

**INDUKSI KALUS PADI HITAM (*Oryza sativa L.*) VARIETAS WOJALAKA
MENGUNAKAN 2,4-DICHLOROPHENOXY ACETID ACID (2,4-D) DAN
ASAM AMINO PROLIN SECARA *IN-VITRO***

SKRIPSI

Oleh:
SAFIRA MAKHRUSA ZULDA
NIM. 16620063



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**INDUKSI KALUS PADI HITAM (*Oryza sativa L.*) VARIETAS WOJALAKA
MENGUNAKAN 2,4-DICHLOROPHENOXY ACETID ACID (2,4-D) DAN
ASAM AMINO PROLIN SECARA *IN-VITRO***



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:
SAFIRA MAKHRUSA ZULDA
NIM. 16620063**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

HALAMAN PERSETUJUAN

INDUKSI KALUS PADI HITAM (*Oryza sativa* L.) VARIETAS
WOJALAKA MENGGUNAKAN 2,4D-DICHLOROPHENOXY ACETID
ACID (2,4-D) DAN ASAM AMINO PROLIN SECARA *IN-VITRO*

SKRIPSI


Oleh :
SAFIRA MAKHRUSA ZULDA
NIM. 16620063

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji:
Tanggal 30 Oktober 2020

Pembimbing I

Pembimbing II


Shinta, M. Si
NIP. 1988011020160801206


Dr. H. Ahmad Barizi, M. A.
NIP. 197312121998031008

Mengetahui,
Ketua Program Studi Biologi


Dr. Evika Sandi Savitri, M. P.
NIP. 197410182003122002

HALAMAN PENGESAHAN

INDUKSI KALUS PADI HITAM (*Oryza sativa* L.) VARIETAS WOJALAKA
MENGUNAKAN 2,4D-DICHLOROPHENOXY ACETID ACID (2,4-D) DAN ASAM
AMINO PROLIN SECARA IN-VITRO

SKRIPSI

Oleh:


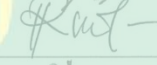
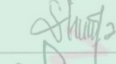

SAFIRA MAKHRUSA ZULDA

NIM. 16620063

Telah dipertahankan

Di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai salah satu persyaratan
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal: November 2020

Penguji Utama	<u>Suyono, M.P</u> NIP. 19710622 200312 1 002	
Ketua Penguji	<u>Ruri Siti Resmisari, M.Si</u> NIP. 19790123 2016080 1 2063	
Sekretaris Penguji	<u>Shinta, M.Si</u> NIP. 19830110 20160801 2 064	
Anggota Penguji	<u>Dr. H. Ahmad Barizi, M.A</u> NIP. 19731212 199803 1 008	

Mengesahkan,
Ketua Program Studi Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P

NIP. 1974101820033122002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Kupersembahkan karya yang jauh dari kata sempurna ini kepada orang-orang yang telah memberikan motivasi dan dukungan teruntuk: Ibu Tercintaku My Wonder Woman Lilik Zulfah yang selalu mengiringi setiap langkahku, Ibu yang tiada duanya selalu tegar dalam mengasuh fira. Untuk Ayah ku Achmad Dahlan (Alm.) terima kasih atas doanya selama ini, sudah menemani fira dengan waktu yang cukup banyak. Semoga ayah diberi tempat yang terbaik disisi Allah.



MOTTO

“If you give me rice, I’ll eat today; if you teach me how to grow rice, I’ll eat every day” –Mahatma Gandhi



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Safira Makhrusa Zulda

NIM : 16620063

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Induksi kalus Padi Hitam (*Oryza sativa* L.) Varietas Wojalaka Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxy Acetid Acid (2,4-D) dan Asam Amino Prolin secara *In-Vitro*

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

Malang, 05 November 2020

: pernyataan,



Makhrusa Zulda
NIM. 16620063

Induksi Kalus Padi Hitam (*Oryza sativa* L.) Varietas Wojalaka Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxy Acetid Acid (2,4-D) dan Asam Amino Prolin Secara *In-vitro*.

Safira Makhrusa Zulda, Shinta dan H. Ahmad Barizi

ABSTRAK

Budidaya padi hitam di Indonesia saat ini sangat jarang, karena padi hitam memiliki waktu pertumbuhan yang panjang serta sensitif terhadap musuh alami. Padi hitam var. Wojalaka digolongkan sebagai pangan fungsional karena memiliki kandungan antosianin tinggi yang bermanfaat bagi kesehatan. Namun, viabilitas benih var. Wojalaka setelah 6 bulan penyimpanan dari masa panen sering mengalami penurunan, sehingga petani jarang menanam yang menyebabkan terancamnya plasma nutfah. Konservasi secara *in-vitro* menjadi solusi agar menjamin ketersediaan tanaman dalam jangka waktu yang panjang serta menghasilkan produksi bibit yang melimpah melalui metode kultur kalus dengan menggunakan zat pengatur tumbuh 2,4-Dichlorophenoxy Acetid Acid (2,4-D) dan asam amino prolin pada media MS. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh 2,4-D, prolin dan kombinasi keduanya terhadap induksi kalus padi hitam var. Wojalaka. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktorial, faktor pertama adalah 2,4-D dengan konsentrasi 0 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L dan faktor kedua adalah prolin dengan konsentrasi 0 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L sebanyak 8 ulangan. Data dianalisis menggunakan *two-way* ANOVA dan uji lanjut menggunakan DMRT 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 2,4-D 8 mg/L efektif terhadap hari muncul kalus 5 HST, persentase pembentukan kalus sebesar 68,75% dan berat basah kalus sebesar 64,50 mg. Pemberian prolin 300 mg/L efektif terhadap persentase pembentukan kalus sebesar 58,33%. Kombinasi 2,4-D 8 mg/L dan prolin 300 mg/L efektif terhadap persentase pembentukan kalus sebesar 75%, berat basah kalus 67,12 mg dengan tekstur kalus remah berwarna putih kekuningan dan memiliki sel-sel inti yang jelas serta memiliki banyak ruang antar sel.

Kata kunci: *Induksi kalus, 2,4-Dichlorophenoxy Acetid Acid (2,4-D), Prolin, Padi hitam, Wojalaka*

***In-vitro* Callus Induction of Black Rice (*Oryza sativa* L.) Variety Wojalaka Using 2,4-Dichlorophenoxy Acetid Acid (2,4-D) and Amino Acid Proline.**

Safira Makhrusa Zulda, Shinta dan H. Ahmad Barizi

ABSTRAK

Black rice cultivation in Indonesia is currently very rare because black rice has a long growing period and is sensitive to natural enemies. Black rice of Wojalaka variety is categorized as functional food because it has high anthocyanin content which is beneficial for health. However, the seed viability of black rice of Wojalaka variety after storage for 6 months from harvest often decreases, so that, farmers rarely plant black rice of Wojalaka variety which threatens the germplasm. *In-vitro* conservation is a solution to ensure plant availability in the long term and produce abundant seed production through the callus culture method using the growth regulator of 2,4-Dichlorophenoxy Acetid Acid (2,4-D) and proline amino acid in MS media. This study aims to determine the effect of 2,4-D, proline and their combination on callus induction of black rice of Wojalaka variety. This study used a two-factorial Completely Randomized Design (CRD), the first factor is 2,4-D with a concentration of 0 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L and the second factor is proline with a concentration of 0 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L for 8 replications. However, the data are analyzed using *two-way* ANOVA. Then, the further tests is analyzed using DMRT 5%. The results show that the concentration of 2,4-D 8 mg/L is effective against the day when the callus appeared 5 DAS, the percentage of callus formation is 68.75% and the fresh weight of callus is 64.50 mg. Furthermore, 300 mg/L proline administration is effective against the percentage of callus formation of 58.33%. The combination of 8 mg/L 2,4-D and 300 mg/L proline is effective against the percentage of callus formation by 75%, the fresh weight of the callus is 67.12 mg with a yellowish white, friable callus texture and clear nucleus cell and many space between cells.

Keywords: *Callus induction, 2,4-Dichlorophenoxy Acetid Acid (2,4-D), Proline, Black rice, Wojalaka*

تحريض الكالس للأرز الأسود (*Oryza Sativa L.*) لصنف **Wojalaka** باستخدام 2,4- حمض ثنائي كلورو فينوكسي الأسيتك (2,4-د) وحمض البرولين الأميني بطريقة الفيترو

سفيرة مخروسة زلدى، سرتنا وأحمد بريدي

مستخلص البحث

تمكين الرز الأسود قليل جدا في إندونيسيا، لأنه يملك الوقت التطور الطويل ومرهف إلى العدو الطبيعي . الرز الأسود الفار ينقسم **Wojalaka** الطعام الوظيفي لأنه يملك العنصر الأنثوسيانين anthocyanin الأعلى النفع للصحة . بل، بقاء *viability* بذر فار. **Wojalaka** بعد 6 الأشهر الحفظ من عصر التاج يلاقي تخفيضا كثيرا، حتى ينبت الفلاح قليلا من الذي يسبب تحديد الوراثة *germplasm*. الصيانة مختبرا، تصبح المحلول كي تضمن وفر النبات في الوقت الطويل وتحصل الإنتاج البذر الكثير تمر على طريقة ثقافة الكالس باستخدام الذات الضابط النبت 2,4- حمض ثنائي كلورو فينوكسي الأسيتك (2,4-د) وبرولين الأحماض الأمينية للواسطة م.س (MS). يهدف هذا البحث لمعرفة أثر 2,4 - د، برولين ومزيج كلاهما للحث الكالس الرز الأسود فار . **Wojalaka** يستخدم هذا البحث الخطة الإعتباطية التامة (CRD) العنصرين، العنصر الأول هو 2,4-د ياكترات 0 م غ/ل، 2 م غ/ل، 4 م غ/ل، 8 م غ/ل. والعصر الثاني هو برولين ياكترات 0 م غ/ل، 100 م غ/ل، 200 م غ/ل، 300 م غ/ل ب 8 تكريرا. تحلل البيانات ان تستخدم سبيلين أنوفا (*two-way ANOVA*) والإختبار التالي باستخدام (DMRT) 5%. تدل حصيلة البحث أن إكترات 2,4-د سارا ليوم طلوع الكالس 5 (DAS)، نسبة مئوية تشكيل الكالس 68.75% وثقل رطب الكالس 64.50 م غ. إعطاء برولين 300 م غ/ل سار لنسبة مئوية تشكيل الكالس 58.33%. مزيج 2,4-د م غ/ل وبرولين 300 م غ/ل سار لنسبة مئوية تشكيل الكالس 75%، ثقل رطب الكالس 67.12 م غ بالشكل الكالس كسرة خبز الأبيض المصفر ويملك الخليات الرئيسية الصريحة ويملك كثير الغراف بين الخلية.

الكلمات الرئيسية: تحريض الكالس، 2,4- حمض ثنائي كلورو فينوكسي الأسيتك (2,4-د)، برولين، أرز أسود، **Wojalaka**

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kepada kehadiran Allah SWT. yang telah melimpahkan berkat, rahmat dan hidayah-Nya. Shalawat serta salam tetap tucurahkan kepada junjungan Nabi Muhammad SAW. beserta keluarga dan para sahabatnya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dan skripsi ini dengan baik. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini kepada:

1. Prof. Dr. H. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri M.P selaku Ketua Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Shinta M.Si dan Dr. H. Ahmad Barizi M.A selaku pembimbing skripsi dan pembimbing agama yang telah banyak memberikan bimbingan selama melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi.
5. Suyono M.P dan Ruri Siti Resmisari M.Si selaku penguji yang telah banyak memberikan banyak masukan dan saran yang membangun sehingga tugas akhir dapat terselesaikan.
6. Romaidi M.Si D.Sc (Alm.) dan Dr. Evika Sandi Savitri M.P selaku dosen wali yang telah memberikan dukungan dan semangat hingga skripsi ini terselesaikan.
7. Ibu Lilik Zulfah dan Ayah Achmad Dahlan tersayang yang senantiasa memberikan doa dan support kepada penulis dalam menuntut ilmu selama ini.
8. Ust. Wirdana dan Ustdz Iffat yang telah memberi motivasi dalam menuntut ilmu dan memberikan motivasi.

9. Sahabat riset Humayiroh, Yunita D.U., Lina H.R., W. Maslahah., mas Miftah yang telah menjadi partner sekaligus sahabat yang pantang menyerah pada musim corona ini sekaligus teman yang membantu penelitian saya di laboratorium fisiologi tumbuhan.
10. Sahabat biotaba Yumna H., S. Faiqotul., Ilmi H., Yeti M., N. Izzah., Nanda R., D. Lailil R., Selfia F., A. Churin N. dan Wilda W yang telah mewarnai hari-hari selama tinggal di tabarakah.
11. Sahabat Naila Afifah, Yuni pratiwi, Nurul Azizah dan Mulfia Rozanah yang telah memberi support dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
12. Teman-teman Gading Putih 16 khususnya KB3 SAMAWA yang memberikan kesan tak terlupakan selama kuliah di Biologi UIN MALANG.
13. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bisa bermanfaat bagi pembaca.
Aamin Ya Rabbal 'Alamin.

Wassalamualaikum Wr.Wb.

Malang, 30 Oktober 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vi
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
مستخلص البحث	xi
KATA PENGANTAR	xii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.4 Hipotesis	8
1.5 Manfaat Penelitian	9
1.6 Batasan Masalah	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	12
2.1 Tanaman Padi Hitam (<i>Oryza sativa</i> L.) Menurut Islam	12
2.2 Deskripsi dan Klasifikasi Padi Hitam (<i>Oryza sativa</i> L.).....	14
2.3 Kandungan dan Manfaat Padi Hitam (<i>Oryza sativa</i> L.).....	20
2.4 Budidaya Padi Hitam (<i>Oryza sativa</i> L.).....	21
2.5 Padi Hitam var. Wojalaka (<i>Oryza sativa</i> L.)	21
2.6 Kultur Jaringan <i>In-vitro</i>	22
2.6.1 Definisi Kultur Jaringan <i>In-vitro</i>	22
2.6.2 Eksplan	23
2.6.3 Media	24
2.7 Kultur Kalus	24
2.8 Zat Pengatur Tumbuh.....	27
2.8.1 Pengaruh Pemberian ZPT 2,4-D pada Media Kultur Kalus Padi	28
2.9 Asam Amino	28

2.9.1 Pengaruh Pemberian Asam Amino Prolin pada Media Kultur Kalus Padi	30
---	----

BAB III METODE PENELITIAN	32
3.1 Rancangan Penelitian	32
3.2 Waktu dan Tempat	32
3.3 Variabel Penelitian	33
3.4 Alat dan Bahan	33
3.4.1 Alat	33
3.4.2 Bahan	33
3.5 Prosedur Penelitian	33
3.5.1 Sterilisasi Alat	33
3.5.2 Sterilisasi Ruang dan Tanam	34
3.5.3 Pembuatan Larutan Stok 2,4-D	34
3.5.4 Pembuatan Larutan Prolin	34
3.5.5 Pembuatan Media	34
3.5.5.1 Pembuatan Media Perkecambahan Padi Hitam	34
3.5.5.2 Pembuatan Media Induksi Kalus Padi Hitam var. Wojalaka	35
3.5.6 Sterilisasi dan Inisiasi Eksplan Benih Padi Hitam Var. Wojalaka	35
3.6 Parameter Pengamatan	35
3.7 Analisis Data	36
3.8 Desain Penelitian	37
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Pengaruh 2,4-Dichlorophenoxy Acetid Acid (2,4-D) Terhadap Induksi Kalus Padi Hitam (<i>Oryza sativa</i> L.) secara <i>In-Vitro</i>	39
4.2 Pengaruh Prolin Terhadap Induksi Kalus Padi Hitam (<i>Oryza sativa</i> L.) secara <i>In-Vitro</i>	43
4.3 Pengaruh Kombinasi 2,4-Dichlorophenoxy Acetid Acid (2,4-D) dan Prolin Terhadap Induksi Kalus Padi Hitam (<i>Oryza sativa</i> L.) secara <i>In-Vitro</i>	47
4.3.1 Pengamatan Kuantitatif	47
4.3.2 Pengamatan Kualitatif	50
4.4 Kajian Penelitian dalam Perspektif Islam	55
BAB V PENUTUP	58
5.1 Kesimpulan	58
5.2 Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	60
DAFTAR LAMPIRAN	70

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Rancangan kombinasi ZPT 2,4-D dan asam amino prolin	39
Tabel 4.1 Hasil ANOVA pengaruh 2,4-D terhadap induksi kalus padi hitam var. Wojalaka	47
Tabel 4.2 Hasil uji DMRT pengaruh 2,4-D terhadap induksi kalus padi hitam var. Wojalaka	48
Tabel 4.3 Hasil ANOVA pengaruh prolin terhadap induksi kalus padi hitam var. Wojalaka	52
Tabel 4.4 Hasil uji DMRT pengaruh prolin terhadap induksi kalus padi hitam var. Wojalaka	53
Tabel 4.5 Hasil ANOVA pengaruh kombinasi 2,4-D dan prolin terhadap induksi kalus padi hitam var. Wojalaka	57
Tabel 4.6 Hasil uji DMRT pengaruh kombinasi 2,4-D dan prolin terhadap induksi kalus padi hitam var. Wojalaka	58
Tabel 4.7 Pengaruh kombinasi 2,4-D dan prolin terhadap warna dan tekstur kalus padi hitam var. Wojalaka	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi akar.....	15
Gambar 2.2 Batang dan ruas tanaman padi.....	16
Gambar 2.3 Morfologi padi.....	17
Gambar 2.4 Letak helai daun dan lidah daun pada batang	18
Gambar 2.5 Morfologi spikelet	19
Gambar 2.6 Morfologi buliran	20
Gambar 2.7 Kondisi kalus: dari biji padi var. Ciherang selama 21 hari	25
Gambar 2.8 Struktur kimia 2,4-D.....	27
Gambar 2.9 Struktur senyawa molekul prolin.....	30
Gambar 3.1 Alur desain penelitian	38
Gambar 4.1 Morfologi perlakuan ZPT 2,4-D tanpa asam amino prolin.....	42
Gambar 4.2 Morfologi perlakuan asam amino prolin tanpa ZPT 2,4-D.....	45
Gambar 4.3 Morfologi warna dan tekstur padi hitam var. Wojalaka pada semua konsentrasi 2,4-D dan prolin	52
Gambar 4.4 Morfologi dan anatomi dengan perbesaran 1000X kalus padi hitam var. Wojalaka, a.dan b. Kalus kompak(2,4-D 2 mg/L+100 mg/L), c. dan d. Kalus remah (2,4-D 4 mg/L+ prolin 300 mg padi.....	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Pengamatan	70
Lampiran 2. Data Hasil ANOVA	72
Lampiran 3. Data Morfologi dan Anatomi Kalus.....	80
Lampiran 4. Perhitungan Konsentrasi 2,4-D dan Prolin.....	83
Lampiran 5. Media MS	84
Lampiran 6. Tabel color chart Pantone TPX.....	85
Lampiran 7. Bukti konsultasi skripsi	89



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara berkepulauan yang memiliki 1,3% luas wilayah bumi serta memiliki keanekaragaman tumbuhan yang sangat tinggi (Kusmana & Agus, 2015). Tumbuhan memiliki peran penting dalam kehidupan manusia, khususnya dalam hal pangan. Tumbuhan berpotensi sebagai bahan pangan karena tumbuhan memiliki beberapa bagian yang dapat dikonsumsi manusia, di dalamnya mengandung nutrisi dan gizi yang baik untuk tubuh manusia (Prabaningrum *et al*, 2018). Oleh karena itu tumbuhan diciptakan oleh Allah memiliki fungsi yang beragam, bagi kehidupan manusia tumbuhan menjadi sumber makanan karena memiliki kandungan dan nutrisi yang melimpah. Hal tersebut terdapat dalam Al-qur'an yang menjelaskan tentang berbagai macam tumbuhan yang baik pada surah Asy-Syuara (26) ayat 7 yang berbunyi:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ (٧)

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapa banyakkah Kami tumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (Q.s Asy-syuara (26): 7)

Menurut Shihab (2002), menjelaskan bahwa kata (الى) *ila/* ke pada firman-Nya di awal ayat ini: (اولم يرو الى الارض) apakah mereka tidak melihat ke bumi, merupakan kata yang mengandung makna batas akhir. Kalimat ini berfungsi memperluas arah pandangan hingga batas akhir, dengan demikian ayat ini mengundang manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seantero bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya dan aneka keajaiban yang terhampar pada tumbuh- tumbuhannya. Kata (زَوْجٍ) *zauj* berarti *pasangan*. Pasangan yang dimaksud ayat ini adalah pasangan tumbuh-tumbuhan, karena tumbuhan muncul dicelah tanah yang terhampar di bumi, dengan demikian ayat ini mengisyaratkan

tumbuh-tumbuhan pun memiliki pasangan-pasangan guna untuk pertumbuhannya. Ada tumbuhan yang memiliki benang sari dan putik sehingga menyatu dalam diri pasangannya dan dalam penyerbukannya tidak membutuhkan pejantan dari bunga lain, dan ada juga yang hanya memiliki salah satunya saja sehingga membutuhkan pasangannya. Kata (كريم) karim antara lain digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang baik, paling tidak adalah yang subur dan bermanfaat. Salah satu tumbuhan yang baik dan bermanfaat sebagai bahan pangan berasal dari tanaman padi.

