auksin. Sehingga dari pernyataan tersebut dapat disimpulkan bahwa TDZ tidak dapat mempengaruhi kecepatan rangsangan tumbuhnya kalus. Namun untuk persentase pertumbuhan kalus dan berat basah kalus tetap dipengaruhi oleh TDZ. Karena sudah terdapat auksin endogen namun hasilnya tidak semaksimal dengan penambahan auksin eksogen. Hasil uji lanjut DMRT 5% disajikan pada **Tabel 4.4**.

**Tabel 4.4 Hasil Uji DMRT 5% pengaruh pemberian TDZ terhadap induksi kalus daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn.)**

Konsentrasi TDZ (mg/l)	Persentase Pertumbuhan Kalus (%)	Berat Kalus (g)
0	67,9167b	0,3167b
0,25	47,9167a	0,1075a
0,5	59,5833ab	0,1558a
0,75	49,1667a	0,1083a

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan pada uji lanjut DMRT 5%.

#### 4.2.1 Persentase Tumbuh Kalus

Hasil uji lanjut DMRT 5% tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi TDZ 0 mg/l berbeda nyata dengan konsentrasi 0,25 mg/l dan 0,75 mg/l. Namun konsentrasi 0 mg/l tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 0,5 mg/l. Dan juga konsentrasi 0,25

mg/l tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 0,5 mg/l dan 0,75 mg/l. Serta konsentrasi 0,25 mg/l juga tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 0,75 mg/l. Adapun dari hasil pengamatan dapat diketahui bahwa konsentrasi TDZ yang paling efektif untuk meningkatkan persentase kalus ialah 0 mg/l dengan persentase tertinggi yaitu 67,9167 %. Menurut Alaleem (2009) bahwa TDZ 1 mg/l berhasil menginduksi kalus dengan persentase 100% dengan tekstur keras dan berwarna hijau pada tanaman potatos (*Solanum tuberosum* L.). Moreira *et al.*, (2016) juga menyatakan pada penelitiannya TDZ berhasil menginduksi kalus sebesar 35,71 %. Hal tersebut terbukti bahwa TDZ lebih efektif daripada BAP dan 2ip yang hanya menginduksi kalus sebesar 5,71 % dan 17,14 % pada tanaman Curaura (*Ananas erectifolius* ).

TDZ dalam konsentrasi 0 mg/l tanpa dibarengi dengan 2,4 D tidak berpengaruh pada hari muncul kalus. Hal ini dikarenakan sitokinin saja tidak dapat menginduksi kalus dengan efektif. Hal ini sesuai dengan Buchory & karjadi (2007) bahwa sitokinin disamping dapat merangsang pembelahan sel juga dapat menghambat pemanjangan sel oleh auksin. Sitokinin tanpa dikombinasikan dengan auksin tidak berpengaruh dalam variabel hari muncul kalus. Hal ini dikarenakan perlu adanya keseimbangan antara auksin dan sitokinin. Sesuai dengan Suryowinoto (1996) dalam Arianti (2015) bahwa untuk mendapatkan kalus, perlu adanya keseimbangan antara sitokinin dan auksin. Pernyataan tersebut diperkuat dengan hasil penelitian ini. Pada data yang diperoleh didapatkan kalus yang berstruktur kompak dan berwarna kuning hingga kecoklatan hanya pada perlakuan kombinasi antara TDZ dan 2,4 D.

Konsentrasi TDZ optimum dalam penelitian ini ialah 0 mg/l sebagaimana Pendapat Campbell (2014) bahwa ketika sepotong jaringan parenkim dikultur tanpa keberadaan sitokinin, sel-sel tumbuh sangat besar namun tidak membelah. Namun jika sitokinin ditambahkan bersama auksin, maka sel-sel akan membelah. Sitokinin saja tidak memiliki efek.

#### 4.2.2 Berat Kalus

Pemberian zat pengatur tumbuh TDZ juga memberikan pengaruh terhadap berat kalus daun Legundi. Hasil uji lanjut DMRT 5% berat kalus menunjukkan bahwa perlakuan pemberian TDZ 0 mg/l sangat berbeda nyata terhadap semua perlakuan pemberian TDZ. Namun ketiga perlakuan pemberian TDZ yaitu 1 mg/l, 2 mg/l, dan 3 mg/l tidak mempunyai perbedaan nyata. Adapun konsentrasi yang paling efektif dalam mempengaruhi berat basah kalus ialah pada konsentrasi 0 mg/l atau tanpa TDZ dengan berat 0,3167 gr. Dari penelitian tersebut dapat diketahui bahwa adanya hormon sitokinin eksogen perlu ditambahkan. Karena adanya sitokinin endogen sudah cukup menumbuhkan kalus dengan penambahan auksin eksogen. Namun, kalus yang dihasilkan akan remah. Sedangkan dengan penambahan sitokinin eksogen akan dihasilkan kalus bertekstur kompak. Data tersebut menunjukkan hasil berat basah kalus tertinggi ialah pada konsentrasi 0 mg/l TDZ. Diharapkan persentase kalus dan berat basah kalus yang tinggi akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang tinggi juga. Namun hanya saja perlu ditindak lanjuti dari segi warna dan tekstur kalus untuk kalus metabolit.

TDZ merupakan hormon kelas sitokinin, sebagaimana menurut Campbell (2014) sitokinin berfungsi untuk meregulasi pembelahan sel pada tunas dan akar.

Sitokinin bekerja secara bersamaan dengan auksin untuk mempengaruhi pembelahan sel dan diferensiasi sel. Dalam kultur jaringan sitokinin tidak dapat bekerja sendiri. Rasio sitokinin dan auksin yang diberikan mengontrol diferensiasi sel. Pada rasio pemberian sitokinin dan auksin tertentu, massa sel akan terus tumbuh membentuk gugusan sel yang terdiferensiasi, disebut kalus.

Berdasarkan hasil pengamatan dapat diketahui warna eksplan daun dari perlakuan sitokinin (TDZ) masih berwarna hijau segar. Hal ini dikarenakan sitokinin bekerja untuk memperlambat penuaan, sebagaimana dalam Campbell (2014) bahwa sitokinin bekerja untuk memperlambat penuaan organ-organ tumbuhan tertentu dengan menghambat pemecahan protein, merangsang sintesis RBA dan protein, serta memobilisasikan nutrisi jaringan-jaringan di sekelilingnya.

#### 4.3 Pengaruh Interaksi Pemberian Berbagai konsentrasi 2,4 D dan TDZ terhadap Induksi Kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn.) secara *In Vitro*

Hasil analisis variansi (ANAVA) menunjukkan bahwa konsentrasi kombinasi 2,4 D dan TDZ berpengaruh nyata terhadap induksi kalus daun Legundi. Ringkasan hasil analisis variansi disajikan pada **Tabel 4.5**

**Tabel 4.5 Ringkasan Hasil Analisis Variansi (ANAVA) Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi kombinasi 2,4 D dan TDZ terhadap Induksi Kalus Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn.) secara *In Vitro*.**

Variabel Pengamatan	F Hitung	Sig. (p)
Hari Muncul Kalus	0,540*	0,834
Persentase Pertumbuhan Kalus	2,058*	0,065
Berat Kalus	4,626*	0,001

Keterangan : \*Konsentrasi 2,4 D dan TDZ berpengaruh nyata terhadap variabel pengamatan. Nilai signifikan ( $p < 0,05$ ) maka ada pengaruh nyata.



Berdasarkan hasil ANAVA (Tabel 4.5) diketahui bahwa pemberian berbagai konsentrasi kombinasi 2,4 D dan TDZ berpengaruh nyata terhadap satu variabel yaitu berat kalus. Hal ini dapat diketahui karena hasil dari nilai signifikan variabel tersebut mempunyai nilai lebih kecil dari 0,05. Oleh karenanya perlu dilakukan uji DMRT 5%. Hasil uji lanjut DMRT 5% disajikan pada Tabel 4.2.