Padi (*Oryza sativa* L.) merupakan salah satu makanan pokok terpenting yang menyediakan sumber karbohidrat bagi lebih dari setengah populasi dunia (Tyagi *et al.*, 2004; Htwe *et al.*, 2011). Terdapat beberapa macam jenis beras yaitu beras putih, coklat, merah dan hitam (Kristamtini *et al.*, 2014). Berbagai macam beras tersebut dapat dibedakan melalui warna pigmen yang terletak pada lapisan perikarp dan aleuron (Herliana, *et al.*, 2019). Beras merah dan beras hitam memiliki pigmen warna ungu pada lapisan perikarp karena mengandung antosianin (Purwanto, *et al.*, 2018). Banyaknya kandungan antosianin pada beras hitam sehingga beras hitam digolongkan dalam pangan fungsional (Istanti *et al.*, 2018; Chaichana, 2019). Pangan fungsional sendiri didefinisikan sebagai makanan yang bermanfaat untuk kesehatan diluar zat gizi dan nutrisi yang tersedia. Pemanfaatan pangan fungsional menjadi daya tarik tersendiri bagi masyarakat modern karena kandungan dari makanan tersebut yang menyehatkan serta higienis (Kusumayanti *et al.*, 2018).

Beras hitam memiliki kandungan yaitu pitosterol, α -oryzanol, tokoferol, tokotrinol, senyawa fenolik sederhana dan antosianin (*cyanidin-3-glucoside*, *peonidin-3-glucoside*, *malvidin* dan *pelargonidin-3, 5-diglucoside*) (Choi *et al.*, 2010; Rukmana *et al.*, 2017). Beras hitam memiliki kandungan protein, vitamin dan mineral yang lebih tinggi dibandingkan dengan beras putih serta memiliki kandungan antosianin 6 kali lebih banyak dibandingkan dengan beras merah (Thanuja & Parimavalli, 2019). Manfaat dari beras hitam untuk kesehatan menurut Adhi (2017), yaitu dapat mencegah beberapa gangguan fungsi kanker/tumor, gangguan fungsi

ginjal, gangguan anemia, memperlambat penuaan, meningkatkan daya tahan tubuh terhadap penyakit serta dapat memperbaiki kerusakan sel hati.

Tanaman padi memiliki plasma nutfah yang beranekaragam, ditemukan sekitar 1127 varietas hasil eksplorasi plasma nutfah tanaman padi di Indonesia pada tahun 1995 sampai 2002 (Silitonga, 2004; Hanas *et al.*, 2017). Padi hitam Wojalaka adalah salah satu varietas padi yang berasal dari Manggarai, Nusa Tenggara Timur (NTT) (Budiman *et al.*, 2012; Shinta *et al.*, 2014; Nashrurrokhman *et al.*, 2019). Padi hitam var. Wojalaka memiliki keunggulan morfologi yang lebih pendek dibandingkan var. Cempo ireng, Manggarai dan Toraja, memiliki ruas yang lebih banyak dibandingkan var. Cempo ireng dan Manggarai, memiliki kandungan antosianin sekitar 435,38 ppm serta memiliki waktu berbunga dan panen yang lebih cepat dibandingkan dengan varietas padi hitam yang lain (Shinta, 2014; Basith, 2014; Shinta dan Eko, 2013).

Budidaya padi hitam di Indonesia saat ini sangat jarang dan hanya pada daerah tertentu yang membudidayakan, hal tersebut disebabkan karena padi hitam memiliki waktu pertumbuhan yang panjang serta memiliki sensitivitas terhadap musuh alami. Tingginya permintaan beras hitam yang digunakan sebagai makanan sehat, beberapa petani di Kepanjen Kabupaten Malang mengembangkan budidaya padi hitam var. Wojalaka secara organik (Budiman *et al.*, 2012). Beras hitam organik memiliki daya jual yang tinggi karena memiliki kandungan dan nutrisi serta bermanfaat bagi kesehatan khususnya pada penderita diabetes (Hanifah, 2016). Namun, hasil uji pendahuluan yang telah dilakukan pada benih padi hitam var. Wojalaka yang berumur lebih dari 6 bulan masa penyimpanan setelah panen mengalami penurunan viabilitas benih, sehingga penyimpanan benih untuk perbanyakan tidak dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Sedikitnya para petani yang menanam padi hitam di lapang menyebabkan terancamnya varietas lokal sehingga dapat menyebabkan hilangnya plasma nutfah padi hitam Wojalaka. Agar plasma nutfah dari padi hitam var. Wojalaka tetap terjaga serta agar menjamin ketersediaan tanaman dalam jangka waktu yang panjang maka konservasi perlu dilakukan (Dewi, 2014).

Beberapa macam teknik konservasi yang dapat dilakukan untuk menjaga plasma nutfah padi hitam var. Wojalaka, salah satunya adalah *ex situ* di lapang. Namun, konservasi secara *ex situ* di lapang memiliki kelemahan seperti adanya hama atau penyakit pada tanaman yang menyebabkan hilangnya plasma nutfah (Towill, 2005). Selain konservasi *ex situ* dapat dilakukan teknik konservasi *in-vitro* untuk mengatasi kelemahan konservasi secara *ex situ*. Menurut Tambunan & Ika (2003), konservasi secara *in-vitro* (dalam media kultur *in-vitro*) dapat dilakukan melalui beberapa cara seperti: penyimpanan dalam jangka pendek atau disimpan dalam keadaan tumbuh, penyimpanan dengan metode lambat atau penyimpanan dalam metode kriopreservasi. Keuntungan teknik konservasi secara *in-vitro* menurut Khalida *et al* (2019), yaitu dapat mengkonservasi tanaman yang hampir punah serta menyimpan tanaman yang tidak menghasilkan biji, tidak dipengaruhi oleh alam, bebas penyakit serta membutuhkan lahan yang sedikit. Oleh karena itu teknik konservasi plasma nutfah secara *in-vitro* ini dapat menjadi solusi untuk mengkonservasi plasma nutfah dari varietas lokal padi hitam Wojalaka.

Kultur *in-vitro* merupakan teknik mengisolasi bagian-bagian tanaman (protoplas, sel, jaringan dan organ) mengkulturkannya pada media nutrisi dibawah kondisi lingkungan yang steril (Zulkarnain, 2018). Teknologi kultur *in-vitro* ini bermanfaat untuk memperbanyak tanaman dalam jumlah besar dan dalam waktu yang singkat. Setiap bagian pada tanaman, dapat digunakan dalam kultur *in-vitro* karena setiap sel pada tanaman memiliki kemampuan untuk meregenerasi seluruh tanaman (totipotensi). Salah satu metode dalam kultur *in-vitro* yaitu melalui teknik kultur kalus (Baday, 2018).

Kalus adalah massa sel yang awal mulanya sebagai jaringan penutup luka dimana sel pada awalnya dorman kemudian terdiferensiasi kembali (Rusdianto & Indrianto, 2012). Manfaat dari kultur kalus dapat menghasilkan bibit lebih banyak, membutuhkan sedikit lahan serta bibit yang dihasilkan bebas dari penyakit (Fauziyyah *et al.*, 2012). Eksplan yang sering digunakan untuk kultur kalus padi yaitu berasal dari benih padi karena memiliki persentase tinggi dalam menginduksi kalus

(Abiri *et al.*, 2017). Bagian benih yang akan ditumbuhi kalus adalah bagian skutelum padi (Susanto *et al.*, 2020).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan induksi kalus yaitu genotip tanaman, komposisi media yang digunakan, zat pengatur tumbuh (ZPT), sumber eksplan dan keadaan fisiologi sel (Maulidia & Fanata, 2019). Media yang digunakan pada penelitian ini yaitu media dasar Murashige and Skoog (MS). Menurut Baday (2018), media MS merupakan media yang paling banyak digunakan pada kultur *in-vitro*. Media MS mengandung garam-garam dan nitrat yang lebih tinggi dibandingkan dengan media kultur *in-vitro* yang lain (Zulkarnain, 2018). Hasil penelitian Susanto *et al.*, (2020), penggunaan media MS dengan tambahan zat pengatur tumbuh pada induksi kalus padi hitam var. Cempo ireng berhasil menginduksi kalus.

Keberadaan zat pengatur tumbuh (ZPT) pada media perlakuan berpengaruh terhadap kultur *in-vitro*. ZPT dalam golongan auksin berfungsi untuk pembentukan kalus, embriogenesis, serta morfogenesis tunas dan akar (Wattimena, 1992; Purnamaningsih, 2006). Salah satu ZPT yang digunakan dalam induksi kalus dari golongan auksin yaitu 2,4-Diklorophenoxyacetid acid (2,4-D), 2,4-D merupakan senyawa herbisida yang dapat menyebabkan pembelahan sel tidak terkendali pada jaringan pembuluh (Edi, 2015). Keunggulan 2,4-D yaitu memiliki sifat stabil, tidak mudah terdegradasi oleh pemanasan pada proses sterilisasi atau disebabkan enzim-enzim yang dikeluarkan tanaman (Bustami, 2011).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ZPT 2,4-D dari golongan auksin adalah yang paling sesuai untuk menginduksi kalus pada kultur jaringan padi (Libin *et al.*, 2012; Abiri *et al.*, 2017). Beberapa penelitian yang menggunakan ZPT 2,4-D dalam kultur kalus padi seperti: pada konsentrasi 2 mg/L yaitu pada padi Pawana menghasilkan kalus embriogenik (Pawar *et al.*, 2015), pada padi var. Topa (Jubair *et al.*, 2008), padi cv. Khao Dawk Mali 105 (Rattana *et al.*, 2012), padi var. Sita, Rupali, dan Swarna Masuri (Upadhyaya *et al.*, 2015), padi var. Taipei 309, Ciherang, Cisadane dan IR64 (Purnamaningsih, 2006), padi MR219 (Abiri, 2017), padi cv.

Sangyod (Ho *et al.*, 2018)., padi Var. Basmati-370, Pusasugandha-4, Vallabh Basmati-22 dan Taroari (Singh *et al.*, 2018). Konsentrasi 3 mg/L mampu menginduksi kalus terbaik pada padi var. Fatmawati (Lestari & Yunita, 2008). Pemberian 2,4-D pada konsentrasi 4 mg/L mampu menginduksi kalus pada padi var. Ciherang (Azizah *et al.*, 2017)., dan padi hitam var. Cempo Ireng (Susanto *et al.*, 2020). Hasil uji pendahuluan yang telah dilakukan bahwa pemberian konsentrasi 2,4-D sebanyak 2 mg/L mampu menginduksi kalus dengan persentase pembentukan kalus yang rendah oleh karena itu penelitian ini menggunakan konsentrasi 2,4-D yang ditingkatkan.

Asam amino pada kultur *in-vitro* berperan penting dalam pembentukan kultur kalus. Asam amino memiliki sumber nitrogen organik yang berperan penting dalam sintesis protein pada sel-sel tanaman. Ketersediaan sumber nitrogen organik pada media kultur *in-vitro* dapat meningkatkan akumulasi asam amino sebagai penyusun protein. Akumulasi protein di dalam sel mampu meningkatkan pertumbuhan dan pembelahan sel-sel pada kalus (Kosmiatin *et al.*, 2014). Hal tersebut dikarenakan secara alamiahnya sel-sel tumbuhan bersifat autotrof kemudian dikondisikan menjadi heterotrof dengan cara memberikan nutrisi yang cukup kompleks di dalam media kultur (Rusdianto & Indriyanto, 2012). Pemberian sumber nitrogen dalam kultur *in-vitro* biasa diberikan dalam bentuk sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan dalam bentuk kalsium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Nitrogen yang dihasilkan dalam bentuk tersebut perlu diuraikan hingga menjadi ammonium (NH_4^+), kemudian ammonium akan disintesis menjadi senyawa organik agar lebih mudah diserap oleh tanaman (Mukarromah *et al.*, 2013). Pemberian asam amino dalam media kultur dapat diserap lebih cepat karena mengandung nitrogen organik yang dapat digunakan langsung oleh tanaman (Purnamaningsih, 2006). Pemberian asam amino seperti glisin, triptofan, glutamin, kasein hidrolisat dan prolin dalam media kultur jaringan berperan dalam meningkatkan induksi kalus embriogenik padi (Amer *et al.*, 2017).

Pemberian asam amino prolin dalam kultur *in-vitro* berperan dalam proses inisiasi, proliferasi kalus embriogenik dan mempertahankan sifat embriogenik pada

padi (Azizah *et al.*, 2017). Asam amino prolin yang ditambahkan dalam media kultur berfungsi sebagai sumber nitrogen organik (Abiri *et al.*, 2017). Menurut Verslues & Sandeep (2010), prolin berperan sebagai osmoregulator yang mengatur pemasukan dan pengeluaran cairan tubuh dengan lingkungannya. Pemberian prolin eksogen dapat mengakumulasi zat terlarut seluler sebagai penyesuaian tekanan osmotik, Serta prolin dapat berfungsi menjaga sel yang tertekan atau mengalami stress dan menjaga agar pertumbuhan tanaman tetap dibawah tekanan osmotik (Gerdakaneh *et al.*, 2010). Pemberian prolin dengan auksin yang dikombinasikan dapat meningkatkan keberhasilan pembentukan kalus embriogenik pada kultur kalus padi (Purnamaningsih, 2006).

Beberapa penelitian yang menggunakan asam amino prolin dalam kultur kalus padi yaitu: Lestari & Rosa (2008), pemberian prolin 100 mg/L pada padi Fatmawati menghasilkan warna kalus yang bewarna kuning, diameter lebih besar dan tekstur yang remah. Pemberian asam amino prolin pada padi coklat cv. Sangyod dengan konsentrasi 200 mg/L menghasilkan persentase induksi kalus tertinggi dan berat basah kalus tertinggi yaitu sebesar 67,5 mg (Ho *et al.*, 2018). Pemberian prolin 300 mg/L dengan pemberian ZPT mampu mempercepat pembentukan kalus padi Ciherang dan menghasilkan berat basah kalus tertinggi dengan tekstur kalus remah (Kharisma, 2011). Pemberian asam amino dengan konsentrasi 500 mg/L pada padi Chai Nat 1 dan Patum Thani berpengaruh dalam induksi kalus (Rattana *et al.*, 2012). Pada padi Tha Dok Kham 1 memberikan persentase pembentukan kalus tertinggi hingga 96,91% (Thadavong *et al.*, 2002), pada padi tiga var. Japonica dapat menambah berat basah kalus (Wagiran *et al.*, 2008). Pada padi Indrayani dan Pawana memberikan persentase pembentukan kalus yang tinggi dibandingkan tanpa asam amino prolin (Pawar *et al.*, 2015).

Penelitian mengenai induksi kalus padi hitam var. Wojalaka dengan menggunakan ZPT 2,4-D dan asam amino prolin saat ini belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui konsentrasi 2,4-D dan

asam amino yang sesuai dalam menginduksi kalus padi hitam khususnya pada var. *Wojalaka* secara *in-vitro*.

1.2 Rumusan masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap induksi kalus padi hitam *Wojalaka* (*Oryza sativa* L.)?
2. Bagaimana pengaruh konsentrasi asam amino prolin terhadap induksi kalus padi hitam *Wojalaka* (*Oryza sativa* L.)?
3. Berapakah kombinasi terbaik pada perlakuan 2,4-D dan asam amino prolin terhadap induksi kalus padi hitam *Wojalaka* (*Oryza sativa* L.)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan pada penelitian ini yaitu:

1. Untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi 2,4-D terhadap induksi kalus padi hitam *Wojalaka* (*Oryza sativa* L.).
2. Untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi asam amino prolin terhadap induksi kalus padi hitam *Wojalaka* (*Oryza sativa* L.).
3. Untuk mengetahui kombinasi terbaik 2,4-D dan asam amino prolin terhadap induksi kalus padi hitam *Wojalaka* (*Oryza sativa* L.).

1.4 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu:

1. Ada pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap induksi kalus padi hitam var. *Wojalaka* (*Oryza sativa* L.).
2. Ada pengaruh konsentrasi asam amino prolin terhadap induksi kalus padi hitam var. *Wojalaka* (*Oryza sativa* L.).
3. Terdapat kombinasi terbaik konsentrasi 2,4-D dan prolin terhadap induksi kalus padi hitam var. *Wojalaka* (*Oryza sativa* L.).

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu:

a. Bagi peneliti

1. Memberikan informasi konsentrasi ZPT 2,4-D yang paling efektif digunakan untuk menginduksi kalus padi hitam Wojalaka.
2. Memberikan informasi konsentrasi prolin yang paling efektif digunakan untuk induksi kalus padi hitam Wojalaka.
3. Memberikan informasi konsentrasi kombinasi 2,4-D dan prolin yang paling efektif digunakan untuk induksi kalus padi hitam Wojalaka.
4. Memberikan informasi perbedaan morfologi dan anatomi pada perlakuan konsentrasi 2,4-D dan asam amino prolin, dan kombinasinya pada padi hitam Wojalaka.

b. Bagi petani

1. Memberikan informasi tentang solusi perbanyak padi hitam Wojalaka secara *in-vitro*.
2. Memberikan informasi konsentrasi 2,4-D dan asam amino prolin yang tepat untuk menginduksi kalus padi hitam var. Wojalaka.