**Tabel 4.6 Hasil Uji DMRT 5% pengaruh pemberian kombinasi 2,4 D dan TDZ terhadap induksi kalus daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn.)**

Perlakuan 2,4 D dan TDZ	Berat Kalus (g)
0 mg/l 2,4 D + 0 mg/l TDZ (D0T0)	0,0000a
0 mg/l 2,4 D + 0,25 mg/l TDZ (D0T1)	0,0267ab
0 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l TDZ (D0T2)	0,0633ab
0 mg/l 2,4 D + 0,75 mg/l TDZ (D0T3)	0,0400ab
1 mg/l 2,4 D + 0 mg/l TDZ (D1T0)	0,3233d
1 mg/l 2,4 D + 0,25 mg/l TDZ (D1T1)	0,0567ab
1 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l TDZ (D1T2)	0,2867cd
1 mg/l 2,4 D + 0,75 mg/l TDZ (D1T3)	0,1233abc
2 mg/l 2,4 D + 0 mg/l TDZ (D2T0)	0,6033e
2 mg/l 2,4 D + 0,25 mg/l TDZ (D2T1)	0,1367abc
2 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l TDZ (D2T2)	0,1267abc
2 mg/l 2,4 D + 0,75 mg/l TDZ (D2T3)	0,1367abc
3 mg/l 2,4 D + 0 mg/l TDZ (D3T0)	0,3400d
3 mg/l 2,4 D + 0,25 mg/l TDZ (D3T1)	0,2100bcd
3 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l TDZ (D3T2)	0,1467abc
3 mg/l 2,4 D + 0,75 mg/l TDZ (D3T3)	0,1333abc

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan pada uji lanjut DMRT 5%.

Berdasarkan tabel diatas dapat diketahui bahwa masing-masing kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4 D dan TDZ memberikan pengaruh terhadap berat kalus yang berbeda. Berdasarkan hasil pengamatan dapat diketahui bahwa konsentrasi 2 mg/l 2,4D + 0 mg/l TDZ (D2T0) menghasilkan berat kalus tertinggi daripada konsentrasi yang lain yaitu sebesar 0,6033 gr. Pemberian konsentrasi 2,4 D tanpa TDZ sudah dapat menghasilkan kalus yaitu mempengaruhi berat kalus yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan pada tanaman Legundi sudah terdapat sitokinin endogen. Namun, berat kalus tertinggi ini pun perlu dievaluasi apakah bertekstur remah atau kompak. Selain itu juga perlu dievaluasi dari segi warna. Adapun menurut Zulkarnain (2014) bahwa sitokinin berfungsi untuk menginduksi pertumbuhan dan perkembangan eksplan dan juga dapat meningkatkan pembelahan sel, poliferasi pucuk serta morfogenesis. Sedangkan auksin menurut Campbell (2014) diproduksi di jaringan meristematik tunas apikal, daun-daun muda. Sehingga kandungan auksin endogen pada jaringan tersebut tinggi. Oleh karenanya pada penelitian ini, digunakan eksplan daun yang masih muda yaitu daun ketiga.

Konsentrasi 2,4 D 2 mg/l + TDZ 0 mg/l (D2T0) berhasil mempengaruhi berat kalus tertinggi. Adapun berat kalus yang tertinggi diharapkan mengandung metabolit sekunder yang tinggi pula. Namun hal ini tidak sesuai dengan kalus metabolit karena kalus yang dihasilkan dari perlakuan D2T0 tersebut menghasilkan kalus yang bertekstur remah dan berwarna putih. Dimana kalus metabolit ialah kalus yang mempunyai tekstur kompak dan berwarna kuning hingga kecoklatan. Wattimena (1998) menyatakan bahwa penentuan taraf kombinasi antara auksin dan



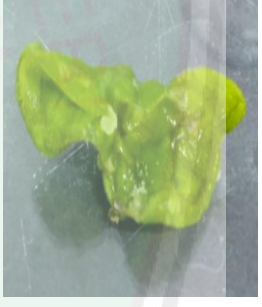


sitokinin disesuaikan dengan tipe eksplan, metode kultur jaringan, dan tingkat kultur jaringan.


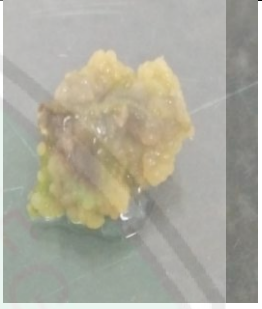
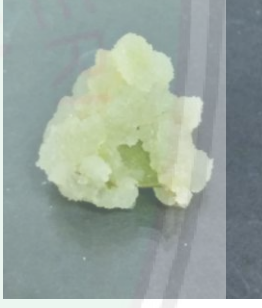
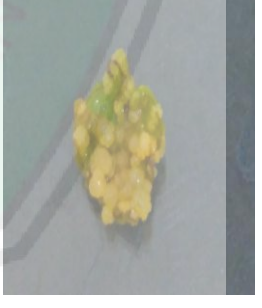

#### 4.4 Tekstur dan Warna Kalus Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn.)


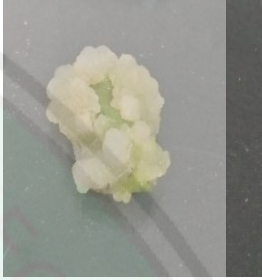



Tekstur kalus merupakan suatu penanda yang digunakan untuk menentukan kualitas kalus yang dihasilkan. Turhan (2004), menyatakan bahwa secara visual kalus dapat dibedakan menjadi tiga tipe kalus, yaitu kompak, intermediet dan remah. Hasil penelitian menunjukkan juga bahwa terdapat perbedaan warna kalus pada media induksi kalus dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4 D dan TDZ. Lutviana (2012) menyatakan bahwa jaringan yang dihasilkan dari setiap eksplan biasanya memunculkan warna kalus yang berbeda. Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik (Fatmawati, 2008 dalam Dwi, 2012), sedangkan kalus yang berwarna kuning hingga coklat merupakan kalus yang mengalami proses penuaan. Hasil pengamatan tentang tekstur dan warna kalus pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4.7.

**Tabel 4.7 Hasil Pengamatan Pengaruh Pemberian 2,4 D dan TDZ terhadap Tekstur dan Warna Kalus Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn.)**

Perlakuan 2,4 D dan TDZ	Warna Kalus	Tekstur Kalus	Gambar Pengamatan
0 mg/l 2,4 D + 0 mg/l TDZ (D0T0)	Putih	Kompak	

0 mg/l 2,4 D + 0,25 mg/l TDZ (D0T1)	Putih	Kompak	
0 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l TDZ (D0T2)	Putih	Kompak	
0 mg/l 2,4 D + 0,75 mg/l TDZ (D0T3)	Putih	Kompak	
1 mg/l 2,4 D + 0 mg/l TDZ (D1T0)	Putih	Kompak	
1 mg/l 2,4 D + 0,25 mg/l TDZ (D1T1)	Kuning	Kompak	

1 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l TDZ (D1T2)	Kuning	Kompak	
1 mg/l 2,4 D + 0,75 mg/l TDZ (D1T3)	Kuning	Kompak	
2 mg/l 2,4 D + 0 mg/l TDZ (D2T0)	Putih	Remah	
2 mg/l 2,4 D + 0,25 mg/l TDZ (D2T1)	Kuning	Kompak	
2 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l TDZ (D2T2)	Kuning	Kompak	

2 mg/l 2,4 D + 0,75 mg/l TDZ (D2T3)	Putih Kekuni ngan	Kompak	
3 mg/l 2,4 D + 0 mg/l TDZ (D3T0)	Putih	Remah	
3 mg/l 2,4 D + 0,25 mg/l TDZ (D3T1)	Kuning	Kompak	
3 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l TDZ (D3T2)	Kuning	Kompak	
3 mg/l 2,4 D + 0,75 mg/l TDZ (D3T3)	Kuning	Kompak	

Warna kalus beserta teksturnya meliputi sebagai berikut :

1. Warna putih dan tekstur kompak sebagaimana hasil perlakuan D0T0, D0T1, D0T2, D0T3, dan D1T0 yang memiliki makna terkait dengan kalus untuk metabolik.
2. Warna putih dan tekstur remah sebagaimana hasil perlakuan D2T0 dan D3T0 yang memiliki makna terkait dengan kalus untuk perbanyakan (embriogenik).
3. Warna putih kekuningan dan tekstur kompak sebagaimana perlakuan D2T3 yang memiliki makna yang memiliki makna terkait dengan kalus untuk metabolik.
4. Warna kuning dan tekstur kompak sebagaimana hasil perlakuan D1T1, D1T2, D1T3, D2T1, D2T2, D3T1, D3T2, dan D3T3 yang memiliki makna terkait dengan kalus untuk metabolik.

Berdasarkan hasil pengamatan, kalus yang tumbuh pada eksplan daun *Legundi* mempunyai dua tekstur yaitu tekstur kompak dan remah. Hal tersebut dikarenakan pemberian berbagai konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan. Namun perlu diketahui juga, menurut Turhan (2004) secara visual kalus dapat dibedakan menjadi tiga yaitu kalus bertekstur kompak, intermediet, dan remah. Pierik (1987) menambahkan bahwa tekstur kalus ialah kompak hingga meremah bergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi media, zat pengatur tumbuh, dan kondisi lingkungan kultur. Dari data pengamatan di atas (Tabel 4.7) dapat diketahui bahwa hampir semua perlakuan menghasilkan kalus yang bertekstur kompak.