1.6 Batasan masalah

Batasan masalah pada penelitian kali ini yaitu:

1. Benih padi hitam var. Wojalaka diperoleh dari petani NTT kemudian ditanam di Greenhouse Biologi UIN Malang untuk mendapatkan benih yang vigor.
2. Eksplan yang digunakan yaitu benih padi hitam yang telah dikupas.
3. Media dasar yang digunakan yaitu media MS.
4. Konsentrasi 2,4-D yang digunakan untuk menginduksi kalus yaitu 0 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L.
5. Konsentrasi asam amino prolin yang digunakan yaitu 0 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L.
6. Jumlah eksplan 1 perbotol.

7. Waktu pengamatan 30 hari setelah Hari Setelah Tanam (HST) perlakuan kalus.
8. Parameter yang diamati meliputi hari muncul kalus, persentase pembentukan kalus, berat basah kalus, warna kalus, tekstur kalus, dan anatomi kalus.
9. Pengamatan berat basah kalus ditimbang berdasarkan kalus yang masih hidup sampai hari ke-30.
10. Pengamatan persentase pembentukan kalus yaitu dihitung dari banyaknya kalus yang terbentuk sampai hari ke 30 setelah penanaman.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Padi Hitam (*Oryza sativa* L.) Menurut Islam

Tanaman padi termasuk dalam famili rumput-rumputan (*Poaceae*). Tanaman padi hitam merupakan plasma nutfah yang dimiliki oleh negara Indonesia. Varietas padi hitam termasuk varietas yang langka, hanya sedikit saja daerah yang membudidayakan. Beras hitam awalnya hanya dibudidayakan pada saat tertentu seperti kegiatan upacara adat atau ritual-ritual tertentu. Seiring berjalannya waktu masyarakat mulai sadar akan manfaat dan nilai ekonomi dari tanaman padi hitam (Utama, 2019).

Budidaya tanaman padi hitam sangat jarang dilakukan petani karena memiliki waktu pertumbuhan yang panjang serta produksi padi yang rendah. Penurunan produksi padi hitam dapat disebabkan oleh hama yang menyerang pada tanaman padi hitam. Hal ini menyebabkan petani semakin tidak tertarik untuk menanam padi hitam. Oleh karena itu, untuk menjaga plasma nutfah padi hitam agar tidak hilang atau punah maka terdapat anjuran bercocok tanam dalam islam terdapat pada Hadits Shahih Muslim no. 2902 tentang keutamaan bercocok tanam yang berbunyi:

و حَدَّثَنِي مُحَمَّدُ بْنُ حَاتِمٍ وَابْنُ أَبِي خَلْفٍ قَالَا حَدَّثَنَا رَوْحٌ حَدَّثَنَا ابْنُ جُرَيْجٍ أَخْبَرَنِي أَبُو الزُّبَيْرِ أَنَّهُ سَمِعَ جَابِرَ بْنَ عَبْدِ اللَّهِ يَقُولُ سَمِعْتُ رَسُولَ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ يَقُولُ لَا يَغْرِسُ رَجُلٌ مُسْلِمٌ غَرْسًا وَلَا زَرْعًا فَيَأْكُلُ مِنْهُ سَبْعٌ أَوْ طَائِرٌ أَوْ شَيْءٌ إِلَّا كَانَ لَهُ فِيهِ أَجْرٌ وَقَالَ ابْنُ أَبِي خَلْفٍ طَائِرٌ شَيْءٌ (رواه مسلم)

Artinya: Telah menceritakan kepada kami Muhammad bin Hatim dan Ibnu Abu Khalaf keduanya berkata; telah menceritakan kepada kami Rauh telah menceritakan kepada kami Ibnu Juraij telah mengabarkan kepadaku Abu Zubair bahwa dia mendengar Jabir bin Abdullah dia berkata, "Saya mendengar Rasulullah shallallahu 'alaihi wasallam bersabda: "Tidaklah seorang Muslim yang menanam sebatang pohon atau tanaman, lalu tanaman tersebut dimakan oleh binatang buas, burung atau sesuatu yang lain, kecuali hal itu bernilai sedekah baginya." (HR. Muslim).

Hadist tersebut menjelaskan tentang anjuran bercocok tanam. Menurut Suhendra (2013:422-424), Pada saat zaman Rosulullah, Rosulullah menganjurkan bangsa arab untuk menanam tanaman (*zara'a*), dan menanam pepohonan (*garasa*) untuk menjaga kelestarian lingkungan serta mengingat kondisi geografis semenanjung arab yang sebagian besar wilayahnya gersang. Hadist ini juga menyinggung tentang kehidupan manusia yang melibatkan hubungan antara tumbuhan dan hewan. Nabi Muhammad SAW. mengajarkan bahwa seharusnya umat islam hidup berdampingan harmonis dengan semua makhluk hidup. Oleh karena itu menurut Yūsuf al-Qaradawi dalam jurnal ini bahwasannya bercocok tanam yang dilakukan oleh para petani dan penanam dapat bernilai pahala *sadaqah* dari apa yang diambil dari tanaman mereka karena keinginannya untuk menanam dan segala apa yang ditanam dapat diambil dan bermanfaat bagi semua makhluk hidup.

Tanaman berpengaruh besar bagi kelangsungan hidup manusia, khususnya dalam hal pangan. Manusia membutuhkan makanan untuk memenuhi aktivitas keseharian, makanan tersebut harus memiliki kandungan nutrisi dan vitamin untuk menunjang aktivitas manusia. Padi hitam adalah salah satu makanan yang memiliki kandungan zat gizi, nutrisi dan vitamin untuk kesehatan. Allah menganjurkan pada manusia untuk memakan makanan yang halal dan bergizi. Firman Allah dalam surah Al-maidah (5) ayat 88 yang berbunyi:

وَكُلُوا مِمَّا رَزَقَكُمُ اللَّهُ حَلَالًا طَيِّبًا وَاتَّقُوا اللَّهَ الَّذِي أَنْتُمْ بِهِ مُؤْمِنُونَ (٨٨)

Artinya: “Dan makanlah makanan yang halal lagi baik dari apa yang Allah telah rizekikan kepadamu, dan bertakwalah kepada Allah yang kamu beriman kepadanya” (Qs. Al-Maidah: 5/88).

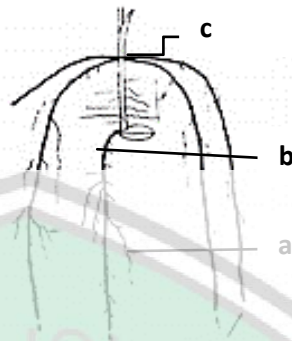
Menurut Shihab (2002), tentang surah al-maidah ayat 88 yaitu “Dan makanlah makanan yang halal”, yakni yang bukan haram lagi “baik”, lezat, bergizi dan berdampak positif bagi kesehatan “dari apa yang Allah telah rizekikan kepadamu, dan bertakwalah kepada Allah” dalam segala aktivitas kamu yang kamu terhadap-Nya adalah “mu’minun”, yakni orang-orang yang mantap keimanannya.

Kata makan dalam ayat ini, adalah segala aktivitas manusia. Pemilihan kata makan, di samping karena makan merupakan kebutuhan pokok manusia, juga karena makanan mendukung aktivitas manusia. Tanpa makan, manusia lemah dan tidak dapat melakukan aktivitas. Oleh karena itu manusia membutuhkan makanan yang halal dan bergizi seperti padi hitam yang memiliki kandungan antioksidan yang tinggi yang dapat berfungsi sebagai penangkal radikal bebas (Adhi, 2017). Menurut Herliana *et al* (2019), beras hitam adalah varietas lokal yang mengandung pigmen antosianin, berbeda dengan nasi putih atau warna beras lainnya. Nasi pada beras hitam memiliki rasa yang enak, aroma spesifik dan penampilan yang unik. Beras hitam dikenal dengan orang lokal dengan nama yang berbeda yaitu beras Wulung di Solo Jawa Tengah, beras Gadog di Cibeusi Jawa Barat, beras Cempo Ireng di Sleman Yogyakarta dan Beras Melik di Bantul Yogyakarta.

2.2 Deskripsi dan Klasifikasi Padi Hitam (*Oryza sativa* L.)

a. Akar

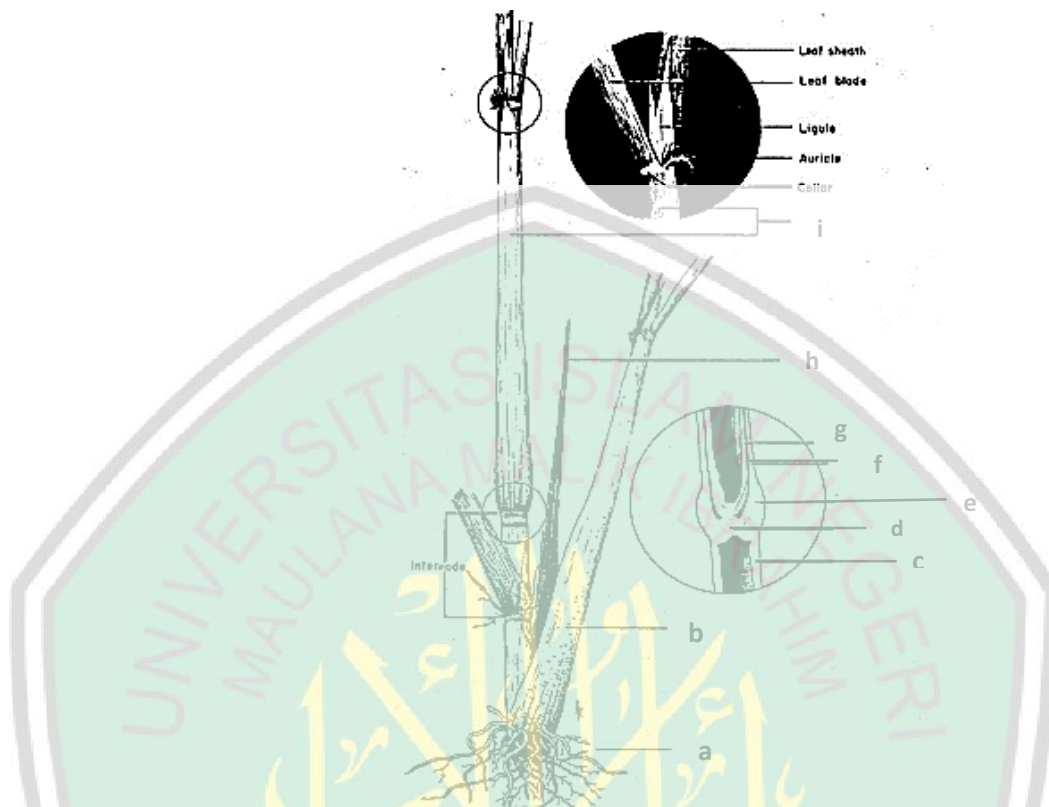
Tanaman padi memiliki akar serabut, yang rapat dan kuat. Akar pada tanaman padi dibedakan menjadi empat yaitu akar radikula, akar serabut, akar rambut dan akar tajuk. Fungsi akar pada tanaman padi yaitu untuk menyerap unsur hara dan air sekaligus untuk menopang tanaman. Fase awal pertumbuhan vegetatif memiliki akar yang berwarna putih dan lama-lama akan berubah kecoklatan sesuai dengan fase pertumbuhannya. Akar yang pertama kali muncul pada benih padi yang berkecambah disebut radikula, umumnya radikula berwarna putih seperti kapas dan muncul setelah hari kedua setelah disemai. Tanaman padi memiliki akar tajuk yang terbentuk pada padi bagian ruas batang paling bawah. Tanaman padi memiliki panjang akar yang bervariasi antara 10-30 cm, dengan jumlah akar antara 120-135 buah (Utama, 2019).



Gambar 2.1 Morfologi akar meliputi: (a) rambut-rambut akar, (b) akar radikula, dan (c) akar mesokotil (Yoshida, 1981).

b. Batang

Tanaman padi memiliki ciri batang licin, tidak berbulu, berbentuk bulat, silindris memanjang, dan bagian tengah yang berongga. Tanaman padi memiliki beberapa ruas pada batangnya. Setiap ruas batang memiliki panjang yang berbeda-beda dan dibatasi oleh buku, ruas pada bagian atas lebih panjang dari pada ruas dibagian bawah. Buku pada bagian pangkal lebih rapat dibandingkan bagian tengah dan ujung. Pada setiap buku terdapat pelepah daun yang membalut ruas sampai buku di atasnya. Lidah daun menempel pada pelepah daun. Batang tanaman padi hitam lokal lebih besar 2-3 kali batang padi putih dan lebih panjang. Batang tanaman padi memiliki fungsi menopang pertumbuhan tanaman dari malai hingga gabah (Utama, 2019).



Gambar 2.2 Batang dan ruas tanaman padi: (a) akar adventif, (b) anakan, (c) ruas, (d) nodal septum, (e) sheath pulvinus, (f) seludang daun, (g) ruas, (h) prophyllum, (i) seludang daun (Bardenas, 1965).

c. Daun

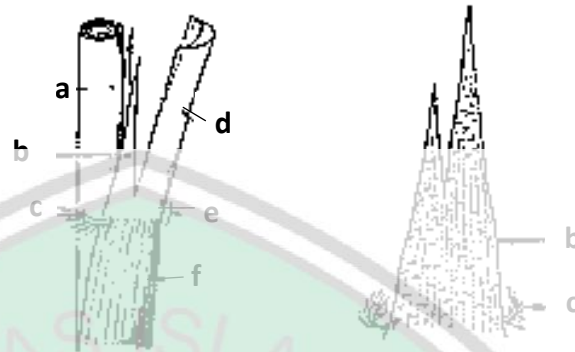
Tanaman padi memiliki daun berwarna hijau tua. Bagian daun padi terdiri dari helai daun, pelepah daun dan lidah daun. Bentuk daun tanaman padi memanjang seperti pita. Pada perkecambahan benih, daun yang pertama kali muncul dinamakan koleoptil kemudian akan muncul daun-daun selanjutnya sampai terbentuk daun bendera. Daun terakhir yang terbentuk pada masa vegetatif adalah daun bendera. Daun ini terletak di bawah malai, dengan posisi daun yang tegak dan lebih besar dari daun sebelumnya. Daun bendera ini memiliki fungsi melindungi malai dari serangan hama burung (Utama, 2019). Daun bendera adalah organ fotosintesis yang berperan

penting dalam pengisian biji-bijian. Asimilasi CO₂ yang tinggi dalam daun bendera tanaman padi dapat meningkatkan biomassa spikelet (Budiman *et al.*, 2012)



Gambar 2.3 Morfologi padi: (a) daun kedua, (b) daun primer, (c) koleoptil, (d) mesokotil, (e) radikula, (f) akar sekunder (Yoshinoda, 1981).

Lidah daun pada tanaman padi terletak pada perbatasan antara daun dan pelepah daun. Lidah daun memiliki ciri bewarna putih bening dan tipis. Setiap helai daun memiliki satu lidah daun pada setiap daun tanamannya. Lidah daun berfungsi untuk mencegah masuknya air hujan ke dalam pelepah daun serta menghindari terinfeksi tanaman dari penyakit yang masuk bersama air (Utama, 2019).



Gambar 2.4 Letak helai daun dan lidah daun pada batang padi: (a) seludang daun, (b) lidah daun, (c) telinga daun, (d) bilah daun, (e) leher daun, (f) seludang daun (Yoshinoda, 1981).

d. Anakan

Anakan padi muncul setelah terbentuknya daun kelima. Anakan padi terletak pada buku batang sebagai tunas aksilar dengan menggantikan tempat daun selanjutnya tumbuh dan berkembang. Pembentukan anakan padi membutuhkan waktu sekitar 1 bulan (Utama, 2019).

e. Bunga

Bunga padi terletak pada bagian percabangan malai. Malai adalah sekumpulan bunga padi atau spikelet yang muncul pada bagian atas daun bendera, panjang malai diukur dari buku terakhir sampai ujung malai. Bunga padi termasuk kelompok bunga telanjang karena memiliki perhiasan bunga dengan dua kelamin. Bunga tanaman padi memiliki enam benang sari dengan tangkai sari yang pendek dan tipis, selain itu juga memiliki kepala sari yang besar dan terdapat dua kantung serbuk sari. Bunga padi terdiri dari kepala sari, tangkai sari, palea, lemma, kepala putik, dan tangkai putik (Utama, 2019).

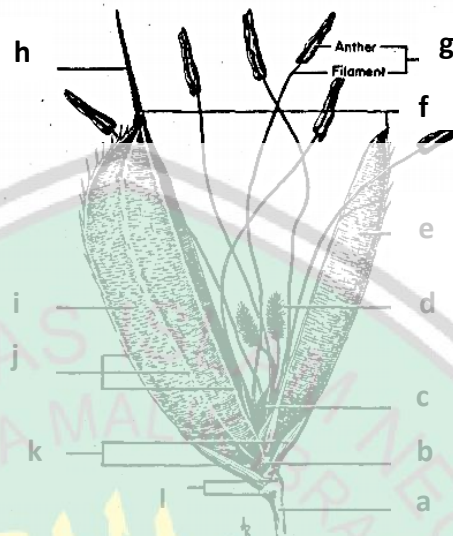


Fig. 5. Parts of a spikelet.

Gambar 2.5 Morfologi spikelet padi: (a) pedicel (tangkai gabah), (b) rakhilla, (c) ovary, (d) kepala putik, (e) palea, (f) apikula, (g) benang sari, (h) ekor gabah, (i) lemma, (j) urat sekam, (k) lemma steril, (l) rudimentary glumes (Bardenas, 1965).

f. Gabah

Padi berasal dari bunga yang telah masak ditangkai malai, sedangkan kulit dari butir-butir padi yang belum dikupas yaitu gabah. Gabah adalah buah tanaman padi yang tertutup oleh bagian lemma dan palea. Warna gabah padi hitam bewarna kuning kehitaman. Gabah pada tanaman padi tersebut kasar dan berbulu dengan ukuran panjang 7-10 mm dan lebar 3-5 mm (Utama, 2019).



Gambar 2.6 Butiran padi: (1) caryopsis (beras), (2) palea, (3) lemma, (4) rachilla, (5) lemma steril, (6) rudimentary glumes (Yoshinoda, 1981).

Klasifikasi padi dalam jurnal Sabila *et al* (2016), yaitu: Kingdom: Plantae, Divisi: Spermatophyta, Divisi: Magnoliophyta, Kelas: Monocotyledoneae, Ordo: Poales, Famili: Poaceae, Genus: *Oryza*, Spesies: *Oryza sativa* L.

2.3 Kandungan dan Manfaat Padi Hitam (*Oryza sativa* L.)

Padi hitam memiliki kandungan zat gizi makro terdiri dari karbohidrat 83,8%, protein 8,2%, lemak 2,2%, serat 1,4-7,5%, hemiselulosa 5,8%, air 11,4%, dan abu 0,9%. Sedangkan kandungan zat gizi mikronya terdiri dari vitamin C 0,9 mg, vitamin E 25,7 mg, dan kandungan mineralnya yaitu Mg 3,11 mg, Ca 0,257 mg, Fe 0,335 mg, K 0,821 mg, dan Zn 0,042 mg. Padi hitam memiliki kandungan antosianin yang terletak pada perikarp, aleuron dan endosperm dengan warna merah-biru-ungu pekat (Utama,2019). Antosianin yang dihasilkan dari beras hitam memiliki manfaat dalam mencegah penyakit kronis dan degeneratif karena aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, anti-kanker, hipoglikemik (Thanuja & Parimavalli, 2019).