Hanya beberapa saja yang bertekstur remah yaitu pada konsentrasi 2,4 D 2 mg/l + TDZ 0 mg/l dan 2,4 D 3 mg/l + TDZ 0 mg/l.

Adapun dari seluruh yang memenuhi syarat untuk mengandung metabolit yang tinggi ialah yang bertekstur kompak dan berwarna putih kekuningan hingga kuning pada perlakuan D1T1, D1T2, D1T3, D2T1, D2T2, D2T3, D3T1, D3T2, dan D3T3. Dari hasil tersebut dapat diketahui jika 2,4 D tinggi dikombinasikan dengan TDZ rendah maka kalus yang dihasilkan ialah berwarna putih dan bertekstur remah. Jika 2,4 D tinggi dikombinasikan dengan TDZ tinggi maka kalus yang dihasilkan ialah berwarna kuning bertekstur kompak, 2,4 D rendah dikombinasikan dengan TDZ tinggi maka kalus yang dihasilkan ialah berwarna putih dan bertekstur kompak. 2,4 D rendah dikombinasikan dengan TDZ rendah maka kalus yang dihasilkan ialah berwarna putih dan kompak.

Data tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4 D dan semakin rendah konsentrasi TDZ maka akan menghasilkan kalus yang bertekstur remah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Syahid (2010) bahwa penggunaan 2,4-D secara tunggal pada semua konsentrasi yang diaplikasikan menghasilkan kalus dengan struktur remah. Dwi (2012) menyatakan bahwa Kalus yang diinduksi dari jaringan meristematik dengan penambahan sitokinin memiliki tekstur yang lebih kompak dari pada kalus yang dihasilkan tanpa sitokinin. kalus bertekstur kompak dipengaruhi pemberian auksin dan sitokinin yang mengatur potensial air dalam sel.

Syahid (2010) menyatakan bahwa Kalus dengan struktur remah (friable) merupakan kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang mudah lepas sedangkan



kalus kompak terdiri dari sekumpulan sel yang kuat. Penelitian ini hampir semua menghasilkan kalus bertekstur kompak. Indah dan Dini (2013) menyatakan bahwa kalus yang baik untuk digunakan sebagai bahan penghasil metabolit sekunder yaitu kalus yang memiliki tekstur kompak. Tekstur kalus dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak. Ramawati (1999) menyatakan bahwa kalus akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder pada saat sel-sel mengalami penurunan aktifitas pembelahan. Menurut hasil penelitian Lindssey dan Yeoman (1983), kalus yang bertekstur remah umumnya akan mengakumulasi senyawa metabolit sekunder dalam jumlah sedikit dibandingkan dengan kalus kompak. Hal ini disebabkan karena kalus remah tingkat proliferasinya lebih tinggi (lebih banyak memproduksi metabolit primer) dari pada kalus kompak. Kalus remah lebih banyak menyerap nutrisi yang ada pada media sedangkan kalus kompak lebih sedikit karena susunan sel pada kalus kompak rapat, padat, dan sulit dipisahkan sehingga proses penyerapan nutrisi cenderung lebih sedikit sehingga menyebabkan kalus tersebut memproduksi metabolit sekunder yang lebih banyak untuk mempertahankan diri. Krestiana dan Rukmini (2013) kalus bertekstur kompak ialah kalus yang mempunyai ikatan sel yang rapat tidak mudah dipisahkan, serta terasa keras bila ditekan. Widyawati (2010) menambahkan bahwa pada kalus kompak, sel mempunyai vakuola yang besar yang memungkinkan kalus dapat menyimpan kandungan air lebih tinggi dan biasanya mempunyai berat basah yang tinggi pula. Pada sel dalam kalus kompak mempunyai dinding polisakarida yang lebih tebal.



Gambar 4.1. Tekstur kalus daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn) (a) kalus kompak pada perlakuan 1 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l TDZ (D1T2) (b) Kalus remah pada perlakuan 2 mg/l 2,4 D + 0 mg/l TDZ (D2T0).

Berdasarkan hasil pengamatan diatas (Tabel 4.7) juga dapat diketahui bahwa warna kalus yang diperoleh dari hasil induksi kalus oleh 2,4 D dan TDZ berwarna putih hingga putih kekuningan, kuning hingga kuning kecoklatan. Perubahan warna kalus ini disebabkan karena kalus tersebut semakin tua (mengalami penuaan), selain itu juga dapat terjadi karena nutrisi yang ada sehingga terjadi persaingan dalam mendapatkan nutrisi sehingga sebagian dari sel tersebut ada yang mengalami kematian. Biasanya pertumbuhan yang cepat dan warna kalus yang cenderung terang mengindikasikan bahwa kondisi kesehatan kultur tersebut cukup baik. Sedangkan warna coklat hingga hitam secara umum menunjukkan keadaan kalus yang sel-selnya telah mati. Ariningsih (2002) menyatakan bahwa semakin lama kalus ditanam pada media perlakuan, warnanya semakin coklat tua bahkan cenderung coklat kehitaman dan muncul kalus muda yang berwarna kuning bening (*yellowish*) dengan tekstur kompak.

Santosa dan Nursandi (2002) menyatakan bahwa kalus kompak terbentuk akibat penurunan aktifitas poliferasi yang dipengaruhi oleh auksin yang terdapat

dalam eksplan. Penambahan 2,4 D pada media memicu sel pada eksplan untuk aktif melakukan pembelahan, memperbesar ukuran sel, meningkatkan tekanan osmotik dan meningkatkan sintesis protein. Sebagaimana menurut Wattimena (1988) penambahan auksin akan merubah tekanan osmotik sel yang kemudian mempengaruhi proses biokimia dalam sel. Proses tersebut meningkatkan sintesis protein yang akan mengaktifkan enzim-enzim metabolisme primer dan sekunder yang ada di dalam sel guna mensintesis senyawa pertumbuhan yang penting. Salah satunya ialah enzim yang berperan dalam sintesis komponen dinding sel. Enzim tersebut akan diubah oleh 2,4 D dan disusun kembali dalam matriks dinding sel yang utuh sehingga akan mempengaruhi berat sel. Kemudian menurut Panjaitan (2003) sitokinin berperan mendorong terjadinya sintesis material dinding sel.

Warna kalus pada perlakuan 2,4 D yang lebih tinggi dengan dikombinasikan dengan konsentrasi TDZ yang lebih rendah cenderung berubah menjadi kuning bahkan hingga kuning kecoklatan dan bisa berubah jadi coklat kehitaman. Terbentuknya warna kalus tersebut dipengaruhi oleh adanya zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin. Seperti yang dinyatakan oleh Santoso dan Nursandi (2004) bahwa dalam aktivitas kultur jaringan, auksin sangat dikenal sebagai hormon yang menghambat kerja sitokinin membentuk klorofil pada kalus, sedangkan sitokinin berfungsi mendorong pembentukan klorofil pada kalus. Perbedaan warna kalus disebabkan oleh fase pertumbuhan sel yang berbeda-beda tiap perlakuan. Kalus yang pertama muncul berwarna putih kemudian kehijauan dan menjadi coklat seiring dengan berjalannya waktu. Hal ini sesuai dengan pendapat Widyawati (2010) bahwa perbedaan warna kalus menunjukkan tingkat perkembangan dari

kalus. Kalus pertama muncul dengan warna putih cerah, semakin gelap dan akhirnya menjadi coklat. Perubahan warna tersebut disebabkan oleh mendewasanya umur sel atau jaringan kalus.