Kandungan antioksidan dalam beras hitam dikelompokkan menjadi enam yaitu asam fenolik, flavonoids, antosianin dan proantosianidin, tokoferol dan tokotrienol, γ -orizanol, asam fitik (Utama, 2019). Beras hitam mengandung lebih

banyak protein dan serat dibandingkan dengan beras merah (Thanuja & Parimavalli, 2019). Beras hitam mengandung lebih sedikit protein dan kandungan zat besi yang lebih tinggi dari beras putih. Nutrisi zat besi dalam beras dapat mengatasi anemia karena zat besi sangat dibutuhkan oleh tubuh dalam pembentukan sel darah merah (Herliana *et al.*, 2019). Manfaat lainnya yaitu dapat membantu mencegah penyakit jantung, mengurangi stress oksidatif dan mencegah diabetes. Beras hitam dalam obat tradisional India digunakan untuk suplemen makanan, dan perawatan berbagai penyakit seperti kelainan lipid dan penyakit gastrointestinal (Prasad *et al.*, 2019).

2.4 Budidaya Padi Hitam (*Oryza sativa* L.)

Padi hitam di Indonesia terbagi menjadi dua subspecies yaitu subspecies Indica (butiran padi tidak lengket dan panjang) dan subspecies japonica (butiran padi yang lengket dan pendek) (Kristantini *et al.*, 2014). Keberhasilan budidaya dapat dipengaruhi oleh faktor internal dan eksternal. Faktor internal meliputi kesehatan, kemurnian, daya kecambah, vigor benih, umur bibit, potensi produksi, dan daya adaptasi. Faktor eksternal yang dapat mempengaruhi adalah ketersediaan unsur hara, air, suhu, penyinaran, hama dan penyakit, pengolahan lahan, pembibitan dan metode budidaya. Perkembangan tanaman padi terdiri dari tiga fase: fase pertumbuhan vegetatif pada umur 0-60 hari, selanjutnya fase pertumbuhan generatif pada umur 61-90 hari dan fase pematangan pada umur 91-120 hari (Utama, 2019). Tanaman padi hitam yaitu memiliki waktu panen yang lama sekitar 120-140 hari dengan produksi 3 ton per hektar dibandingkan dengan padi biasa yang hanya membutuhkan waktu panen sekitar 90 hari untuk menghasilkan 6-7 ton perhektar (Pratiwi & yekti, 2017).

2.5 Padi Hitam Var. Wojalaka (*Oryza sativa* L.)

Padi hitam var. Wojalaka berasal dari Manggarai, Nusa Tenggara Timur (NTT). Padi tersebut mampu memproduksi 4-5 ton/Ha dengan lama pertumbuhan sekitar 125-130 hari. Warna benih padi hitam pada Wojalaka berasal dari lapisan aleuron yang mengandung banyak kandungan antosianin (Adhi, 2017). Morfologi padi hitam var. Wojalaka memiliki tinggi sekitar 109-112 cm lebih pendek dibandingkan

var. Cempo ireng, Manggarai dan Toraja. Morfologi tanaman yang lebih tinggi lebih mudah rebah dan lebih mudah terlihat oleh burung. Padi hitam var. Wojalaka memiliki diameter batang sekitar 6,8-7,2 mm. Panjang akar padi hitam Wojalaka lebih pendek dibandingkan dengan var. Toraja, Cempo ireng, Manggarai, Bau-Bau dan Aek Sibudong. Padi hitam Wojalaka dikelompokkan ke dalam subspecies padi *Indica* (Shinta *et al.*, 2014). Anakan produktif padi hitam Wojalaka yaitu 25-36 anakan, Malai muncul pada hari ke 70 hingga 80 hari setelah tanam. Produksi padi hitam Wojalaka yang dibudidayakan di Kepanjen Kabupaten Malang menghasilkan 1 ton/ha-1 lebih rendah dibandingkan dari produksi normal didaerah asal (Manggarai-NTT) yaitu 3-4 ton/ha-1 (Budiman *et al.*, 2012). Rendahnya hasil produksi padi hitam Wojalaka dapat disebabkan oleh beberapa faktor salah satunya yaitu serangan hama. Hama yang menyerang meliputi hama walang sangit, burung dan hama penggerek batang. Hama padi biasanya menyerang saat tanaman mulai berbunga (Adhi, 2017).

2.6 Kultur *In-vitro*

2.6.1 Definisi Kultur *In-vitro*

Kultur *in-vitro* merupakan teknik mengisolasi bagian-bagian tanaman (protoplas, sel, jaringan dan organ) mengkulturkannya pada media nutrisi dibawah kondisi lingkungan yang steril dan terkendali sehingga bagian-bagian dari tanaman dapat beregenerasi dan tumbuh menjadi tanaman yang utuh kembali (Zulkarnain, 2018). Teknologi kultur *in-vitro* memberikan cara terbaik untuk memperbanyak tanaman dengan kualitas tinggi dan bebas dari penyakit serta dapat memperbanyak dalam waktu singkat dibandingkan dengan metode tradisional. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan teknik kultur *in-vitro* diantaranya yaitu media, suhu, cahaya, eksplan, desinfektan, genetik, tanaman yang digunakan (Baday, 2018).

Kultur *in-vitro* juga dipengaruhi oleh sterilitas alat dan media yang digunakan. Kontaminasi alat sering terjadi dikarenakan teknik sterilisasi yang dilakukan tidak benar. Media kultur *in-vitro* disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat seperti botol, alat diseksi di sterililkan dengan

menggunakan oven (Singh, 2018). Keunggulan dari metode kultur *in-vitro* dibandingkan dengan metode tradisional yaitu: pertumbuhan kembali seluruh tanaman dari sel-sel tanaman yang diubah secara genetik. Selain itu dapat memproduksi tanaman berasal dari biji yang memiliki viabilitas lebih rendah seperti nepenthes dan anggrek, produksi lain dari tanaman haploid, produksi hibrida untuk spesies yang tidak kompatibel. Keuntungan yang lain dari penelitian kultur *in-vitro* yaitu menghasilkan respon yang cepat pada tanaman, memberikan periode pertumbuhan yang lebih pendek dan lingkungan yang terkontrol dibandingkan dengan studi dilapangan (Alhasnawi *et al.*, 2014).

2.6.2 Eksplan

Eksplan merupakan bagian potongan kecil metode kultur *in-vitro* yang berasal dari bagian manapun pada tanaman. Eksplan yang digunakan ditanam pada media nutrisi yang sesuai dan ditumbuhkan pada kondisi yang aseptik (Alhasnawi *et al.*, 2014). Asal eksplan yang digunakan harus diperhatikan dari genotip, umur, dan kondisi fisiologis eksplan tersebut (Pierik, 1997). Eksplan yang ditumbuhkan dalam kultur *in-vitro* harus bebas dari kontaminan mikroba. Sebagian besar mikroba terutama pada jamur dan bakteri dapat menghalangi pertumbuhan tanaman secara *in-vitro*. Upaya yang harus dilakukan untuk menghilangkan kontaminan yaitu dengan penggunaan desinfektan atau bahan kimia pada eksplan, mensterilkan alat yang digunakan dalam perbanyakan tanaman melalui kultur *in-vitro* (Alhasnawi *et al.*, 2014).

Metode sterilisasi eksplan dalam kultur *in-vitro* merupakan bagian terpenting sebelum di tanam pada medium kultur. Bahan-bahan yang biasa digunakan dalam kultur *in-vitro* adalah larutan hipoklorit. Larutan hipoklorit ini terbukti efektif pada berbagai tanaman, tingkat konsentrasi dan lamanya perendaman perlu diperhatikan untuk mengurangi resiko kematian jaringan pada eksplan (Bhojwani & Razdan, 1983).

Kontaminasi pada kultur *in-vitro* yang dapat disebabkan oleh beberapa hal diantaranya: medium yang digunakan mengalami proses sterilisasi yang kurang

sempurna, kurang sterilnya eksplan yang digunakan, kontaminan dapat berasal dari luar atau dalam jaringan eksplan, lingkungan kerja dan penanaman yang kurang teliti dan kurang hati-hati serta adanya hewan kecil yang dapat masuk ke dalam botol media kultur (Zulkarnain, 2018). Hasil penelitian Abiri *et al* (2017), bahwa macam-macam eksplan yang digunakan dalam menginduksi kalus padi MR219 pada eksplan benih dan akar berhasil menginduksi kalus embriogenik dengan frekuensi tertinggi. Menurut Admojo (2014), Eksplan yang berasal dari jaringan meristematik dapat memberikan keberhasilan dalam pembentukan kalus embrio somatik yang lebih tinggi.

2.6.3 Media

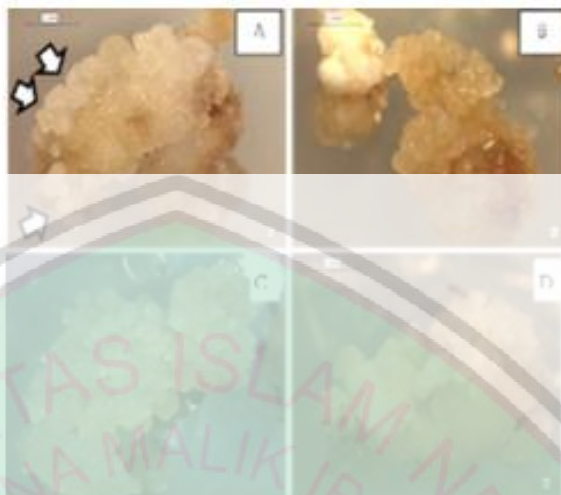
Media yang digunakan dalam metode kultur *in-vitro* memiliki komposisi konsentrasi garam mineral dan bahan organik yang cocok untuk pertumbuhan sel dan jaringan tanaman (Baday, 2018). Media Murashige and Skoog (MS) merupakan media yang paling banyak digunakan dalam kultur *in-vitro* (Fauzi, 2016). Media MS memiliki kandungan nitrat, kalium dan amonium yang tinggi (Wetter & Constabel, 1991). Media MS juga mengandung unsur hara makro dan unsur mikro seperti myoinositol, niacin, pyridoxin HCl, thiamin HCl, glycine dan glukosa (Gunawan, 1987; Inkiriwang, 2016). Komposisi media MS dapat dilihat pada Lampiran 5.

Beberapa penelitian menggunakan media MS dalam kultur kalus padi yaitu pada padi hitam var. Cempo ireng (Susanto *et al.*, 2020)., padi *Malaysian Rice* MR219, MR220, MR221 (Htwe *et al.*, 2011)., padi KDML 105, Chai Nat 1, Supanburi 1, Patum Thani (Rattana *et al.*, 2012)., padi Ambemohar, Indrayani, Jaya, Pawana (Pawar *et al.*, 2015)., padi cv. Sangyod (Ho *et al.*, 2017)., padi MR220-CL2, MR232, Bario (Mostafiz & Alina., 2018)., Padi Taipei 309, Ciherang, Cisadane, IR64 (Purnamaningsih, 2006)., padi Basmati-370, PusaSugandha-4, Vallabh Basmati-22, Taroari (Singh *et al.*, 2018)., padi var. Sita, Rupali, Swarna (Upadhyaya *et al.*, 2015)., padi var. Ciherang (Azizah *et al.*, 2017)., padi MRQ74, MR269 (Radziah *et al.*, 2016)., padi cv. Panderas (Din *et al.*, 2016).

2.7 Kultur Kalus

Kalus terdiri dari kumpulan sel-sel jaringan yang membelah terus menerus dan belum terorganisasi (*amorphous*). Kalus terbentuk pada luka irisan eksplan karena sebagian sel permukaan mengalami proliferasi. Manfaat dari kultur kalus yaitu menghasilkan banyak bibit yang bebas dari penyakit, serta produksi yang dihasilkan dalam menghasilkan bibit lebih banyak, sedikit lahan, lingkungan yang terkendali, dan hasil metabolit sekunder yang lebih tinggi dari tanaman aslinya (Fauziyyah *et al*, 2012). Pertumbuhan kalus dalam suatu spesies tanaman dapat tergantung pada beberapa hal seperti jenis tanaman awal yang digunakan seperti tua atau muda, penempatan awal eksplan, tanaman yang digunakan, umur tanaman, fisiologi tanaman dan kondisi pertumbuhan. Setelah kalus terbentuk dari eksplan yang di kulturkan. Selanjutnya kalus dipindahkan pada media baru, proses ini dinamakan subkultur (Bhatia *et al.*, 2015).

Proses induksi pada kalus diawali dengan menebalnya eksplan pada bagian yang mengalami perlukaan. Penebalan pada area perlukaan dapat disebabkan adanya interaksi pada media tanam dengan lingkungannya yang berisi zat pengatur tumbuh sehingga dihasilkan eksplan yang membesar (Yelnitis, 2012). Deferensiasi pada kalus dapat disebabkan karena sel-sel pada jaringan tanaman awal mulanya bersifat autotrof, kemudian ditempatkan dalam keadaan heterotrof dengan memberikan nutrisi pada medium kultur *in-vitro*. Sehingga sel-sel pada daerah perlukaan membelah secara tidak terkendali membentuk massa sel yang tidak terbatas (Tanjung *et al*, 2017).



Gambar 2.7 Kondisi kalus: (A dan C kalus embriogenik) dan (B dan D kalus non embriogenik) dari biji padi var. Ciherang selama 21 hari (Azizah *et al.*, 2017).

Manuhara (2001) dalam Satria *et al.*, (2019) menjelaskan bahwa salah satu tekstur kalus yaitu remah, kalus remah berasal dari kalus yang tersusun atas sel-sel yang panjang berbentuk tubular dimana struktur selnya renggang mudah rapuh dan tidak teratur. kalus yang bertekstur kompak memiliki ciri struktur sel yang rapat, pada dan sulit dipisahkan karena vakuolanya yang besar dan sel-selnya memiliki dinding polisakarida yang besar. Menurut Royani *et al.*, (2015), kalus yang bertekstur kompak dapat disebabkan berbedanya kemampuan jaringan dalam menyerap zat pengatur tumbuh dan unsur hara yang terdapat dalam media. Terdapat dua jenis kalus yang berasal dari skutelum benih padi yaitu kalus embriogenik dan kalus non embrogenik. Kalus embriogenik memiliki ciri kalusnya yang relatif kering, bewarna putih susu, dan nodular. Sebaliknya kalus non embriogenik biasanya berair dan biasanya bewarna putih atau coklat. Kalus embriogenik mampu tumbuh hingga empat kali lipat setelah 3 minggu subkultur. Kalus non embriogenik akan berubah warna coklat kemudian mati seiring berjalannya waktu (Susanto *et al.*, 2020).

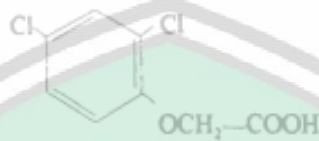
Menurut Royani *et al.*, (2015), beberapa warna yang dihasilkan dari kultur kalus embriogenik yaitu warna putih, warna kekuningan dan warna coklat. Sel-sel kalus yang masih muda dan aktif membelah ditandai dengan warna putih. Warna

kekuningan menunjukkan pembelahan sel yang masih aktif pada sel-sel dewasa. Gejala penuaan sel pada kalus ditandai dengan warna coklat pada kalus. Menurut Andaryani (2010) dalam Satria *et al* (2019), warna kalus yang semakin hijau memiliki kandungan klorofil dalam jaringan tanaman. warna yang terang menunjukkan bahwa kondisi kalus yang cukup baik. Pengamatan anatomi kalus embriogenik menurut Waryastuti *et al.*, (2017), sel pada kalus embriogenik memiliki bentuk yang bulat dengan sitoplasma yang bewarna lebih gelap dibandingkan dengan sel kalus non embriogenik, memiliki vakuola yang sedikit, inti yang besar, ukuran sel yang kecil dan dinding sel yang tipis.

2.8 Zat Pengatur Tumbuh

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) merupakan senyawa sintetis yang bertindak sebagai hormon alami tumbuhan. Interaksi auksin, sitokinin dan antara auksin-sitokinin sering digunakan dalam mengatur pertumbuhan dalam kultur jaringan *in-vitro* (Gaspar *et al.*, 1996). Auksin merupakan senyawa yang berfungsi merangsang pembelahan sel, pemanjangan sel, dan pembentukan tunas adventif. Konsentrasi auksin yang tinggi dapat menghambat morfogenesis dan merangsang pembentukan kalus (Zulkarnain, 2018). Jenis-jenis auksin yang paling umum digunakan dalam kultur jaringan *In-vitro* yaitu NAA (*Naphthalenacetic acid*), IAA (*indole-3-acetic acid*), 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid), IBA (*indole-3-butyric acid*) dan 4-CPA (*p-chlorophenoxyacetic acid*) (Zulkarnain, 2018). Induksi kalus embriogenik dari golongan auksin biasanya digunakan auksin sintetis tertentu seperti 2,4-D. Penggunaan 2,4-D saja lebih baik untuk induksi kalus padi daripada kombinasi dengan auksin dan sitokinin lainnya (Pawar *et al.*, 2015). 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) merupakan senyawa kimia yang biasanya digunakan sebagai herbisida. Mekanisme kerja dari ZPT 2,4-D yaitu dapat menyebabkan pembelahan sel yang tidak terkendali di dalam jaringan pembuluh. Pemberian senyawa 2,4-D akan menyebabkan perkembangan dinding sel yang tidak normal (Edi, 2015). Penggunaan hormon 2,4-D dapat memacu

pembentukan dan pertumbuhan kalus. Konsentrasi yang umum digunakan untuk eksplan tanaman monokotil berkisar antara 2-5 ppm (Waryastuti *et al.*, 2017).



2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)

Gambar 2.8 Struktur molekul 2,4-D (Gaspar *et al.*, 1996).

2.8.1 Pengaruh Pemberian ZPT 2,4-D pada Media Kultur Kalus Padi

Beberapa penelitian tentang penggunaan 2,4-D dalam kultur kalus embriogenik padi terbukti pada kultur kalus padi seperti: pada konsentrasi 2 mg/L yaitu pada padi Pawana menghasilkan kalus embriogenik (Pawar *et al.*, 2015), dapat membentuk 100% kalus embriogenik pada padi var. Topa (Jubair *et al.*, 2008), padi cv. Khao Dawk Mali 105 (Rattana *et al.*, 2012), padi var. Sita, Rupali, dan Swarna Masuri (Upadhyaya *et al.*, 2015), terbukti efektif menginduksi kalus embriogenik var. Biris (Libin *et al.* (2012); Mondal *et al.* (2011); Sahoo *et al.* (2011)), padi var. Taipei 309, Ciherang, Cisadane dan IR64 (Purnamaningsih, 2006), padi MR219 mampu menginduksi kalus sebesar 80% (Abiri., 2017), padi cv. Sangyod (Ho *et al.*, 2018), meningkatkan frekuensi kalus padi Basmati var. B-370 sebanyak 84,34%; var. PS-4 sebanyak 88,08%; var. VB-22 79,99%; var. Taroari 74,55% (Singh *et al.*, 2018). Konsentrasi 3 mg/L mampu menginduksi kalus terbaik pada padi var. Fatmawati (Lestari & Yunita, 2008). Pemberian 2,4-D pada konsentrasi 4 mg/L mampu menginduksi kalus pada padi var. Ciherang dapat membentuk 53,63% kalus embriogenik (Azizah *et al.*, 2017), dan padi hitam var. Cempo Ireng (Susanto *et al.*, 2020).

2.9 Asam Amino

Asam amino adalah unit dasar protein. Asam amino mengandung gugus amino dan gugus karboksilat. Asam amino berfungsi dalam mengatur berbagai proses yang terkait dengan ekspresi gen. Asam amino biasanya digunakan dalam pembentukan protein. Jika asam amino kurang maka sintesis protein tidak dapat dilakukan. Terdapat dua macam asam amino yaitu asam amino esensial yang tidak bisa diperoleh dari dalam tubuh dan diperoleh dari makanan. Asam amino non esensial yaitu asam amino yang disintesis dari dalam tubuh. Beberapa asam amino yang disintesis dalam tubuh tetapi produksinya tidak mencukupi disebut asam amino semi-esensial (Akram *et al.*, 2011).

Pemberian asam amino dalam media menambah pasokan nitrogen yang dapat merangsang pertumbuhan sel dalam kultur protoplas dan juga dalam menginduksi atau mempertahankan embriogenesis somatik. Nitrogen organik lebih mudah terserap tanaman dibandingkan dengan nitrogen anorganik (Bhatia *et al.*, 2015). Tumbuhan mensintesis asam amino dari karbon dan oksigen yang diperoleh dari udara dan hidrogen dari air di dalam tanah. Asam amino berperan penting untuk meningkatkan hasil dan kualitas tanaman secara keseluruhan. Asam amino diserap melalui stoma pada tanaman. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa asam amino dapat mempengaruhi aktivitas fisiologis pada tanaman (Akram *et al.*, 2011). Tanaman mengakumulasi sejumlah besar zat terlarut kompatibel. Larutan yang kompatibel adalah senyawa organik dengan berat molekul rendah, sangat larut dan tidak beracun pada konsentrasi seluler yang tinggi. Zat terlarut ini memberikan perlindungan pada tanaman dari stres dengan berkontribusi pada penyesuaian osmotik seluler (Hayat *et al.*, 2012). Beberapa biokimiawi seperti asam amino, glutamin, prolin, triptofan dan poliamina (putresin) dapat memberikan efek pada embriogenesis somatik pada beberapa spesies. Potensi senyawa ini berperan dalam proses seluler seperti molekul prekursor untuk regulator pertumbuhan tertentu. Peran yang lainnya untuk peningkatan proses pensinyalan sel pada berbagai jalur transduksi sinyal dan berperan dalam regulasi sintesis DNA (Bhatia *et al.*, 2015).

Salah satu asam amino yang digunakan dalam teknik kultur jaringan *in-vitro* untuk merangsang proses embriogenesis somatik yaitu prolin. Prolin dapat berfungsi sebagai sumber nitrogen yang penting dalam metabolisme tanaman dan prolin dilaporkan memainkan peran penting dalam melindungi enzim terhadap denaturasi (Enany, 1995). Atom nitrogen prolin terikat secara kovalen di dalam cincin beranggota lima molekul (Morgan & Edward, 2013). Prolin merupakan asam amino yang larut di dalam air dan berfungsi sebagai perlindungan tanaman yang menghadapi tekanan kekeringan. Prolin dapat diubah sebagai molekul persinyalan untuk memodifikasi fungsi fisiologis tanaman dalam hal penyesuaian osmotik dan meningkatkan penyerapan ion fotosintesis (Qamar *et al.*, 2019). Pemberian prolin eksogen dapat mengakumulasi zat terlarut seluler sebagai penyesuaian tekanan osmotik. Prolin juga berperan sebagai osmoregulator yang mengatur pemasukan dan pengeluaran cairan tubuh dengan lingkungannya (Verslues & Sandeep, 2010).



Gambar 2.9 Struktur molekul asam amino prolin (Morgan & Edward, 2013).

2.9.1 Pengaruh Pemberian Asam Amino Prolin pada Media Kultur Kalus Padi

Hasil penelitian tentang pemberian asam amino prolin yaitu terdapat pada beberapa penelitian. Menurut Lestari & Rosa (2008), pemberian prolin 100 mg/L dengan 2,4-D konsentrasi 3 mg/L pada induksi kalus padi menghasilkan warna kalus yang kuning, diameter yang lebih besar dan tekstur yang remah. Penelitian Rattana *et al.*, (2012), Pemberian 500 mg/L L-prolin dapat meningkatkan induksi kalus padi Chai Nat 1 dan Patum Thani 1 dengan ukuran rata-rata kalus untuk Chai Nat 1 yaitu 1,12 cm dengan berat segar rata-rata 0,31 g dan Patum Thani 1 dengan ukuran rata-rata kalus 1,12 cm dengan berat segar rata-rata 0,35 g. Pemberian asam amino prolin

pada padi coklat cv. Sangyod dengan konsentrasi 200 mg/L menghasilkan persentase induksi kalus tertinggi dan berat basah kalus tertinggi yaitu sebesar 67,5 mg (Ho *et al.*, 2018). Pemberian prolin 300 mg/L dengan pemberian ZPT mampu mempercepat pembentukan kalus padi Ciherang dan menghasilkan berat basah kalus tertinggi dengan tekstur kalus yang remah (Kharisma, 2011). Thadavong *et al.*, (2002), bahwa benih padi cv. Tha Dok Kham 1 (TDK1) dikultur pada media MS yang ditambah dengan prolin 500 mg/L dan hormon 2,4-D 2 mg/L meningkatkan persentase pembentukan kalus embriogenik sebanyak 96,91% dengan rata-rata ukuran kalus 6,02 mm. Pemberian asam amino prolin 600 mg/L pada induksi kalus padi var. Ciherang dengan tambahan ZPT menghasilkan kalus embriogenik (Azizah *et al.*, 2017). Menurut Susanto *et al.*, (2020), Pemberian asam amino prolin 2,88 g/L memberikan kalus yang remah pada padi hitam var. Cempo ireng. Menurut Pawar *et al.* (2015), Pemberian asam amino prolin dalam kultur kalus padi memberikan peningkatan pertumbuhan berat basah kalus secara signifikan.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 2 faktor perlakuan. Faktor pertama meliputi perbedaan konsentrasi 2,4-D (*2,4-Diklorofenoksiasetat*) yaitu 0 mg/L; 2 mg/L; 4 mg/L; 8 mg/L. Faktor kedua meliputi perbedaan konsentrasi prolin yaitu 0 mg/L; 100 mg/L; 200 mg/L; 300 mg/L. Penelitian ini terdiri dari 16 perlakuan, masing-masing diberi pengulangan 8. Rancangan penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Rancangan kombinasi ZPT 2,4-D dan asam amino prolin

Konsentrasi ZPT 2,4-D	Konsentrasi asam amino prolin			
	0 mg/L (P0)	100 mg/L (P1)	200 mg/L (P2)	300 mg/L (P3)
0 mg/L (D0)	D0P0 0,0	D0P1 0,100	D0P2 0,200	D0P3 0,300
2 mg/L (D1)	D1P0 2,0	D1P1 2,100	D1P2 2,200	D1P3 2,300
4 mg/L (D2)	D2P0 4,0	D2P1 4,100	D2P2 4,200	D2P3 4,300
8 mg/L (D3)	D3P0 8,0	D3P1 8,100	D3P2 8,200	D3P3 8,300

Keterangan: D= pemberian konsentrasi 2,4-D, P=pemberian konsentrasi prolin.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan Oktober 2020. Benih padi hitam var. *Wojalaka* diperoleh dari balai di Nusa Tenggara Timur yang ditumbuhkan di Greenhouse. Proses induksi kalus hingga pengamatan morfologi ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, pengamatan anatomi dilaksanakan di Laboratorium Optik, Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan variabel :

1. Variabel bebas: meliputi kombinasi pemberian konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D 2 mg/L; 4 mg/L; 8 mg/L dan pemberian konsentrasi asam amino prolin 100 mg/L; 200 mg/L; 300 mg/L.
2. Variabel terikat: meliputi hari muncul kalus, persentase pembentukan kalus, berat basah kalus, morfologi kalus yaitu, warna kalus, tekstur kalus dan anatomi kalus padi hitam var. Wojalaka.
3. Variabel terkontrol: meliputi suhu, cahaya, media MS, pH, kelembapan.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: *Laminar air flow* (LAF), autoklaf, oven, timbangan analitik, botol infus, cawan petri, alat-alat diseksi (pinset, scapel), rak kultur, hot plate dan stirrer, gelas beker, elenmeyer, mikropipet, tip, handsprayer, bunsen, korek api, mikroskop, objek glass, cover glass.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: eksplan padi hitam var. wojalaka, media Murashige and Skoog (MS), ZPT 2,4-D, asam amino prolin, aquades, agar dolphin, sukrosa, aluminium foil, plastik, karet, kapas, alkohol 70%, alkohol 95%, bayclin, aquades steril, kertas lakmus, tisu.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan kultur jaringan *in-vitro* seperti botol kultur, alat-alat diseksi dan cawan petri dicuci bersih. Setelah itu disterilisasi menggunakan oven dengan suhu $121^{\circ}\text{C} \pm$ selama 2 jam. Setelah di oven, alat-alat dipindahkan ke tempat yang steril. Sterilisasi kedua yaitu menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama \pm 15 menit. Alat-alat yang akan disterilisasi seperti alat-alat diseksi (scapel, pinset panjang dan pendek, spatula) dibungkus dengan aluminium foil

dan dibungkus dengan plastik. Cawan petri dibungkus dengan kertas dan dimasukkan dalam plastik dan diikat dengan karet. Kemudian alat-alat diseksi dan cawan petri tersebut dimasukkan dalam keranjang autoklaf dan disterilkan.

3.5.2 Sterilisasi Ruang Tanam

Ruangan disterilkan dengan menyemprotkan alkohol 70% di sekitar dan di dalam LAF. Lampu UV dinyalakan selama 30-60 menit di dalam LAF agar dapat membunuh mikroba di dalamnya.

3.5.3 Pembuatan Larutan ZPT 2,4-D

Pembuatan larutan stok hormon 2,4-D sebanyak 100 ppm yaitu dengan menimbang 10 mg hormon 2,4-D. kemudian dilakukan pengenceran menggunakan aquades sebanyak 100 ml. Larutan 2,4-D dihomogenkan hingga tercampur rata. Perhitungan pengambilan larutan stok yang digunakan terdapat pada Lampiran 4.

3.5.4 Pembuatan Larutan Stok Prolin

Pembuatan larutan stok prolin sebanyak 2500 ppm yaitu ditimbang sebanyak 250 mg. Kemudian dilakukan pengenceran sebanyak 100 ml aquades. Larutan asam amino prolin dihomogenkan. Perhitungan pengambilan larutan stok yang digunakan terdapat pada Lampiran 4.

3.5.5 Pembuatan Media

3.5.5.1 Pembuatan Media Perkecambahan Padi Hitam Var. Wojalaka

Bahan media MS ditambah sukrosa 30 g yang dilarutkan dalam 1000 ml aquades. Larutan MS dan sukrosa dihomogenkan menggunakan stirrer. Pengukuran pH dilakukan setelah semua bahan dimasukkan menggunakan kertas lakmus, dengan ketentuan pH antara 5,8 – 6,0. Apabila pH > 6,0 maka ditambahkan HCl, apabila < 5,8 maka ditambahkan NaOH. Setelah larutan MS dan sukrosa tercampur ditambahkan agar sebanyak 10 g dan dimasak di atas *hot plate* ±15 menit. Setelah mendidih, media dimasukkan dalam botol kultur steril sebanyak 10 ml kemudian ditutup dengan plastik pada ujung botolnya dan diikat menggunakan karet. Botol

kultur yang terisi media dimasukkan dalam keranjang autoklaf. Setelah itu media MS disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm ±15 menit.

3.5.5.2 Pembuatan Media Induksi Kalus Padi Hitam Var. Wojalaka

Bahan media MS ditambah sukrosa 30 g dilarutkan dalam 1000 ml aquades. Larutan MS dan sukrosa dihomogenkan diatas hot plate dengan stirrer. Setelah larutan media homogen, ditambahkan dengan berbagai konsentrasi hormon 2,4-D yaitu 2;4 dan 8 mg/L dan ditambahkan berbagai konsentrasi prolin 100; 200 dan 300 mg/L. Pengukuran pH dilakukan setelah semua bahan dimasukkan menggunakan kertas lakmus, dengan ketentuan pH antara 5,8 – 6,0. Apabila pH >6,0 maka ditambahkan HCl, apabila <5,8 maka ditambahkan NaOH. Setelah larutan MS dan sukrosa tercampur ditambahkan agar sebanyak 10 g dan dimasak di atas hot plate ±15 menit. Setelah mendidih, media dimasukkan dalam botol kultur steril sebanyak 10 ml kemudian ditutup dengan plastik pada ujung botolnya dan diikat menggunakan karet. Botol kultur yang terisi media dimasukkan dalam keranjang autoklaf. Setelah itu media MS disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm ±15 menit.

3.5.6 Sterilisasi dan Inisiasi Eksplan Benih Padi Hitam var. Wojalaka

Sterilisasi eksplan benih padi hitam Wojalaka dilakukan dengan merendam eksplan dalam alkohol 70% selama 10 menit. Kemudian dibuang kulit benih padi dan benih padi direndam menggunakan NaOCl 40% selama 15 menit, setelah itu direndam kembali menggunakan NaOCl 20% selama 10 menit. Benih padi dibilas menggunakan aquades steril sebanyak 3 kali. Setelah itu benih dimasukkan dalam botol perlakuan.

3.6 Parameter Pengamatan

Pengamatan induksi kalus padi hitam Wojalaka meliputi:

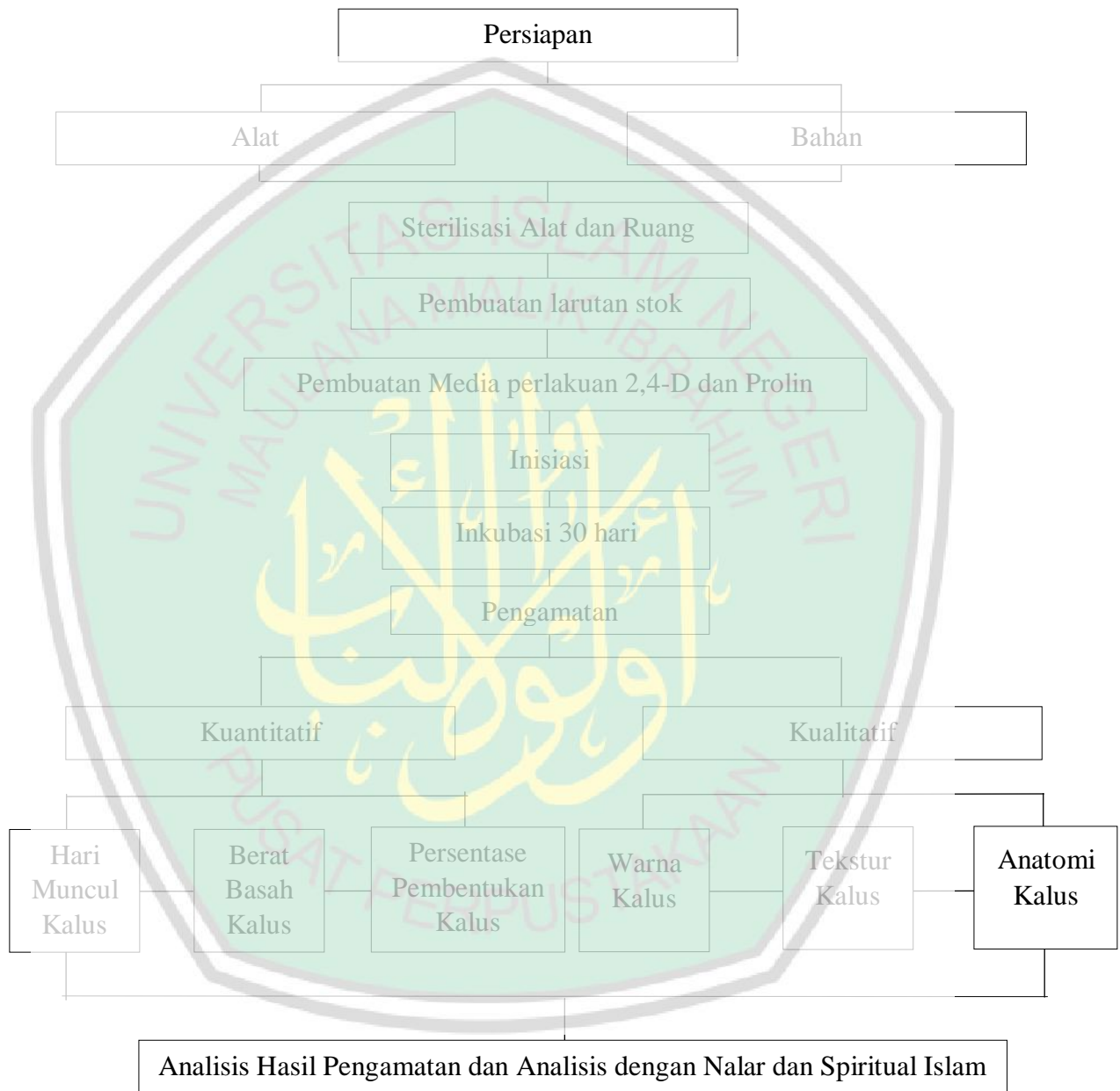
1. Pengamatan data kualitatif setelah 30 hari inkubasi:

- a. Pengamatan tekstur kalus: tekstur kalus yang diamati meliputi visual kalus yaitu remah, kompak, intermediet.
 - b. Pengamatan warna kalus: ditentukan dengan mencocokkan warna kalus dengan tabel warna pantone Tpx. Kemudian dikelompokkan dengan warna putih (P), putih kekuningan (PK), kuning (K), coklat (C) dan hijau (H).
 - c. Pengamatan anatomi dengan menggunakan teknik squash masing-masing perlakuan diambil dan pengamatan dilakukan di bawah mikroskop.
2. Pengamatan data kuantitatif
- a. Pengamatan hari muncul kalus: hari muncul kalus ditentukan dari munculnya nodul pada kalus, dihitung mulai dari hari setelah tanam hingga hari muncul kalus.
 - b. Persentase pembentukan kalus: yaitu dihitung dari banyaknya kalus yang terbentuk sampai hari ke-30 setelah penanaman dengan rumus pembentukan kalus.
 Rumus:
$$\frac{\sum \text{Kalus yang terbentuk pada setiap perlakuan}}{\sum \text{Seluruh eksplan pada setiap perlakuan}} \times 100\%$$
 - c. Pengamatan berat basah kalus: diamati pada hari ke-30 akhir pengamatan, dengan memotong bagian yang berkalus di dalam LAF dalam keadaan steril. Berat basah kalus ditimbang menggunakan timbangan analitik.