Warna kalus juga mempengaruhi produksi metabolit sekunder. Kalus yang berwarna putih menandakan bahwa kandungan senyawa metabolit sekundernya yang rendah sedangkan kalus yang berwarna hijau kekuningan kandungan metabolit sekundernya lebih tinggi. Dengan demikian dapat dikatakan jika semakin gelap warna kalus maka semakin tinggi produksi metabolit sekunder yang dihasilkan. Adapun pencoklatan pada jaringan terkait dengan banyaknya fenol yang berlebihan. Wickremesinhe dan Arteca (1993) *dalam* Harahap (2005) menyatakan bahwa terjadinya perubahan warna kalus menjadi kecoklatan kemungkinan besar disebabkan oleh pertumbuhan dan perkembangan kalus tersebut telah memasuki fase stasioner (penuaan). Pada umumnya senyawa metabolit sekunder mulai dibentuk pada awal fase stasioner, sehingga semakin gelap warna kalus maka semakin tinggi pula kadar metabolit sekunder yang dihasilkan. Menurut Azizah (2017) bahwa kalus yang berwarna kecoklatan atau kehitaman merupakan kalus non-embriogenik dimana kalus ini tidak memiliki kemampuan untuk beregenerasi

#### **4.5 Evaluasi Perlakuan 2,4 D dan TDZ Secara Keseluruhan terhadap Pertumbuhan Kalus.**

Setiap jenis zat pengatur tumbuh memiliki pengaruh yang berbeda-beda untuk tiap tumbuhan. Seperti halnya 2,4 D untuk pembentukan kalus dapat

mempengaruhi tiga variabel pertumbuhan yaitu hari muncul kalus, persentase eksplan berkalus, dan berat basah kalus. Diperoleh hasil konsentrasi tertinggi untuk hari muncul kalus yaitu pada konsentrasi 3 mg/l kalus mulai tumbuh 11 HST. Pada persentase eksplan berkalus diperoleh konsentrasi 2 mg/l yaitu 76,0833 %, dan pada berat kalus diperoleh konsentrasi tertinggi berat kalus ialah 2 mg/l sebesar 0,2508 gr. Sedangkan TDZ tidak mempengaruhi variabel pertumbuhan kalus. Kalus yang memenuhi syarat untuk menghasilkan metabolit sekunder yang tinggi ialah kalus yang bertekstur kompak dan berwarna kuning hingga kecoklatan. Adapun konsentrasi kombinasi yang menghasilkan kalus yang memenuhi syarat-syarat diatas ialah pada konsentrasi 2,4 D 1 mg/l dan TDZ 0,5 mg/l (D1T2). Diketahui pada konsentrasi tersebut mempunyai berat kalus rata-rata mencapai 0,2867 gr dan persentase kalus rata-rata 80% dengan warna kalus kuning dan bertekstur kompak.

Hal tersebut diatas sesuai sebagaimana pendapat Dwi (2012) menyatakan bahwa kalus yang diinduksi dari jaringan meristematik dengan penambahan sitokinin memiliki tekstur yang lebih kompak daripada kalus yang dihasilkan tanpa sitokinin. Kalus bertekstur kompak dipengaruhi pemberian auksin dan sitokinin yang mengatur potensial air dalam sel. Sebagaimana hasil penelitian ini pada konsentrasi optimum 1 mg/l 2,4 D + 0 mg/l TDZ (D2T0) diperoleh kalus yang remah. Sedangkan kombinasi 2,4 D + TDZ yang lain menghasilkan kalus kompak. Pada hal ini konsentrasi optimum untuk kalus metabolit ialah pada konsentrasi 1 mg/l 2,4 D + 0,5 mg/l TDZ (D1T2).

#### 4.6 Hasil Induksi Kalus Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn) Dalam prespektif

##### Islam.

Allah SWT menciptakan segala macam tumbuhan di muka bumi atas kekuasaan-Nya sebagai karunia Allah SWT untuk mensejahterakan kehidupan manusia dan juga hewan di muka bumi ini. Tumbuhan tersebut mempunyai banyak manfaat diantaranya sebagai makanan, obat-obatan, sebagai pakan ternak dan lain sebagainya. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Al-Quran Surat asy-Syuara' (26) : 7 yang berbunyi :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (QS. Asy-syuara’(26):7).

Penafsiran dari ayat tersebut dapat diartikan *أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ* mengandung makna perintah untuk meneliti. *كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا* mengandung makna dunia tumbuhan. Dimana *أَنْبَتْنَا* , disertai dengan isim dlomir *نَا* yang berarti ada campur tangan antara Allah SWT dengan makhluknya. Yang dimana manusia sebagai khalifah di bumi ini juga mengambil peranan dalam penumbuhan tumbuh-tumbuhan seperti halnya dalam penelitian ini dengan melalui kultur jaringan tumbuhan. *مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* menurut Al-Sheikh (2000) tumbuhan yang baik dan indah dipandang. Adapaun juga kalimat diatas mengandung makna tumbuh-tumbuhan yang baik juga dapat diartikan sebagai tumbuhan yang bermanfaat. Bermanfaat disini juga dapat berfungsi untuk makanan maupun obat-obatan untuk menyembuhkan juga dapat disebut sebagai tumbuhan herbal. Fitryah (2013)

mengartikan kata herbal sebagai tumbuhan yang dapat dijadikan sebagai obat baik akar, batang, daun, bunga, buah, maupun bijinya. Lebih luas dapat dimaknai sebagai tumbuhan yang seluruh bagiannya mengandung senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai obat.

Ayat ini menurut *Tafsir Ibnu Katsir* (2007), Allah ta'ala mengingatkan kebesaran kekuasaan-Nya dan keagungan kemampuan-Nya. Dialah yang Maha Agung, Maha Perkasa yang telah menciptakan bumi dan menumbuhkan didalamnya tumbuh-tumbuhan yang baik berupa tanam-tanaman, buah-buahan, dan hewan. *“Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda”*. yaitu tanda kekuasaan Maha Pencipta. Shihab (2010) juga berpendapat bahwa Allah SWT telah menyediakan tumbuhan untuk dimanfaatkan manusia, baik sebagai bahan bangunan dan sebagainya.

Allah SWT menumbuhkan tumbuhan di muka bumi ini atas segala kekuasaan-Nya. Namun penciptaan Allah SWT tersebut membutuhkan proses untuk pertumbuhannya misalnya dalam ham media tumbuhnya baik berupa tanah maupun unsur-unsur hara lainnya untuk mendukung pertumbuhannya secara optimal. Allah SWT telah berfirman dalam Al-Quran Surat A'-A'raf (7):58 yang berbunyi :

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرُجُ نَبَاتُهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ وَالَّذِي خَبثَ لَا يَخْرُجُ إِلَّا نَكِدًا كَذَلِكَ نُصَرِّفُ الْآيَاتِ

لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ ﴿٥٨﴾

Artinya : *“Dan tanah yang baik, tanaman-tanamannya tumbuh subur dengan seizin Allah; dan tanah yang tidak subur, tanaman-tanamannya hanya tumbuh merana. Demikianlah Kami mengulangi tanda-tanda kebesaran (Kami) bagi orang-orang yang bersyukur”* (QS. Al-A'raf (7) : 58).

*Ibnu katsir* (2007) menyatakan bahwa tetumbuhan yang baik dengan cepat dan subur. Tanah yang baik disini ialah tanah yang mengandung banyak unsur hara makro dan mikro yang cukup yang dibutuhkan oleh tumbuhan. Campbell (2014) menyatakan bahwa tanah yang mengandung banyak nutrisi dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman. Tanaman dalam menyelesaikan siklus hidupnya membutuhkan unsur esensial. Unsur esensial yang dibutuhkan oleh tumbuhan adalah mikro nutrien (karbon, oksigen, sulfur, nitrogen, hidrogen, dan fosfor) dan makronutrien (klorin, besi, mangan, boron, seng, tembaga, dll).

Kalus yang tumbuh dari eksplan daun Legundi dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder untuk pengobatan. Tanaman obat sudah dikemukakan dalam hadits riwayat Imam Muslim dari Jabir bin Abdillah dia berkata bahwa Nabi bersabda,

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أَصَابَ الدَّوَاءُ الدَّاءَ، بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

*Artinya : "Setiap penyakit pasti memiliki obat. Bila sebuah obat sesuai dengan penyakitnya maka dia akan sembuh dengan seizin Allah Subhanahu wa Ta'ala."* (HR. Muslim).

Hadits tersebut diatas bermakna bahwa ada ciptaan Allah SWT yang berkhasiat sebagai obat. Rasulullah SAW sendiri telah bersabda bahwa segala macam penyakit ada obatnya. Demikian pula Legundi, daun tanaman ini sering digunakan untuk obat analgesik, obat luka, obat cacing, obat tipus, pereda kejang, menormalkan siklus haid, dan pembunuh kuman (Sudarsono, *dkk*, 2002).