3.7 Analisis data

Data pengamatan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif meliputi tekstur, warna dan anatomi pada kalus padi hitam. Data kuantitatif meliputi hari muncul kalus, persentase pembentukan kalus dan berat basah kalus. Data kuantitatif dianalisis menggunakan uji statistik *Analisis Variansi Two Way* (ANOVA). Uji lanjut dilakukan apabila hasil signifikan perlakuan berbeda nyata. Uji lanjut tersebut menggunakan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%. Pengolahan data dengan menggunakan software IBM SPSS versi 24.

3.8 Desain Penelitian



Gambar 3.1 Alur desain penelitian

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengaruh 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) Terhadap Induksi Kalus Padi Hitam (*Oryza sativa L.*) var. Wojalaka Secara *In-vitro*.

Hasil penelitian yang telah dilakukan tentang induksi kalus padi hitam var. Wojalaka selama 30 hari diperoleh data kuantitatif dan data kualitatif. Data kuantitatif meliputi hari muncul kalus, persentase pembentukan kalus, dan berat basah kalus. Setelah data diperoleh kemudian data dianalisis menggunakan *Analisis Variansi* (ANOVA). Hasil ANOVA disajikan pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil ANOVA pengaruh 2,4-D terhadap induksi kalus padi hitam (*Oryza sativa L.*) var. Wojalaka

Variabel	F Hitung	F Tabel 5%
Hari muncul kalus (HMK)	68,072*	3,11
Persentase pembentukan kalus	258,100*	3,11
Berat basah kalus	281,098*	3,11

Keterangan*: pemberian 2,4-D berbeda nyata terhadap variabel pengamatan.

Hasil ANOVA menunjukkan bahwa $F_{hitung} > F_{tabel}$ artinya pemberian Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) 2,4-D berpengaruh nyata terhadap hari muncul kalus, persentase pembentukan kalus dan berat basah kalus pada induksi kalus padi hitam var. Wojalaka. Oleh karena itu uji lanjut dilakukan dengan menggunakan uji (*Duncan Multiple Range Test*) DMRT 5%. Hasil uji DMRT 5% disajikan pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil uji DMRT pengaruh 2,4-D terhadap induksi kalus padi hitam (*Oryza sativa* L.) var. Wojalaka

Konsentrasi 2,4-D mg/L	Pengamatan hari ke-30		
	Hari muncul kalus (HST)	Persentase pembentukan kalus (%)	Berat basah kalus (mg)
0 mg/L	-	-	-
2 mg/L	8,09c	40,62a	26,12a
4 mg/L	5,93b	56,25b	48,12b
8 mg/L	5,00a	68,75c	64,50c

Keterangan: angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan perlakuan tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT 5%.

Hasil uji DMRT 5% terhadap hari muncul kalus menunjukkan bahwa pemberian 2,4-D dengan konsentrasi 8 mg/L mampu menginduksi kalus lebih cepat yaitu dengan rata-rata hari muncul kalus 5 hari dibanding dengan konsentrasi lainnya. Sedangkan yang paling lambat adalah dengan konsentrasi terendah yaitu 2 mg/L dengan rata-rata hari muncul kalus sebesar 8,09 hari. Konsentrasi 8 mg/L juga memberikan persentase pembentukan kalus terbesar yaitu sebanyak 68,75%. Sedangkan konsentrasi terendah terdapat pada konsentrasi 2 mg/L dengan persentase sebesar 40,62%. Konsentrasi 8 mg/L berhasil menginduksi kalus padi hitam var. Wojalaka dengan rata-rata berat basah kalus tertinggi yaitu 64,50 mg. Sedangkan konsentrasi terendah 2,4-D yaitu 2 mg/L memberikan rata-rata berat kalus sebesar 26,12 mg.

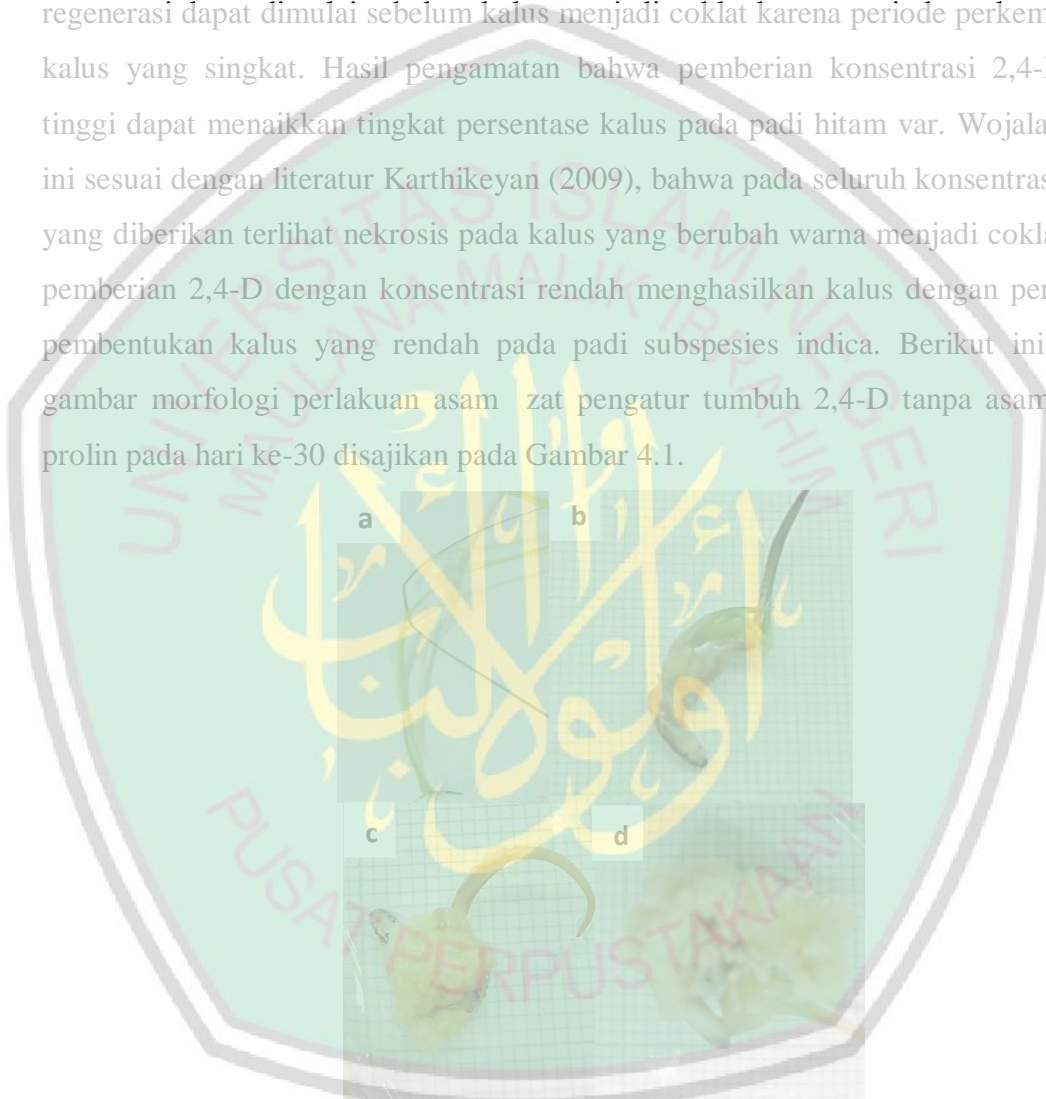
Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ZPT dari golongan auksin 2,4-D mampu menginduksi kalus padi hitam var. Wojalaka pada semua konsentrasi. Sedangkan perlakuan kontrol tanpa pemberian ZPT 2,4-D biji padi tumbuh secara normal. Pertumbuhan kalus padi hitam var. Wojalaka dimulai dari munculnya akar pada benih padi pada hari kedua kemudian membengkaknya bagian scutellum hingga munculnya nodul-nodul membentuk kalus. Menurut Bernal *et al.*, (2009), pembentukan kalus pada benih padi selalu berkembang pada daerah skutellar tidak

tergantung pada genotip. Pembentukan kalus pada padi diawali dengan pembengkakan pada daerah scutellum dan diikuti perkembangan kalus primer, proliferasi struktur proembriogenik dan globular. Menurut Krishnan (2001) dalam jurnal Bernal *et al.*, (2009), menjelaskan bahwa sel skutellar menyimpan sejumlah besar protein, fitin dan lipid. Sel epitel scutellar mengeluarkan enzim ke dalam endosperm (zat pati) untuk mencerna makromolekul menjadi bentuk terlarut dan menyerap kembali bahan yang terlarut untuk diangkut ke embrio agar dapat melakukan proses fisiologis pada benih kultur.

Pembentukan kalus padi hitam var. Woyalaka dapat terjadi karena adanya pemberian ZPT 2,4-D dalam media kultur. Menurut Azizah (2017), ZPT 2,4-D memiliki fungsi sebagai agen pemicu stress pada kultur *in-vitro*. Tanaman yang mengalami stress akan memberikan respon dalam sistem jaringan tanaman agar melakukan program ulang untuk differensiasi sel melalui aktivitas metilasi DNA menuju proses pembelahan sel. Program tersebut yang akan mempertahankan biji pada fase mitotik. Menurut Khumaida (2019); Sartika dan Djoko (2012), bahwa masuknya ZPT 2,4-D ke dalam eksplan yaitu dengan cara berdifusi, auksin diduga menginduksi sekresi ion H^+ agar keluar melalui dinding sel. Pengasaman dinding sel menyebabkan K^+ diambil, sehingga mengurangi potensial air dalam sel, akibatnya air lebih mudah masuk ke dalam sel dan sel akan membesar. Setelah auksin masuk ke dalam eksplan menyebabkan keseimbangan hormon endogen di dalamnya hingga terbentuk kalus.

Hasil pengamatan persentase pembentukan kalus bahwa pemberian ZPT 2,4-D berpengaruh terhadap persentase pembentukan kalus. Kalus padi hitam var. Woyalaka mengalami browning setelah 14 hari penanaman. Hal ini dapat disebabkan karena padi hitam var. Woyalaka termasuk dalam subspecies indica serta pada beberapa penelitian menyebutkan bahwa padi subspecies ini memiliki daya regenerasi yang rendah. Hal tersebut didukung oleh literatur Saika & Seiichi (2010), bahwa padi indica dapat menghasilkan kalus browning apabila ditanam dalam jangka waktu yang lama. Hasil pencoklatan pada kalus dapat disebabkan karena akumulasi polifenol dan

kematian sel yang mencegah proses proliferasi selanjutnya. Hal ini menyebabkan rendahnya proses regenerasi dalam kultivar indica. Oleh karena itu periode waktu yang dibutuhkan untuk induksi kalus kultivar indica dapat dipersingkat, sehingga regenerasi dapat dimulai sebelum kalus menjadi coklat karena periode perkembangan kalus yang singkat. Hasil pengamatan bahwa pemberian konsentrasi 2,4-D yang tinggi dapat menaikkan tingkat persentase kalus pada padi hitam var. Wojalaka. Hal ini sesuai dengan literatur Karthikeyan (2009), bahwa pada seluruh konsentrasi 2,4-D yang diberikan terlihat nekrosis pada kalus yang berubah warna menjadi coklat, serta pemberian 2,4-D dengan konsentrasi rendah menghasilkan kalus dengan persentase pembentukan kalus yang rendah pada padi subspecies indica. Berikut ini adalah gambar morfologi perlakuan asam zat pengatur tumbuh 2,4-D tanpa asam amino prolin pada hari ke-30 disajikan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Pengaruh ZPT 2,4-D terhadap induksi kalus padi hitam (*Oryza sativa* L.) var. Wojalaka secara *in-vitro*: a. 0 mg/L b. 2 mg/L c. 4 mg/L d. 8 mg/L (30 HST).

Hasil pengamatan berat basah kalus bahwa pemberian ZPT 2,4-D berpengaruh terhadap berat basah kalus dibandingkan dengan perlakuan kontrol.

Menurut Khalida *et al.*, (2019) bahwa pemberian hormon 2,4-D yang optimal akan menyebabkan pertumbuhan kalus yang optimal sehingga dapat menambah berat basah kalus. ZPT 2,4-D mampu meningkatkan tekanan osmotik, permeabilitas sel, sintesis protein, dan plastisitas serta dapat mengurangi tekanan pada dinding sel. Hal ini sesuai dengan literatur Azizah *et al.*, (2017), bahwa pertumbuhan kalus akan meningkat sejalan dengan meningkatnya pemberian ZPT 2,4-D. Pemberian ZPT 2,4-D yang tepat akan menyebabkan tanaman akan memberikan respon yang baik. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang diberikan untuk menginduksi kalus dapat menurunkan frekuensi pembentukan kalus karena sel tanaman yang tidak bisa menerima efek toksik dari ZPT tersebut.

4.2 Pengaruh Asam Amino Prolin terhadap Induksi Kalus Padi Hitam (*Oryza sativa* L.) var. *Wojalaka* secara *in-vitro*.

Hasil penelitian yang telah dilakukan tentang induksi kalus padi hitam var. *Wojalaka* selama 30 hari diperoleh data kuantitatif dan data kualitatif. Data kuantitatif meliputi hari muncul kalus, persentase pembentukan kalus dan berat basah kalus. Hasil yang diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan yaitu pemberian asam amino prolin saja tidak mampu menginduksi kalus pada padi hitam var. *Wojalaka*. Benih pada perlakuan pemberian asam amino prolin tanpa ZPT tumbuh normal seperti perlakuan kontrol. Setelah data diperoleh kemudian data dianalisis menggunakan *Analisis Variansi* (ANOVA). Hasil ANOVA disajikan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil ANOVA pengaruh prolin terhadap induksi kalus padi hitam (*Oryza sativa* L.) var. *Wojalaka*

Variabel	F Hitung	F Tabel 5%
Hari muncul kalus (HMK)	2,192	3,01
Persentase pembentukan kalus	4,231*	3,01
Berat basah kalus	1,367	3,01

Keterangan *: pemberian prolin berbeda nyata terhadap variabel pengamatan.

Hasil ANOVA menunjukkan bahwa $F_{hitung} < F_{tabel}$ artinya pemberian asam amino tidak berpengaruh pada hari muncul kalus dan berat basah kalus, Hal ini menunjukkan bahwa rata-rata hari muncul kalus dan berat basah kalus antar perlakuan relatif tidak jauh berbeda. Hasil ANOVA pada variabel persentase pembentukan kalus berpengaruh pada induksi kalus padi hitam var. Woyalaka. Oleh karena itu uji lanjut dilakukan dengan menggunakan uji (*Duncan Multiple Range Test*) DMRT 5%. Hasil uji DMRT 5% disajikan pada Tabel 4.4

Tabel 4.4 Hasil uji lanjut DMRT prolin terhadap induksi kalus padi hitam (*Oryza sativa* L.) var. Woyalaka

Konsentrasi prolin (mg/L)	Pengamatan hari ke-30	
	Persentase pembentukan kalus (%)*	
0 mg/L	54,16a	
100 mg/L	54,16a	
200 mg/L	54,16a	
300 mg/L	58,33b	

Keterangan*: Hasil analisis uji lanjut DMRT 5% angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan perlakuan tidak berbeda nyata.

Hasil uji DMRT 5% terhadap persentase pembentukan kalus menunjukkan bahwa pemberian prolin pada konsentrasi 300 mg/L menghasilkan persentase pembentukan kalus sebesar 58,33%. Sedangkan pada konsentrasi yang lainnya menghasilkan persentase yang tidak berbeda nyata dinotasikan dengan huruf. Menurut Amer *et al.*, (2017), bahwa sumber nitrogen organik lebih mudah diserap dibandingkan dengan sumber nitrogen anorganik, hal tersebut dapat memicu akumulasi protein di dalam sel sehingga menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan sel yang lebih cepat. Peran prolin menurut Verslues & Sandeep (2010), yaitu dapat berfungsi sebagai osmoregulator yang mengatur pemasukan dan pengeluaran cairan tubuh dengan lingkungannya. Serta prolin dapat berfungsi dalam menjaga sel yang tertekan atau mengalami stress dan menjaga agar pertumbuhan

tanaman tetap dibawah tekanan osmotik (Gerdakaneh *et al.*, 2010). Pemberian asam amino tunggal tanpa pemberian zat pengatur tumbuh tidak mampu membentuk kalus. Berikut ini adalah gambar morfologi perlakuan asam amino tunggal tanpa ZPT 2,4-D pada hari ke-30 disajikan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Morfologi perlakuan asam amino prolin tanpa ZPT 2,4-D: a. 0 mg/L b. 100 mg/L c. 200 mg/L d. 300 mg/L (30 HST)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 300 mg/L dengan pemberian zat pengatur tumbuh menghasilkan rata-rata persentase pembentukan kalus sebesar 58,33%. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Umar *et al.*, (2017), bahwa pemberian prolin dapat menghambat pencoklatan pada kultur kalus padi cv. Ciherang subspecies indica. Hasil penelitian Kharisma (2011), menunjukkan bahwa pada konsentrasi 300 mg/L memberikan persentase pembentukan kalus tertinggi pada padi cv. Ciherang.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada variabel hari muncul kalus dan berat basah kalus tidak berpengaruh terhadap pemberian asam amino prolin. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa tidak berpengaruhnya pemberian asam amino dapat disebabkan karena berbedanya genotip, jumlah asam amino yang diberikan belum

optimal serta penggunaan asam amino yang dikombinasikan lebih baik. Hal tersebut terdapat pada hasil penelitian Amer *et al.*, (2017), yang menunjukkan bahwa perbedaan genotip menghasilkan respon yang berbeda pada padi Sakha 104 dan Giza178. Pemberian asam amino triptofan dalam jurnal tersebut tidak berpengaruh pada padi Giza178 hal ini disebabkan karena berbedanya kemampuan genotip dalam menyerap zat gizi dalam media.

Pemberian asam amino yang belum optimal, dapat menjadi salah satu alasan tidak berbedanya hasil pada berbagai konsentrasi pemberian prolin. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Shamsavari (2011), bahwa tidak semua pemberian asam amino glutamin berpengaruh pada semua kultivar padi karena para peneliti masih belum mengetahui kontribusi glutamin secara rinci pada kultur kalus padi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemberian glutamin hanya memberikan peningkatan pada cv. Lamsan, namun tidak berpengaruh pada cv. Kusan dan Siam. Pemberian asam amino dengan jumlah yang tepat serta berpengaruh pada genotip tersebut dapat memberikan hasil yang positif terhadap kultur kalus padi. Pada beberapa penelitian menggunakan konsentrasi prolin dari 100 mg/L hingga 2 g. Hasil penelitian Susanto (2020), bahwa penggunaan asam amino prolin pada induksi kalus padi hitam var. Cempo ireng menggunakan konsentrasi prolin sebanyak 2,88 g/l.

Pemberian asam amino yang dikombinasikan, dapat menjadi alasan tidak berbeda nyata hasil pemberian asam amino prolin tunggal. Pada beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian asam amino yang dikombinasikan menghasilkan peningkatan dibanding dengan pemberian asam amino tunggal. Hasil penelitian Pawar *et al.*, (2015), bahwa pemberian asam amino prolin dan glutamin yang dikombinasikan memberikan persentase induksi kalus tertinggi pada padi Ambemohar dan Jaya dibandingkan dengan pemberian asam amino tunggal. Hasil penelitian Saharan (2004), bahwa penggunaan asam amino prolin 500 mg/L dan kasein hidrolisat 500 mg/L berpengaruh terhadap persentase induksi kalus pada padi cv. HKR-46 dan HKR-126.

4.3 Pengaruh Kombinasi 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D) dan Asam Amino Prolin terhadap Induksi Kalus Padi Hitam (*Oryza sativa* L.) var. *Wojalaka* secara *In-vitro*.

4.3.1 Pengamatan Kuantitatif

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan tentang induksi kalus padi hitam var. *Wojalaka* selama 30 hari diperoleh data kuantitatif meliputi hari muncul kalus, persentase pembentukan kalus dan berat basah kalus. Pemberian kombinasi ZPT 2,4-D dan asam amino prolin diharapkan berpengaruh terhadap variabel pengamatan. Setelah data diperoleh kemudian data dianalisis menggunakan *analisis variansi* (ANOVA). Hasil ANOVA disajikan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil ANOVA pengaruh kombinasi 2,4-D dan asam amino prolin terhadap induksi kalus padi hitam (*Oryza sativa* L.)

Variabel	F Hitung	F Tabel 5%
Hari muncul kalus (HMK)	1,611	2,19
Persentase pembentukan kalus	21,156*	2,19
Berat basah kalus	15,186*	2,19

Keterangan*: pemberian kombinasi 2,4-D dan prolin berbeda nyata terhadap variabel pengamatan.

Hasil ANOVA menunjukkan bahwa $F_{hitung} < F_{tabel}$ artinya kombinasi 2,4-D dengan asam amino prolin tidak berpengaruh terhadap hari muncul kalus. Pada variabel pengamatan persentase pembentukan kalus dan berat basah kalus pada induksi kalus padi hitam var. *Wojalaka* $F_{hitung} > F_{tabel}$ artinya kombinasi 2,4-D dengan asam amino prolin berpengaruh terhadap persentase pembentukan kalus dan berat basah kalus. Oleh karena itu uji lanjut dilakukan pada variabel persentase pembentukan kalus dan berat basah kalus dengan menggunakan uji (*Duncan Multiple Range Test*) DMRT 5%. Hasil uji DMRT 5% disajikan pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil uji lanjut DMRT 5% dan rata-rata kombinasi 2,4-D dan asam amino prolin terhadap induksi kalus padi hitam (*Oryza sativa* L.)

Perlakuan (mg/L)		Pengamatan hari ke-30		
2,4D	Prolin	Hari muncul kalus (HMK)	Persentase pembentukan kalus (%)*	Berat basah kalus (mg)*
0	0	-	-	-
	100	-	-	-
	200	-	-	-
	300	-	-	-
2	0	9,12	37,50a	22,00a
	100	8,25	37,50a	19,37a
	200	7,37	50,00b	37,37b
	300	7,50	37,50a	25,75a
4	0	6,25	50,00b	41,87bc
	100	5,87	62,50c	55,75d
	200	5,50	50,00b	46,50c
	300	5,87	62,50c	48,00c
8	0	4,75	75,00d	75,37f
	100	5,00	62,50c	57,37d
	200	5,12	62,50c	59,12d
	300	5,25	75,00d	67,12e

Keterangan*: hasil analisis uji lanjut DMRT 5% angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan perlakuan tidak berbeda nyata.

Hasil uji DMRT 5% Pemberian kombinasi 2,4D 8 mg/L + 300 mg/L prolin menghasilkan rata-rata 5,25 hari untuk muncul kalus, persentase pembentukan kalus tertinggi sebesar 75% dan berat basah kalus sebesar 67,12 mg. Sedangkan rata-rata berat basah kalus terendah yaitu 19,37 mg terdapat pada konsentrasi 2,4-D 2 mg/L +

100 mg/L prolin dengan persentase pembentukan kalus sebesar 37,5% dan hari muncul kalus 8,25 hari.

Hasil pengamatan bahwa pemberian prolin dalam media kalus berpengaruh terhadap persentase pembentukan kalus. Hal ini sesuai dengan literatur Purnamaningsih (2006), bahwa pemberian asam amino prolin dalam media kultur yang mengandung auksin dapat meningkatkan keberhasilan pembentukan kalus, karena sumber nitrogen organik yang dimiliki oleh asam amino prolin lebih mudah diserap oleh tanaman. Penelitian yang dilakukan Gerdakaneh *et al.*, (2010), menunjukkan bahwa pemberian prolin pada kultur kalus stroberi dapat membantu kelangsungan hidup kalus karena peran prolin yang dapat mengatasi stress osmotik akibat pemberian konsentrasi sukrosa yang tinggi. Menurut Kharisma (2011), bahwa pemberian 2,4-D dan asam amino prolin memberikan berat basah kalus dan persentase pementukan kalus yang tinggi pada padi cv. Ciherang. Menurut Umar *et al.*, (2017), dalam jurnalnya menjelaskan bahwa pemberian asam amino prolin dalam media kultur jaringan mampu menghambat pencoklatan jaringan tanaman yang disebabkan oleh oksidasi senyawa fenol pada kultur kalus padi Ciherang.

Hasil pengamatan berat basah kalus pada kombinasi 2,4-D dan asam amino prolin menunjukkan bahwa penggunaan perlakuan kombinasi menunjukkan naiknya berat kalus diikuti dengan semakin tinggi konsentrasi 2,4-D dan prolin. Menurut Rahayu (2003), berat basah kalus yang tinggi disebabkan oleh kecepatan sel yang membelah diri serta menghasilkan kandungan air yang banyak di dalam sel. Menurut Gerdakaneh *et al.*, (2010), pemberian prolin eksogen ke dalam media meningkatkan kandungan prolin bebas intraseluler dalam kalus sehingga meningkatkan penjagaan tekanan osmotik dari stress yang mempengaruhi tanaman. Pemberian ZPT 2,4-D dalam induksi kalus menyebabkan benih mengalami stress sehingga 2,4-D bertanggung jawab dalam meningkatkan hipermetilasi DNA pada fase pra-embriionik yang mampu mempertahankan sel dalam metode mitosis (Din *et al.*, 2016). Peningkatan berat basah kalus sejalan dengan meningkatnya konsentrasi 2,4-D, hal ini sesuai dengan literatur Asmono & Vega (2016), bahwa peningkatan pembesaran

dan pembelahan pada sel dipengaruhi oleh meningkatnya konsentrasi ZPT 2,4-D. Hal tersebut disebabkan sel kalus yang mengalami proliferasi sel tanpa disertai diferensiasi.

4.3.2 Pengamatan Kualitatif

Kalus terdiri dari kumpulan sel-sel jaringan yang membelah terus menerus dan belum terorganisasi (*amorphous*) (Fauziyyah, 2012). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ZPT 2,4-D dari golongan auksin adalah yang paling sesuai untuk menginduksi kalus pada kultur jaringan padi (Libin *et al.*, 2012). Pemberian asam amino prolin dalam kultur padi berperan dalam meningkatkan induksi kalus embriogenik padi (Amer *et al.*, 2017). Kalus yang berasal dari skutelum padi dapat menghasilkan kalus embriogenik atau non embriogenik. Kalus embriogenik memiliki ciri kalusnya yang relatif kering, bewarna putih susu, nodular. Sebaliknya kalus non embriogenik biasanya berair dan biasanya bewarna putih atau coklat (Susanto, 2020).

Pengamatan morfologi pada kalus dilakukan pada akhir hari ke-30 yang meliputi warna dan tekstur pada kalus padi. Terdapat beberapa variasi warna kalus yang terbentuk pada perlakuan 2,4-D dan prolin. Hasil pengamatan bahwa pada konsentrasi (2 mg/L 2,4-D + 0 mg/L prolin), (2 mg/L 2,4-D + 100 mg/L prolin), (2 mg/L 2,4-D + 200 mg/L prolin), (2 mg/L 2,4-D + 300 mg/L prolin) menghasilkan kalus yang berwarna *golden brown* (18-0940TPX), *honey* (16-0946TPX), dan *bronze brown* (18-0937TPX) (Gambar 4.3) (Lampiran 6). Hasil tersebut menunjukkan bahwa secara visual warna yang dihasilkan umumnya bewarna coklat. Menurut Wahyuni (2020), kalus yang bewarna coklat disebabkan karena adanya senyawa fenol yang berlebih sehingga menyebabkan penghambatan pada pertumbuhan serta dapat mengakibatkan kematian pada jaringan. Peristiwa perubahan warna menjadi coklat menurut Tarbiyah *et al.*, (2006) dalam jurnal Wahyuni (2020), disebabkan karena meningkatnya produksi senyawa fenolat yang diikuti oksidasi oleh aktivitas enzim oksidase dan polimerasinya. Berikut ini hasil pengamatan warna dan tekstur kalus padi hitam var. Woyalaka disajikan pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Pengaruh kombinasi 2,4-D dan prolin terhadap warna dan tekstur kalus padi hitam (*Oryza sativa L.*)

Perlakuan	Warna Kalus*	Tekstur Kalus
0 mg/L 2,4-D + 0 mg/L Prolin	-	-
0 mg/L 2,4-D + 100 mg/L Prolin	-	-
0 mg/L 2,4-D + 200 mg/L Prolin	-	-
0 mg/L 2,4-D + 300 mg/L Prolin	-	-
2 mg/L 2,4-D + 0 mg/L Prolin	Golden brown (coklat)	Kompak
2 mg/L 2,4-D + 100 mg/L Prolin	Honey (coklat)	Kompak
2 mg/L 2,4-D + 200 mg/L Prolin	Bronze brown (coklat)	Kompak
2 mg/L 2,4-D + 300 mg/L Prolin	Bronze brown (coklat)	Kompak
4 mg/L 2,4-D + 0 mg/L Prolin	Mellow yellow (kuning)	Kompak
4 mg/L 2,4-D + 100 mg/L Prolin	Lemonade (putih kekuningan)	Remah
4 mg/L 2,4-D + 200 mg/L Prolin	Lemonade (putih kekuningan)	Kompak
4 mg/L 2,4-D + 300 mg/L Prolin	Lemonade (putih kekuningan)	Remah
8 mg/L 2,4-D + 0 mg/L Prolin	Transparent yellow (putih kekuningan)	Remah
8 mg/L 2,4-D + 100 mg/L Prolin	Lemonade (putih kekuningan)	Remah
8 mg/L 2,4-D + 200 mg/L Prolin	Lemonade (putih kekuningan)	Remah
8 mg/L 2,4-D + 300 mg/L Prolin	Lemonade (putih kekuningan)	Remah

Keterangan*: warna kalus dibandingkan dengan tabel warna *pantone TPX*.

Berikut ini adalah gambar morfologi warna padi hitam var. *Wojalaka* yang disajikan pada Gambar 4.3



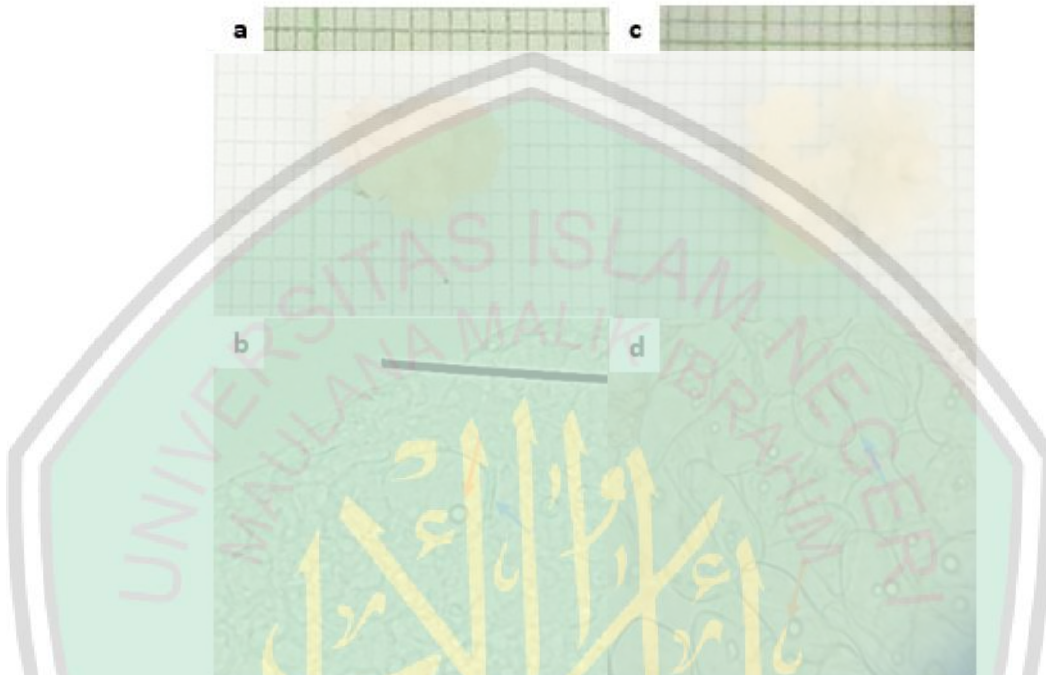
Gambar 4.3 Morfologi warna dan tekstur padi hitam var. Wojalaka pada semua konsentrasi 2,4-D dan prolin (A): 2 mg/L + 0 mg/L. (B): 2 mg/L + 100 mg/L. (C) 2 mg/L + 200 mg/L. (D): 2 mg/L + 300 mg/L. (E): 4 mg/L + 0 mg/L. (F): 4 mg/L + 100 mg/L. (G): 4 mg/L + 200 mg/L. (H): 4 mg/L + 300 mg/L. (I): 8 mg/L + 0 mg/L. (J): 8 mg/L + 100 mg/L. (K): 8 mg/L + 200 mg/L. (L): 8 mg/L + 300 mg/L.

keterangan: Panah hitam menunjukkan kalus yang browning.

Hasil pengamatan bahwa pada kombinasi perlakuan (4 mg/L 2,4-D + 0 mg/L prolin), (4 mg/L 2,4-D + 100 mg/L prolin), (4 mg/L 2,4-D + 200 mg/L prolin), (4 mg/L 2,4-D + 300 mg/L prolin), (8 mg/L 2,4-D + 0 mg/L prolin), (8 mg/L 2,4-D + 100 mg/L prolin), (8 mg/L 2,4-D + 200 mg/L prolin), (8 mg/L 2,4-D + 300 mg/L prolin) menghasilkan warna *mellow yellow* (12-0720TPX), *lemonade* (12-0740TPX), dan *transparent yellow* (11-0617TPX) (Gambar 4.3) (Lampiran 6). Hasil tersebut menunjukkan bahwa warna secara visual menunjukkan warna putih kekuningan hingga kuning. Menurut Indria (2016), warna pada kalus merupakan indikator fase pertumbuhan kalus. Kalus yang memiliki warna putih kekuningan pada kalus tersebut dapat berkembang menjadi embriosomatik. Menurut Royani *et al.*, (2015), bahwa warna kekuningan pada kalus menunjukkan pembelahan sel yang masih aktif pada sel-sel dewasa. Menurut Wahyuni (2020), bahwa warna kalus yang bewarna putih kekuningan memiliki kandungan butir pati yang tinggi serta jaringan yang belum memiliki kloroplas. Hal tersebut menandakan bahwa kalus memiliki pertumbuhan dan dalam keadaan yang baik.

Tekstur pada kalus merupakan salah satu indikator pertumbuhan kalus. Hasil pengamatan secara visual diperoleh dua macam tekstur kalus yaitu kompak dan remah. Tekstur kalus yang kompak diperoleh pada konsentrasi (2 mg/L 2,4-D + 0 mg/L prolin), (2 mg/L 2,4-D + 100 mg/L prolin), (2 mg/L 2,4-D + 200 mg/L prolin), (2 mg/L 2,4-D + 300 mg/L prolin), (4 mg/L 2,4-D + 0 mg/L prolin) dan (4 mg/L 2,4-D + 200 mg/L prolin). Tekstur kalus yang remah diperoleh pada konsentrasi (4 mg/L 2,4-D + 100 mg/L prolin), (4 mg/L 2,4-D + 300 mg/L prolin), (8 mg/L 2,4-D + 0 mg/L prolin), (8 mg/L 2,4-D + 100 mg/L prolin), (8 mg/L 2,4-D + 200 mg/L prolin), (8 mg/L 2,4-D + 300 mg/L prolin). Hal tersebut sesuai dengan literatur Yelnitis (2012), bahwa semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang diberikan pada media kalus maka semakin remah kalus yang dihasilkan. Hasil pengamatan pada kalus yang kompak memiliki ciri tekstur yang padat dengan nodul-nodul yang tidak dapat dipisahkan. Sedangkan kalus yang remah pada penelitian ini memiliki ciri tekstur

yang lunak serta nodul-nodul mudah dipisahkan. Hasil pengamatan morfologi dan anatomi kalus padi hitam disajikan pada Gambar 4.4



Gambar 4.4 Morfologi dan anatomi dengan perbesaran 1000X kalus padi hitam var. Wojalaka, a. dan b. Kalus kompak (2,4-D 2 mg/L + 100 mg/L), c. dan d. Kalus remah (2,4-D 4 mg/L + prolin 300 mg/L).
Keterangan: Panah merah: inti sel, Panah biru: dinding sel.

Ahmad *et al.*, (2013), menyebutkan bahwa karakter kalus embriogenik pada padi indica berwarna kuning pucat putih dengan tekstur nodul yang besar. Sedangkan kalus non embriogenik menunjukkan warna putih, kasar dan runcing. Menurut Simbolon *et al.*, (2017), Terbentuknya tekstur kalus yang remah dapat disebabkan oleh meningkatnya pembelahan sel pada kalus yang terjadi karena pemberian ZPT 2,4-D. Peran 2,4-D yang merangsang pembelahan pada sel menyebabkan sel mengalami pertumbuhan tanpa diikuti penebalan dinding sel sehingga mempertahankan tekstur pada kalus (Asmono & Vega, 2016). Menurut Wahyuni (2020), terbentuknya kalus yang kompak dapat disebabkan karena sel-sel yang awalnya membelah mengalami penurunan pada aktivitas proliferasinya. Aktivitas

tersebut dipengaruhi oleh auksin alami yang diperoleh dari eksplan asal. Menurut Ariati (2012) dalam Wahyuni (2020), tekstur kalus yang kompak dapat disebabkan oleh pemberian ZPT auksin dan sitokinin yang dapat mempengaruhi potensial air dalam sel sehingga menyebabkan penyerapan air dalam sel meningkat, sel yang dihasilkan akan semakin kaku. Menurut Purnamaningsih (2006), kalus padi yang bernodul-nodul dan berwarna bening memiliki kemampuan regenerasi membentuk tunas lebih tinggi dibandingkan kalus yang bertekstur kompak dan berwarna coklat-kehitaman.