Penelitian induksi kalus ini menggunakan dua kombinasi zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin. Namun pada eksplan daun Legundi sudah dapat



menumbuhkan kalus tanpa adanya tambahan ZPT eksogen apapun hal ini dikarenakan diduga dalam sel daun Legundi sudah tersedia ZPT auksin dan sitokinin endogen yang mencukupi untuk pertumbuhan kalus. Hal ini sesuai dengan Al-Quran surat Al-Mulk ayat 3-4 yang berbunyi :

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا مَّا تَرَىٰ فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفَوتٍ فَأَرْجِعِ الْبَصَرَ هَلْ تَرَىٰ مِن فُطُورٍ

﴿٣﴾ ثُمَّ أَرْجِعِ الْبَصَرَ كَرَّتَيْنِ يَنقَلِبْ إِلَيْكَ الْبَصَرُ حَاسِئًا وَهُوَ حَسِيرٌ ﴿٤﴾

Artinya : “Yang telah menciptakan tujuh langit berlapis-lapis. Kamu sekali-kali tidak melihat pada ciptaan Tuhan Yang Maha Pemurah sesuatu yang tidak seimbang. Maka lihatlah berulang-ulang, adakah kamu lihat sesuatu yang tidak seimbang (3) Kemudian pandanglah sekali lagi niscaya penglihatanmu akan kembali kepadamu dengan tidak menemukan sesuatu cacat dan penglihatanmu itupun dalam keadaan payah (4)” (QS. Al-Mulk (67) : 3-4).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu dengan seimbang dan sudah tertata rapi. Dalam hal kultur jaringan tumbuhan ini pada tanaman Legundi sudah terdapat ZPT endogen dalam selnya. Sehingga kalus dapat tumbuh pada eksplan daun yang ditanam pada media tanpa ZPT eksogen.

Pada penelitian ini adapun auksin yang digunakan ialah 2,4 D dan sitokininnya ialah TDZ. Karijadi dan Buchory (2007) menyatakan bahwa zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin tidak bekerja sendiri-sendiri, tetapi kedua ZPT tersebut bekerja secara berinteraksi dalam mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Untuk mendapatkan kalus dibutuhkan konsentrasi auksin dan sitokinin yang seimbang. Sebagaimana Allah SWT berfirman dalam Al-Quran surat Al-qamar (54) : 49 yang berbunyi :

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Artinya : “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*” (QS. Al-Qamar (54) : 49).

Muyasar (2007) berpendapat bahwa Allah menciptakan segala sesuatu dan menentukan ukurannya sesuai dengan ketetapan, ilmu pengetahuan dan suratan takdir-Nya. Jadi, semua yang terjadi di alam semesta pasti berdasarkan takdir Allah SWT. Menurut tafsir Ibnu Katsir dijelaskan bahwa Dia menetapkan suatu ukuran dan memberikan petunjuk terhadap semua makhluk kepada ketetapan tersebut. “ukuran” disini dapat diartikan sebagai ukuran yang digunakan pada penelitian ini yakni konsentrasi ZPT. Dan dibalik kata “ukuran” tersebut harus lebih dikaji lagi. Sama halnya pentingnya mengkaji kombinasi ZPT dengan masing-masing konsentrasi yang tepat untuk menumbuhkan kalus pada tanaman legundi (*Vitex trifolia* Linn.). Seperti halnya dalam penelitian ini, diperoleh konsentrasi optimum pada hari muncul kalus ialah pada konsentrasi 3 mg/l 2,4D, dan pada variabel persentase eksplan berkalus pada konsentrasi 2 mg/l 2,4 D dan 0 mg/l TDZ, serta pada variabel berat basah kalus pada konsentrasi yang sama yaitu 2 mg/l 2,4 D dan 0 mg/l TDZ.

Hal-hal tersebut dapat terjadi dikarenakan macam-macam ZPT yang digunakan dan juga menurut kehendak Allah SWT kalus tersebut akan ditumbuhkan. Perlu diketahui juga bahwa semua kembali pada dasar penciptaan yaitu segala sesuatu diciptakan atas kuasa Allah SWT.

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh kombinasi 2,4 D dan TDZ terhadap pertumbuhan kalus Legundi (*Vitex trifolia* Linn) pada media MS dapat diperoleh kesimpulan bahwa :

1. Konsentrasi 2,4 D 2 mg/l berpengaruh nyata pada persentase kalus yaitu 76,083 % dan berat kalus sebesar 0,2508 gr.
2. Berbagai konsentrasi TDZ tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus daun Legundi. Tetapi untuk kalus dengan tujuan metabolit bercirikan kalus bertekstur kompak dan berwarna kuning diperlukan adanya TDZ.
3. Kalus yang memenuhi untuk kalus metabolit ialah pada konsentrasi 2,4 D 1 ml/L + 0,5 TDZ berpengaruh terhadap berat basah kalus yaitu sebesar 0,2867 gr dengan warna kuning bertekstur kompak.

#### 5.2 SARAN

Saran yang dapat disampaikan terkait penelitian ini ialah sebagai berikut :

1. Penggunaan kombinasi 2,4 D dan TDZ diperlukan jika kalus yang diinginkan ialah kalus metabolit yang bertekstur kompak dan kuning. Namun jika untuk kalus embriogenik tidak perlu adanya kombinasi antara 2,4 D dan TDZ (auksin dan sitokinin)

2. Hendaknya dilakukan sub kultur pada media dengan penambahan elisitor/ prekursor untuk meningkatkan senyawa metabolit sekunder.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin Z. 1985. *Dasar - dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Bandung: Angkasa.
- Agusta A. 2006. Diversitas jalur biosintesis senyawa terpena pada makhluk hidup sebagai target obat antiinfeksi. *Jurnal Biologi*. Vol. 8, Nomor 2: 141-152.
- Ahmed, Rafique dan Muhammad Anis. 2012. Role of TDZ in the Quick Regeneration of Multiple Shoots from Nodal Explant of *Vitex trifolia* L. An Important Medical Plant. *Appl Biochem Biotechnol*. 168:957-966.
- Al-ajlouni. 2012. Callus Induction, Plant Regeneration, and Growth On Barley (*Hordeum vulgare* L.). *South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment*. Vol.3. No. 1.
- Alemi, Mobina., Farzaneh Sabouni, Forough Sanjarian, Kamahidin Haghbeen, and Saeed Ansari. 2013. Anti-inflammatory Effect of Seed and Callus of *Nigella sativa* L. Ekstraks on Mix Glial cells with Regard to their Thymoquinone Content. *Journal AAPS PharmSciTech*. Vol. 14(1).
- Al-sheikh, A. B. M. 2000. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 7*. Kairo : Mu'assasah Daar Al-Hilaal.
- Aprisa, R. 2012. Induksi Kalus Embriogenik Dua Genotipe Mutan Jagung (*Zea mays* L.) Pada Media Dasar MS dan N6. *Skripsi*. Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Ardiana, D.W. 2009. Teknik Pemberian Benzyl Amino Purin untuk Memacu Pertumbuhan Kalus dan Tunas pada Kotiledon Melon (*Cucumis melo* L.). *Buletin Teknik Pertanian*. 14(2): 50-53
- Ariati,S.N. 2012. Induksi Kalus Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) Pada Media MS dengan Penambahan 2,4-D, BAP dan Air Kelapa. *Jurnal Natural Science* 1(1) : 78-84
- Ariningsih, I., Solichatun, Endang, A. 2003. Pertumbuhan Kalus dan Produksi Antrakuinon Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) pada Media Murashige-Skoog (MS) dengan Penambahan Ion Ca<sup>2+</sup> dan Cu<sup>2+</sup>. *Biofarmasi* 1 (2): 39-43.
- Arulanandam L, John and S Ghanthikumar. 2011. Indirect Organogenesis of *Vitex trifolia* Linn. An Important medicinal Plant. *Indian Journal of Natural Product and Resources*. Vol. 2(2), pp. 261-264.

- Astuti dan Andayani. 2005. Pengaruh Pemberian BAP dan NAA Terhadap Pertumbuhan Krisan (*Chrysanthemum morifolium*, Ram). *Jurnal Kultur Jaringan Biota X*. (3) 31-35.
- Azizah, R. 2017. Pertumbuhan Kalus Kopi Liberika Tungkal Jambi (*Coffea liberica* Var. Liberica Cv. Tungkal Jambi) dengan Kombinasi 2,4-D dan Kinetin Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Fakultas Pertanian, Universitas Jambi.
- Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan. 1996. Plant Tissue Culture : Theory and Practice, a Revised Edition. *Departemen Of Botani*. Delhi. India. 767p.
- Bollmark, M., Kubat, B. and Eliasson, L. 1988. Variation in endogenous cytokinin content during adventitious root formation in pea cuttings. *J. Plant Physiol.* 132:262-265.
- Campbell, N. A. & Reece, J.B., 2014. *Biologi Jilid 2*. Edisi 8 penyunt. Jakarta: Erlangga.
- Darwati, I. 2007. Kultur Kalus Akar Rambut Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk) Untuk Metabolit Sekunder . *Skripsi tidak diterbitkan* . Institut Pertanian Bogor.
- Debnath, samir C. 2008. Developing a scale-up system for the in vitro multiplication of thidiazuron-induced strawberry shoots using a bioreactor. *Canadian Journal of Plant Science*.
- Dwi, N.M. 2012. Pengaruh Pemberian Air Kelapa Dan Berbagai Konsentrasi Hormon 2,4-D pada Medium MS dalam Menginduksi Kalus Tanaman Anggur (*Vitis vinera* L.). *Jurnal Natural science 1* (1) :53-62
- Elaleem, *et al.*, 2009. Effect of Plant Growth Regulators On Callus Induction and Plant Regeneration In Tuber Segment Culture Of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivar Diamant. *African Journal Of Biotechnology*. Vol.8(11).
- Fitryah, U. I. 2009. Induksi Kalus dari Eksplan Daun Kartika Dieng dengan Pemberian Zat Pengatur Tumbuh BA dan IAA. *Skripsi*. Tidak diterbitkan. Semarang : UNNES.
- George, E.F., and P.D. Sherring ton. 1984. Plant propagation; by Tissue Culture. Exegetics Ltd. England.
- Gunawan, N.A Mattjik. E. Syamsuddin, N. M. A. Wiendi dan A. Ernawati. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Bogor: IPB.

- Hendaryono, dp. Dan wijayani, A. 1994. *Teknik kultur Jaringan*. kanisius: yogyakarta.
- Hendaryono dan wijayanti. 1994. *Teknik Kultur Jaringan: Pengenalan dan petunjuk Perbanyakkan Tanaman secara Vegetatif Modern*. Yogyakarta: kanisius.
- Herbert RB. 1995. *The Biosynthesis of secondary metabolites*. Terjemahan Srigandono B. IKIP Semarang Press. 243 hal.
- Hernandez, M.M, Heraso, C., Villarreal, M.L., Vargas-Arispuro, I., Aranda, E., 1999, Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, (67) , 37–44.
- Heyne K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid III*. Terjemahan Badan Litbang Kehutanan Jakarta. Jakarta: Yayasan Sarana Wana Jaya.
- Indah, N., dan Ermavitalini, D. 2013 . Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn). Pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine ( BAP ) dan 2,4- *Dichlorophenoxyatic Acid* ( 2,4 – D ). Surabaya. *Jurnal sains dan seni pomits* Vol.2 No.1 : 2337 – 3520.
- Intias, S. 2012. Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP terhadap Pembentukan Kalus Purwoceng (*Pimpinella pruatjan*) secara *In Vitro*. *Skripsi*. Program Studi Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Karjadi dan Buchory. 2007. Pengaruh NAA dan BAP Terhadap Pertumbuhan Jaringan Maristem Bwang Putih Pada Media B5. *J. Hort.* 17(3) : 217-223. Khairina, R. 2001. *Pengaruh Konsentrasi Benzil Amino Purin Terhadap Pertumbuhan Eksplan Tanaman Jeruk Manis (Citrus sinensis L.) Secara Kultur Jaringan*. Pekanbaru: Universitas Riau.
- Krestiani, V. & Rukmini. 2013. Kajian Konsentrasi NAA Terhadap Pertumbuhan Kalus Kotiledon Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) Secara *In vitro*. *Fakultas Pertanian*. UMK. 6(1): 16-21.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Terpenoid dan Steroida. Karya Ilmiah. Medan : Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.
- Li, W.X, et.,al, 2005, Flavonoids from *Vitex trifolia* Inhibit Cell Cycle Progression at G2/M phase and Induce Apoptosis in Mammalian Cancer Cells, *J Asian Nat*, h. 615.

- Lima, Ednabel Caracas, *dkk.* 2006. Callus Induction in Leaf of *Croton urucurana* BAILL. *Agrotec., Lavras*, v. 32, n.i.p. 17-22.
- Lindsey, K dan M.M. Yeoman. 1983. Novel Experimental System ffor Studying the Production of Secondary Metabolites by Plant Tissue Culture. *Plant Biotechnology*. 39-66.
- Lutviana A., Y.S.W. Manuhara dan E.S Wida. 2012. *Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh dan NaCl Terhadap Pertumbuhan Kalus Kotiledon Tanaman Bunga Matahari (Helianthus annus L.)*. Surabaya . Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
- Maraghi, A., 1993. *Tafsir Maraghi*. Semarang : Toha Putra.
- Moreira *et al.*, 2016. Plantlet regeneration from young leaf segments of curaua (*Ananas erectifolius*), an Amazon species. *Turkish Journal Of Biology*. 40: 1227-1234.
- Muyassar. 2007. *Tafsir Muyassar (Jilid 4)*. Jakarta: Qisthi Press.
- Nugroho, Agung Endro dan Gemini Alam. 2007. Medical Plant Legundi (*Vitex trifolia* Linn). *A Review*. Bagian Farmakologi dan Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin Makassar.
- Pangaribuan, Ikhwan Fadly. 2013. <http://ikhwanfadly.wordpress.com/hormon-tumbuhan/>. diakses pada 15 Desember 2017.
- Pelletier, J.N., F.C.B.C. Tran, and S. Lalibert. 2004. Tips-N-tricks in plant tissue culture. University du Qubec Montreal. Canada.
- Phillips, G.C., J.F.Hubstenberger, and E.E.Hansen. 1995. Plant Regeneration From Callus and and Cell Suspension Cultures By Somatic Embryogenesis. P.81-90.
- Pierik, R.L.M. 1997. In Vitro Culture of Higher Plants. *Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht 344p*.
- Puspitasari, Andyana dan C.J. Soegiharjdo. 2002. Optimasi Media Penumbuh Kalus Sebagai Langkah Awal Upaya Budidaya *In vitro* Tanaman *Vitex trifolia* L. *Majalah Farmasi Indonesia*. 13 (1), 21-25.
- Putri, Y.S. 2015. Pertumbuhan Kalus *Stevia rebaudiana* Bertoni dari Eksplan Daun dan Ruas Batang dengan Periode Subkultur Berbeda. *Skripsi*. Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.



- Quainoo, A. K. 2012. The Effect of TDZ and 2,4 D Concentrations on the Induction of Somatic Embryo and Embrogenesis in Different Cocoa Genotypes. *Journal of Plant Studies*.
- Rahayu, B., Sholichatun, Anggarwulan E. 2003. Pengaruh Asam 2,4 Diklorofenoksiasetat Terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus Serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. *Jurnal Biofarmasi*. Vol 1 (1) :1-5.
- Rahmawati, K.G. 1999. "Secondary Plant Products in Nature" in *Biotechnology Secondary Metabolites* (Eds. Ramawat, K.G and merillon, J.M). USA: *Sciences Publisher, Inc.* pp: 11-37.
- Ramawat, K.G. 1999. *Secondary plant product in Nature in Biotechnology secondary Metabolism*. U.S.A: Science Publisher, inc. pp 11-37.
- Santoso, U. dan Nursandi, F. 2002. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: UMM Press.
- Samantaray, Sanghamitra, Ashok Kumar Bishoyi, & Satyabrata Maiti. 2013. Plant Regeneration from Callus Cultures of *Vitex trifolia* (Lamiales : Lamiaceae): A Potential Medicinal Plant. *Rev. Biol. Trop.* ISSN-0034-7744. Vol. 61 (3).
- Shihab, M. Q. 2010. *Tafsir Al-Mishbah Volume 15*. Jakarta : Lentera Hati.
- Sitorus, E. N. 2011. Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) secara In Vitro pada Media Murashige dan Skoog dengan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda. *Bioma*, vol. 13, no.1.
- Syahid, S.F, Rostiana, dan M. Rohmah.2010. pengaruh NAA dan IBA terhadap perakaran Pruatjan (*Pimpinella alpine* Mol.) *in vitro*. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*,
- Syanthiqi, S., 2007. *Tafsir Adhqa'ul Bayan*. Jakarta : Pustaka Azzam.
- Turhan, H. 2004. Callus Induction In Growth Transgenic Potato Genotypes. *African Journal Of Biotechnology*. 3(8): 375-378.
- Wattimena, G. A., L. W. Gunawan, N. A. Mattjik, E. Syamsudin, N. M. A. Wiendi dan A. Ernawati. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor : Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB – Lembaga Sumberdaya Informasi IPB.

- Wattimena. 1998. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor : PAU
- Wetherell, D. F. 1976. Pengantar Propagasi Tanaman secara In Vitro. *Terjemahan: D. Gunawan*. IKIP Semarang Press.
- Wickremesinhe, E. R. M. dan R. N. Arteca. 1993. Taxus Callus Cultures: Initiation, Growth Optimization, Characterization and Taxol Production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 35 (1): 181 - 193.
- Widyawati, G. 2010. Pengaruh Konsentrasi NAA dan BAP Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha Curcas L.*) *Tesis tidak diterbitkan*. Surakarta: UNSA.
- Yusnita, 2003. *Kultur Jaringan. Cara memperbanyak tanaman secara efisien*. Jakarta : Agro Media Pustaka.
- Yuwono, T. 2006. *Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.
- Zulkarnain, 2009. *Kultur Jaringan Tanama*. Jakarta: Bumi Aksara.



## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Tabel Data Hasil Pengamatan

## 1. Data Pengamatan Hari Muncul Kalus

no	perlakuan		ulangan			total	rata-rata
	2,4-D	TDZ	1	2	3		
1	0	0	20	17	11	48	16
2	1		14	14	12	40	13,33333
3	2		12	11	11	34	11,33333
4	3		12	11	10	33	11
5	0	0,25	13	19	14	46	15,33333
6	1		19	14	14	47	15,66667
7	2		19	11	10	40	13,33333
8	3		19	11	7	37	12,33333
9	0	0,5	19	18	17	54	18
10	1		13	11	8	32	10,66667
11	2		19	11	13	43	14,33333
12	3		19	8	7	34	11,33333
13	0	0,75	19	17	17	53	17,66667
14	1		14	11	18	43	14,33333
15	2		26	17	8	51	17
16	3		14	9	9	32	10,66667
Total			271	210	186	667	222,3333

## 2. Data Pengamatan Persentase Pertumbuhan Kalus

no	perlakuan		ulangan			total	rata-rata
	2,4-D	TDZ	1	2	3		
1	0	0	5	2	5	12	4
2	1		95	95	80	270	90
3	2		90	98	95	283	94,33333
4	3		90	80	80	250	83,33333
5	0	0,25	10	10	2	22	7,333333
6	1		40	40	20	100	33,33333
7	2		95	60	80	235	78,33333
8	3		50	98	70	218	72,66667
9	0	0,5	30	15	5	50	16,66667
10	1		60	80	70	210	70
11	2		60	70	85	215	71,66667
12	3		90	90	60	240	80

13	0	0,75	30	5	15	50	16,66667
14	1		40	70	50	160	53,33333
15	2		90	20	70	180	60
16	3		80	80	40	200	66,66667
Total			955	913	827	2695	898,3333

### 3. Data Pengamatan Berat Kalus

no	perlakuan		ulangan			total	rata-rata
	2,4-D	TDZ	1	2	3		
1	0	0	0,0031	0,0024	0,0019	0,0074	0,002467
2	1		0,2958	0,5193	0,1461	0,9612	0,3204
3	2		0,3786	0,8062	0,6165	1,8013	0,600433
4	3		0,313	0,386	0,3169	1,0159	0,338633
5	0	0,25	0,0424	0,0398	0,01	0,0922	0,030733
6	1		0,0655	0,0716	0,0334	0,1705	0,056833
7	2		0,1083	0,1825	0,1173	0,4081	0,136033
8	3		0,0422	0,3055	0,282	0,6297	0,2099
9	0	0,5	0,099	0,082	0,0137	0,1947	0,0649
10	1		0,1548	0,3147	0,396	0,8655	0,2885
11	2		0,0833	0,1038	0,202	0,3891	0,1297
12	3		0,1004	0,2278	0,1136	0,4418	0,147267
13	0	0,75	0,0809	0,0185	0,0222	0,1216	0,040533
14	1		0,088	0,1692	0,1083	0,3655	0,121833
15	2		0,1	0,0784	0,2317	0,1784	0,0892
16	3		0,149	0,154	0,0971	0,4001	0,133367
Total			2,1043	3,4617	2,477	8,043	2,710733

## Lampiran 2. Hasil Analisis Variansi (ANOVA) dan uji lanjut DMRT 5%

### 1. a. Hasil analisis variansi pada hari muncul kalus daun Legundi

#### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: HMK

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	288.479 <sup>a</sup>	15	19.232	1.115	.383
Intercept	9268.521	1	9268.521	537.306	.000
D	178.562	3	59.521	3.450	.028
TDZ	26.062	3	8.687	.504	.683
D * TDZ	83.854	9	9.317	.540	.834
Error	552.000	32	17.250		
Total	10109.000	48			
Corrected Total	840.479	47			

a. R Squared = ,343 (Adjusted R Squared = ,035)

### b. Uji Lanjut DMRT 5% hari muncul kalus

#### 1. 2,4 D

#### HMK

Duncan	D	N	Subset	
			1	2
	3	12	11.3333	
	1	12	13.5000	13.5000
	2	12	14.0000	14.0000
	0	12		16.7500
Sig.			.147	.078

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
Based on observed means.  
The error term is Mean Square(Error) = 17,250.

## 2. TDZ

**HMK**

TDZ	N	Subset
		1
0	12	12.9167
0,5	12	13.5833
0,25	12	14.1667
0,75	12	14.9167
Sig.		.291

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
Based on observed means.  
The error term is Mean Square(Error) = 17,250.

## 2.a. Analisis ANAVA dan DMRT 5% persentase pertumbuhan kalus

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: Persentase

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	41950.646 <sup>a</sup>	15	2796.710	10.878	.000
Intercept	151313.021	1	151313.021	588.528	.000
D	33986.063	3	11328.688	44.063	.000
TDZ	3201.562	3	1067.187	4.151	.014
D * TDZ	4763.021	9	529.225	2.058	.065
Error	8227.333	32	257.104		
Total	201491.000	48			
Corrected Total	50177.979	47			

a. R Squared = ,836 (Adjusted R Squared = ,759)

b. Hasil Uji Lanjut DMRT 5% terhadap persentase pertumbuhan kalus

1. 2,4 D

### Persentase

Duncan		Subset		
D	N	1	2	3
0	12	11.1667		
1	12		61.6667	
3	12			75.6667
2	12			76.0833
Sig.		1.000	1.000	.950

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
Based on observed means.  
The error term is Mean Square(Error) = 257,104.

3. TDZ

### Persentase

Duncan		Subset	
TDZ	N	1	2
0,25	12	47.9167	
0,75	12	49.1667	
0,5	12	59.5833	59.5833
0	12		67.9167
Sig.		.101	.212

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
Based on observed means.  
The error term is Mean Square(Error) = 257,104.

## 3.a. Analisis ANAVA dan DMRT 5% berat kalus

## Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Berat

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.062 <sup>a</sup>	15	.071	7.792	.000
Intercept	1.421	1	1.421	156.414	.000
D	.331	3	.110	12.142	.000
TDZ	.353	3	.118	12.942	.000
D * TDZ	.378	9	.042	4.626	.001
Error	.291	32	.009		
Total	2.774	48			
Corrected Total	1.353	47			

a. R Squared = ,785 (Adjusted R Squared = ,684)

## b. Hasil Uji Lanjut DMRT 5% berat kalus

1. 2,4 D

## Berat

Duncan	N	Subset	
		1	2
0	12	,0325	
1	12		,1975
3	12		,2075
2	12		,2508
Sig.		1.000	.205

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
Based on observed means.  
The error term is Mean Square(Error) = ,009.



## 2. TDZ

## Berat

## Duncan

TDZ	N	Subset	
		1	2
0,25	12	,1075	
0,75	12	,1083	
0,5	12	,1558	
0	12		,3167
Sig.		,250	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
Based on observed means.  
The error term is Mean Square(Error) = ,009.

## Berat

## Duncan

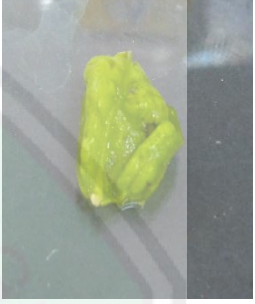


perla kuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
D0T0	3	,0000				
D0T1	3	,0267	,0267			
D0T3	3	,0400	,0400			
D1T1	3	,0567	,0567			
D0T2	3	,0633	,0633			
D1T3	3	,1233	,1233	,1233		
D2T2	3	,1267	,1267	,1267		
D3T3	3	,1333	,1333	,1333		
D2T1	3	,1367	,1367	,1367		
D2T3	3	,1367	,1367	,1367		
D3T2	3	,1467	,1467	,1467		
D3T1	3		,2100	,2100	,2100	
D1T2	3			,2867	,2867	
D1T0	3				,3233	
D3T0	3				,3400	
D2T0	3					,6033
Sig.		,120	,054	,079	,136	1,000






Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

### Lampiran 3. Gambar hasil penelitian

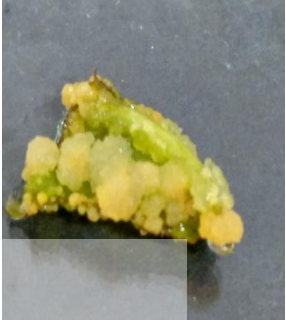
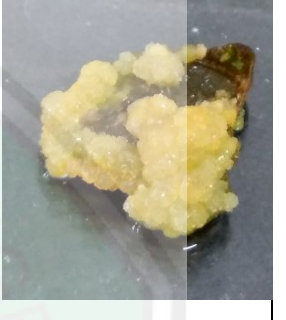
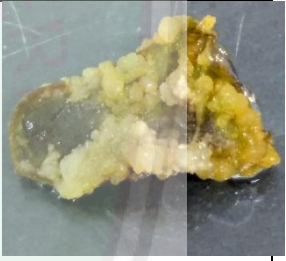
Hasil Pengamatan Pengaruh Pemberian 2,4 D dan TDZ terhadap Warna Kalus

Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn.)

Perlakuan 2,4 D dan TDZ	Warna kalus	Gambar Pengamatan
0 mg/L 2,4 D + 0 mg/L tdz (D0T0)	Putih	
0 mg/L 2,4 D + 0,25 mg/L tdz (D0T1)	Putih	
0 mg/L 2,4 D + 0,5 mg/L tdz (D0T2)	Putih	

0 mg/L 2,4 D + 0,75 mg/L tdz (D0T3)	Putih	
1 mg/L 2,4 D + 0 mg/L tdz (D1T0)	Putih	
1 mg/L 2,4 D + 0,25 mg/L tdz (D1T1)	Kuning	
1 mg/L 2,4 D + 0,5 mg/L tdz (D1T2)	Kuning	
1 mg/L 2,4 D + 0,75 mg/L tdz (D1T3)	Kuning	

2 mg/L 2,4 D + 0 mg/L tdz (D2T0)	Putih	
2 mg/L 2,4 D + 0,25 mg/L tdz (D2T1)	Kuning	
2 mg/L 2,4 D + 0,5 mg/L tdz (D2T2)	Kuning	
2 mg/L 2,4 D + 0,75 mg/L tdz (D2T3)	Putih Kekuningan	
3 mg/L 2,4 D + 0 mg/L tdz (D3T0)	Putih	

3 mg/L 2,4 D + 0,25 mg/L tdz (D3T1)	Kuning	
3 mg/L 2,4 D + 0,5 mg/L tdz (D3T2)	Kuning	
3 mg/L 2,4 D + 0,75 mg/L tdz (D3T3)	Kuning	

#### Lampiran 4. Perhitungan Larutan Stok

Lampiran stok dibuat 100 ppm dalam 100 ml Aquades dengan perhitungan:

- a. Larutan stok 2,4 D 100 ppm dalam 100 ml

$$\text{Larutan stok 2,4 D 100 ppm} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

- b. Larutan stokl TDZ 100 ppm dalam 100 ml

$$\text{Larutan stok TDZ 100 ppm} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

### Lampiran 5. Perhitungan Pengambilan Larutan Stok

#### 1. Perlakuan Pemberian 2,4 D

##### a. Konsentrasi 1 mg

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

$$100 \text{ mg} \times V1 = 1 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{1 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}}{100 \text{ mg}}$$

$$V1 = 1 \text{ ml}$$

##### b. Konsentrasi 2 mg

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

$$100 \text{ mg} \times V1 = 2 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{2 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}}{100 \text{ mg}}$$

$$V1 = 2 \text{ ml}$$

##### c. Konsentrasi 3 mg

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

$$100 \text{ mg} \times V1 = 3 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{3 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}}{100 \text{ mg}}$$

$$V1 = 3 \text{ ml}$$

#### 2. Perlakuan Pemberian TDZ

##### a. Konsentrasi 0,25 mg

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

$$100 \text{ mg} \times V1 = 0,25 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{0,25 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}}{100 \text{ mg}}$$

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

##### b. Konsentrasi 0,5 mg

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

$$100 \text{ mg} \times V1 = 0,5 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{0,5 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}}{100 \text{ mg}}$$

$$V1 = 0,5 \text{ ml}$$

c. Konsentrasi 0,75 mg

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

$$100 \text{ mg} \times V1 = 0,75 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{0,75 \text{ mg} \times 100 \text{ ml}}{100 \text{ mg}}$$

$$V1 = 0,75 \text{ ml}$$

### Lampiran 6. Alat-alat Penelitian



Autoklaf



Oven



Laminar air flow



Timbangan analitik



Hot plate



Kompore



Saringan, botol kultur,  
cawan petri, scalpel,  
pinset, mata pisau



Mikropipet dan tip



pH meter

## Lampiran 7. Bahan-Bahan Penelitian



TanaLegundi



Bayclin



Alkohol



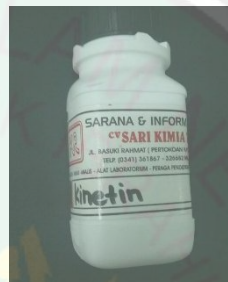
Bakterisida



Fungisida



Media MS



ZPT



ZPT 2,4 D



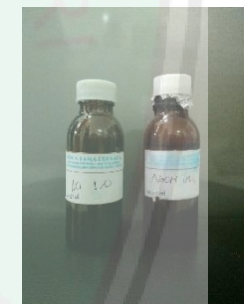
Agar-agar dan aluminium foil



Kertas label, plastik, Karet gelang



Gula pasir



HCl dan NaOH



**Lampiran 8. Foto Kegiatan**





KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI  
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./Faks. (0341) 558933  
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: [biologi@uin-malang.ac.id](mailto:biologi@uin-malang.ac.id)

#### BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Nadia Alfa Sakinah  
NIM : 13620076  
Program Studi : Biologi  
Semester : Ganjil TA 2017/2018  
Pembimbing I : Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd.  
Judul Skripsi : Pengaruh Kombinasi 2,4 D dan Thidiazuron (TDZ) untuk  
Pertumbuhan Kalus Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn) pada  
Media MS

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	TTD Pembimbing
1	07 Agustus 2017	Konsultasi judul	<i>ke</i>
2	30 Agustus 2017	Konsultasi BAB I	<i>ke</i>
3	04 September 2017	Revisi BAB I	<i>ke</i>
4	18 September 2017	Konsultasi BAB I dan BAB II	<i>ke</i>
5	22 September 2017	Revisi BAB II	<i>ke</i>
6	29 September 2017	Konsultasi BAB II dan BAB III	<i>ke</i>
7	11 Oktober 2017	Revisi BAB I,II, dan III	<i>ke</i>
8	13 November 2017	Konsultasi Data	<i>ke</i>
9	25 November 2017	Konsultasi BAB IV dan V	<i>ke</i>
10	04 Desember 2017	Revisi BAB IV dan V	<i>ke</i>
11	18 Desember 2017	ACC Keseluruhan	<i>ke</i>

Pembimbing Skripsi I

Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd.  
NIP. 19630114 1999903 1 001

Malang, 18 Desember 2017  
Ketua Jurusan,

Romaidi, M. Si. D. Sc  
NIP. 19810201 200901 1 019



KEMENTERIAN AGAMA  
 UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
 MALANG  
 FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
 JURUSAN BIOLOGI  
 Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./Faks. (0341) 558933  
 Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: [biologi@uin-malang.ac.id](mailto:biologi@uin-malang.ac.id)

**BUKTI KONSULTASI SKRIPSI**

Nama : Nadia Alfa Sakinah  
 NIM : 13620076  
 Program Studi : Biologi  
 Semester : Ganjil TA 2017/2018  
 Pembimbing II : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A  
 Judul Skripsi : Pengaruh Kombinasi 2,4 D dan Thidiazuron (TDZ) untuk  
 Pertumbuhan Kalus Daun Legundi (*Vitex trifolia* Linn) pada  
 Media MS

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	TTD Pembimbing
1	04 Desember 2017	Konsultasi BAB I dan II integrasi	
2	11 Desember 2017	Konsultasi BAB IV integrasi	
3	18 Desember 2017	ACC skripsi integrasi Keseluruhan	
4	29 Desember 2017	ACC revisi sidang	

Pembimbing Skripsi II

Dr. H. Ahmad Barizi, M.A.  
 NIP. 19731212 199803 1 001



Malang, 29 Desember 2018  
 Ketua Jurusan,  
  
Romaidi M. Si, D. Sc  
 NIP. 19810201 200901 1 019