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis pada Gambar 4.4 diperoleh sel anatomi pada kalus dengan ciri sel yang lonjong, bulat dan inti sel yang jelas. Kalus kompak memiliki ciri sel-sel yang tersusun rapat dengan adanya inti sel. Sedangkan pada kalus yang remah menghasilkan banyak inti sel yang jelas serta banyak ruang antar sel. Hal ini didukung dengan pernyataan Wijawati *et al.*, (2019), yang menjelaskan bahwa tekstur kalus kompak memiliki tekstur padat serta tersusun dari sel-sel yang sangat rapat. Sedangkan kalus remah memiliki tekstur lunak dan memiliki banyak ruang antar sel. Moztafiz & Alina (2018), menjelaskan bahwa kalus embriogenik memiliki tingkat pembelahan yang tinggi dan bentuk sel isodiametrik dengan sitoplasma yang kecil dan padat. Sel non embriogenik memiliki vakuola yang besar, butiran pati yang kecil.

4.4 Kajian Penelitian dalam Perspektif Islam

Tanaman padi termasuk dalam ordo *Poaceae* (Maulidia & Fanata, 2019). Padi hitam merupakan salah satu jenis padi yang dikonsumsi oleh sebagian masyarakat sebagai pangan fungsional karena padi hitam mengandung senyawa dan nutrisi yang baik untuk kesehatan diluar dari zat gizi yang diperoleh oleh padi itu sendiri (Kristamtini *et al.*, 2014). Budidaya padi hitam saat ini sangat populer sehingga para petani banyak yang membudidayakan padi hitam (Budiman *et al.*, 2012). Namun kebanyakan padi hitam var. Woyalaka saat ini hanya secara konvensional, oleh karena itu untuk menjaga plasma nutfah dari padi hitam var. Woyalaka dengan

menggunakan teknik konservasi secara *in-vitro* melalui metode kultur kalus. Metode kultur kalus dalam kultur jaringan tanaman dapat dipengaruhi oleh pemberian zat pengatur tumbuh yang dicampurkan dengan media tanam. Media tanam yang diberikan dapat memberikan pengaruh terhadap kultur kalus padi hitam var. Woyalaka. Tanaman padi hitam merupakan makhluk Allah, atas seizin Allah tanaman tersebut tumbuh dan berkembang. Induksi kalus dapat dilakukan apabila media tanam yang digunakan memiliki konsentrasi hormon yang sesuai, sehingga kalus dapat tumbuh dan berkembang dengan baik. Hal ini terdapat pada firman Allah surah Al – A’raf (7) ayat 58 yang berbunyi:

وَالْبَلَدُ الطَّيِّبُ يَخْرُجُ نَبَاتُهُ بِإِذْنِ رَبِّهِ وَالَّذِي خَبِثَ لَا يَخْرُجُ إِلَّا نَكِدًّا كَذَلِكَ نُصَرِّفُ
الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَشْكُرُونَ (٥٨)

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

Menurut Mahalli dan Suyuthi (2007), (*Dan tanah yang baik*) yang subur tanahnya (*tanaman-tanamannya tumbuh subur*) tumbuh dengan baik (*dengan seizin Tuhannya*) hal ini merupakan perumpamaan bagi orang mukmin yang mau mendengar petuah/nasihat kemudian ia mengambil manfaat dari nasihat itu (*dan tanah yang tidak subur*) jelek tanahnya (*tidaklah mengeluarkan*) tanamannya (*kecuali tumbuh merana*) sulit dan susah tumbuhnya. Hal ini merupakan perumpamaan bagi orang yang kafir. (*Demikianlah*) seperti apa yang telah Kami jelaskan (*Kami menjelaskan*) menerangkan (*Ayat-ayat Kami kepada orang-orang yang bersyukur*) terhadap Allah, kemudian mereka mau beriman kepada-Nya.

Menurut Shihab (2013) dalam jurnal Mustakim (2017:9-10), pada ayat ini menjelaskan bahwa bumi memiliki jenis tanah yang baik atau subur dan tanah yang tidak baik. Tanah yang baik apabila disirami oleh air hujan dan ditanami oleh

tanaman akan subur. Sedangkan tanah yang gersang meskipun di siram oleh air hujan tanamannya akan merana dan tidak menghasilkan apapun. Pada penelitian induksi kalus padi hitam ini dengan menggunakan hormon berpengaruh terhadap induksi kalus padi hitam var. *Wojalaka*. Pemberian asam amino prolin tunggal tidak mampu menginduksi kalus karena saat induksi kalus peran hormonlah yang digunakan benih padi hitam untuk menginduksi kalus padi hitam var. *Wojalaka*. Hormon berperan sebagai agen pemicu stress pada kultur jaringan tanaman. Tanaman yang mengalami stress akan memberikan respon dalam sistem jaringan tanaman agar melakukan program ulang untuk diferensiasi sel melalui aktivitas metilasi DNA menuju proses pembelahan sel. Program tersebut yang akan mempertahankan biji pada fase mitotik.



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan pada penelitian ini yaitu:

1. Zat pengatur tumbuh 2,4-D berpengaruh terhadap induksi kalus padi hitam var. Wojalaka pada variabel hari muncul kalus, persentase pembentukan kalus dan berat basah kalus. Konsentrasi 8 mg/L menghasilkan rata-rata hari muncul kalus 5 hari dengan persentase pembentukan kalus sebesar 68,75% dan berat basah kalus 64,50 mg.
2. Asam amino prolin berpengaruh terhadap induksi kalus padi hitam var. Wojalaka pada variabel persentase pembentukan kalus. Konsentrasi 300 mg/L menghasilkan persentase pembentukan kalus sebesar 58,33%.
3. Kombinasi 2,4-D dan prolin berpengaruh terhadap persentase pembentukan kalus dan berat basah kalus. Konsentrasi terbaik pada perlakuan kombinasi yaitu 8 mg/L + 300 mg/L menghasilkan persentase pembentukan kalus sebesar 75% dan berat basah kalus 67,12 mg dengan tekstur kalus yang remah bewarna putih kekuningan serta memiliki inti sel yang jelas dan memiliki banyak ruang antar sel.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian ini yaitu:

1. Meningkatkan konsentrasi prolin dengan konsentrasi yang lebih tinggi agar mengetahui efek yang terjadi pada kalus padi hitam var. Wojalaka
2. Penggunaan asam amino yang lain selain prolin, penggunaan asam amino yang dikombinasikan, agar dapat mengetahui pengaruh terhadap induksi kalus padi hitam var. Wojalaka.
3. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya yaitu proliferasi hingga regenerasi pada kalus padi hitam Wojalaka.

DAFTAR PUSTAKA

- Abiri R., M. M., N. A. Shahrudin., Z. N. B. Yusof., N. Atabaki., M. M. Hanafi., M. Sahebi., P. Azizi., N. Kalhori., & A. Valdian. 2017. Enhancing somatic embryogenesis of Malaysian rice cultivar MR219 using adjuvant materials in a high-efficiency protocol. *International Journal Environmental Science and Technology*. 14(5).
- Adhi, R. K. 2017. Pertumbuhan Padi Hitam Var. Wojalaka yang Dibudidayakan dengan Sistem Tanam Banjar. *Al Ulum Sains dan Teknologi*. 3(1).
- Admojo, L., Ari I & Hananto H. 2014. Perkembangan Penelitian Induksi Kalus Embriogenik pada Jaringan Vegetatif Tanaman Karet Klonal. *Warta Per karetan*. 33(1).
- Ahmad, F. I., Nur S. J., Alina W. 2013. Effect of 2,4-D on Embryogenic Callus Induction of Malaysian indica Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars MR123 and MR12. *Jurnal Teknologi*. 64(2).
- Akram, M., H. M. Asif., M. Uzair., Naveed A., Asadullah M., S. M. Ali S., Zahoor ul H and Asmat U. 2011. Amino Acids : A Review Article. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(17).
- Alhasnawi, A. N., Ahsan A. K., Azhar M., Wan M. W. Y., Che R. B. C. M. Z. 2014. Plant Tissue Culture and Proline Accumulation in Abiotic Stress : A Review. *Journal Basic and Applied Science Research*. 4(6).
- Amer, A. M., Gehad M. M., Mona H. H., Mohammed Z. S., Usama I. A. 2017. Effect of some of the natural organic sources on rice tissue culture. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 16.
- Asmono Luri dan Vega Kartika Sari. 2016. Induksi Kalus dari Beberapa Kultivar Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L. Dataran Medium Secara In-Vitro. *Jurnal Ilmiah Inovasi*. Vol.16 (2).
- Azizah, K. A., Didik P. R., & Bambang S. 2017. Peningkatan Efisiensi Regenerasi Melalui Optimasi Media Induksi Kalus dengan 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid pada Padi Indica (*Oryza sativa* L. var. Ciherang). *Jurnal ILMU DASAR*. 18(2).
- Baday, S. J. S. 2018. Plant Tissue Culture. *International Journal of Agriculture and Enviromental Research*. 4(4).

- Bardenas, Eliseo A. 1965. **Morphology and Varietal Characteristics of The Rice Plant**. Philippines: The Interbational Rice Research Institute.
- Basith, A. 2014. Analisis Variasi Genetik Berdasarkan Parsial Sekuen Gen *rbcl* cpDNA dan Kadan Antosianin pada Empat Varietas Padi Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) lokal Indonesia. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. *Thesis*.
- Bernal, Maylin Pérez., Magalis Delgado Rigo., Carlos Alberto Hernández Díaz., María Teresa Barceló Ávila and Raúl Armas Ramos. 2019. Callus induction and plant regeneration of two Cuban rice cultivars using different seed explants and amino acid supplements. *Annals of Tropical Research*. 31(2).
- Bhatia, Saurabh., Randhir Dahiya., Kiran Sharma., Tanmoy Bera. 2015. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. India: Academic Press.
- Bhojwani, S. S dan M. K. Razdan. 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Development in Crop Science 5. Amsterdam: Elsevier Press.
- Budiman., E. Arisoesilaningsih and R. B. E. Wibowo. 2012. Growth Adaption of Two Indonesian Black Rice Origin NTT Cultivating In Organic Paddy Field, Malang East Java. *The Journal Of Tropical Life Science*. 2(3) : 77-80.
- Bustami, M. U. 2011. Penggunaan 2,4-D Untuk Induksi Kalus Kacang Tanah. *Media Litbang Sulteng*. 4(2) : 137-141.
- Chaichana, N. 2019. Analysis of nutritional composition, antioxidant activity and callus induction of *Oryza sativa* cultivars Khumthan and Norprae. *Science Asia*. 45.
- Das, N. K., Hammadul H., Md. Nazmul H and Shamsul H. P. 2019. Effect of Plant Growth Regulators and Proline in Efficient Regeneration of Recalcitrant Indica Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Biological Sciences*. 19 (4).
- Dewi, N., Iswari S., Dewi., Ika R. 2014. Pemanfaatan Teknik Kultur *In-vitro* Untuk Konservasi Plasma Nutfah Ubi-Ubian. *Jurnal Agro Biogen*. 10 (1).
- Din, Abd Rahman Jabir Mohd., Fauziyah Iliyas Ahmad and Mohamad Roji Sarmidi. 2016. Improvement of Efficient *in-vitro* Regeneration Potential of Mature Callus Induced From Malaysian Upland Rice Seed. *Saudi Journal of Biological sciences*. 23(1).

- Edi, Syahmi. 2015. Influence 2,4-D (*Diclorophenoxy Acetic Acid*) And Bap (Benzyl Aminopurine) To Callus Induction On Rice Plants FieldS. *Trends In Science And Science Education*.
- Enany, A. E. 1995. Proline Effecton Shoot Organogenesisand Protein Synthesisin Salinity-Stressed tomato Cultures. *Journal of Islamic Academy of Sciences*. 8(3).
- Erviyana, P. 2014. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Tanaman Pangan Jagung di Indonesia. *Journal of Economics and policy*. 7(2).
- Fauziyyah, D., Triani H., K. 2012. Upaya Memacu Pembentukan Kalus Eksplan Embrio Kedelai (*Glycine max* (L.) Merril) dengan Pemberian Kombinasi 2,4-D dan Sukrosa Secara Kultur *In-vitro*. *Jurnal Pembangunan Pedesaan*. 12(1).
- Fauzy, E., Mansyur., Ali H. 2016. Pengaruh Penggunaan Media Murashige dan Skoog (MS) dan Vitamin Terhadap Teksttur, Warna dan Berat Kalus Rumpuk Gajah cv. Hawaii Pasca Radiasi Sinar Gamma pada dosis LD50. *Fakultas peternnakan universitas Padjajaran*.
- Gaspar, T., Claire K., Claude P., Hubert G., David M. R., And Trevor A. T. 1996. Plant Hormones And Plant Growth Regulators In Plant Tissue Culture. *In-vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. 32.
- Gerdakaneh, M., Mozafari., Khaligi A., Sioseh-M. 2010. The Effect of Exogenous proline and osmotic stress on morphobiochemical parameters of strawberry callus. *Africans Journal Online*. 9(25).
- Hanas, Dicky Frenky., Eniek Kriswiyanti dan I ketut Junitha. 2017. Karakter Morfologi Beras Sebagai Pembeda Var. Padi. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences*. 1.
- Hanifah, N., Wibowo, A dan Setyowati N. 2016. Strategi Pengembangan Usaha Beras Hitam Organik (Studi Kasus di Kelompok Tani Gemah Ripah Kecamatan Karangpandan Kabupaten Karanganyar). *Agrista*. 4(3).
- Hayat, S., Qaiser H dan Mohammed A. 2012. Role of Proline Under Changing Environtment: A review. *Plant Signaling & Behavior*. 7(11).
- Herliana, O., Ida W., Sapto N. H. 2019. The Effect of Stable Manure and Seedling Number on Growth and Yield of Black Rice (*Oryza sativa* L. Indica). *Caraka Tani Journal of Sustainable Agriculture*. 34(1).

- Ho, Linh Thi., Sompong Te-Chato and Sureerat Yenchon. 2018. Callus Induction and Plantlet Regeneration Systems Indica Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivar Sangyod. *Walailak Journal*. 15(10).
- Htwe, Nwe Nwe., Mahmood Maziah., Ho Chai Ling., Faridah Qamaruz Zaman., Abdullah Mohd Zain. 2011. Responses of some selected Malaysian rice genotypes to callus induction under *In-vitro* salt stress. *African Journal of Biotechnology*. 10(3).
- Indria, Wahyu., Mansur dan Ali Husni. 2016. Pengaruh pemberian 2,4-D Terhadap Induksi Kalus dan Pemberian Zat Pengatur Tumbuh BA Terhadap Induksi Kalus Rumput Gajah Varietas Hawaii. *Fakultas peternakan Universitas Padjajaran*.
- Istanti, Naila Wahyu., Shanti Listyawati dan Sutarno. 2018. Aktivitas Hipokolesterolemik Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) Hasil Pemuliaan Dengan Sinar Gamma. *Prosiding Seminar Nasional*.
- Jubair, T.A., U. Salma., N. Haque., F. Akter., I.J. Mukti., A.K.M.F. Haque and M.R. Ali. 2008. Callus Induction and Regeneration of Local Rice (*Oryza sativa* L.) Variety Topa. *Asian Journal of Plant Sciences*. 7(5): 514-517.
- Karthikeyan, Alagarsamy. Shunmugiah Thevar Karutha Pandian and Manikandan Ramesh. 2009. High frequency plant regeneration from embryogenic callus of a popular indica rice (*Oryza sativa* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 15(4).
- Khalida, Azharia., Suwirmen., Zozy Aneloi. 2019. Induksi Kalus Anggrek Lilin (*Aerides odorata* Lour.) dengan Pemberian beberapa Konsentrasi 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4 D). *Jurnal Biologi Universitas Andalas (J. Bio. UA)*. 7(2).
- Kharisma, Gemma Galgani. 2011. Pengaruh Suplemen Organik Terhadap Induksi Kalus dan Regenerasi Kalus dan Regenerasi Tunas Pada Kalus Biji Padi (*Oryza sativa* L.) cv. Ciherang secara *In-vitro*. *Skripsi*. Universitas Atma Jaya Yogyakarta.
- Khumaida, Nurul dan Handayani Tri. 2010. Induksi dan Proliferasi Kalus Embriogenik pada Beberapa Genotipe Kedelai. *J. Agron. Indonesia*. 38(1).
- Kosmiatin, Mia., Agus Purwito., Gustaff Adolf Wattimena dan Ika Mariska. 2014. Induksi Embriogenesis Somatik dari Jaringan Endosperma Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) cv Simadu. *J.Agron. Indonesia*. 42(1): 44-51.

- Kristantini., Taryono., Panjisakti Basunanda., dan Rudi H. Murti. 2014. Keragaman Genetik Kultivar Padi Beras Hitam Lokal Berdasarkan Penanda Mikrosatelit. *Jurnal Agrobiogen*. 10(2).
- Kurnia, Dwi Theresa dan Supriharti. 2013. Proline Sebagai Penanda Ketahanan Kekeringan dan Salinitas Pada Gandum. *Akselerasi Pembangunan Pertanian Berkelanjutan Menuju Kemandirian Pangan dan Energi*.
- Kusmana, Cecep dan Agus Hikmat. 2015. Keanekaragaman Hayati Flora Di Indonesia. *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan*. 5(2).
- Kusumayanti, Heny., Robertus Triaji Mahendrajaya dan Satrio Bagus Hanindito. 2018. Pangan Fungsional Dari Tanaman Lokal Indonesia. *METANA*. 12(1)
- Lestari, Endang G dan Rosa Yunita. 2008. Induksi Kalus dan Regenerasi Tunas Padi Var. Fatmawati. *Bul. Agron*. 36(2).
- Libin, A., P. J. H. King., K. H. Ong., J. K. Chubo and P. Sipeh. 2012. Callus induction and plant regeneration of Sarawak rice (*Oryza sativa* L.) variety Biris. *African Journal of Agricultural Research*. Vol. 7(30).
- Lizawati. 2012. Induksi Kalus Embriogenik dari Eksplan Tumas Apikal Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan Penggunaan 2,4-D dan TDZ.
- Mahalli, Imam Jalaludin dan As-Suyuti. 2007. **Tafsir Jalalain**. *Terjemahan Bahrun Abu-Bakar*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Maulidia, Zaiyin Rizky Ageng dan Wahyu Indra Duwi Fanata. 2019. Pengaruh Jenis Auksin Terhadap Pembentukan Kalus dan Daya Regenerasi Tiga Varietas Padi Lokal. *Berkala Ilmiah Penelitian*. 2(2).
- Morgan, Alexander A. And Edward Rubenstein. 2013. Proline: The Distribution, Frequency, Positioning, and Common Functional Roles of Proline and Polyprolyne Sequences in the Human Proteome. *PloS ONE*. 8(1).
- Moztafiz, Suraiya Binte and Alina Wagiran. 2018. Efficient callus Induction and Regeneration in Selected Indica Rice. *Agronomy*. 8(5).
- Mukarromah, Luluk., Tutik Nurhidayati dan Siti Nurfadilah. 2013. Pengaruh Sumber dan Konsentrasi Nitrogen terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Biji *Dendrobium laxiflorum* J.J Smith secara *In-vitro*. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2(1).

- Mustakim. 2017. Pendidikan Lingkungan Hidup Dan Implementasinya Dalam Pendidikan Islam (Analisis Surat Al-A'raf Ayat 56-58 Tafsir Al Misbah Karya M. Quraish Shihab). *Journal Of Islamic*.
- Nashrurrokhman, Muh., Puspas Restu Sayekti., Ayu Safitri., Yekti Asih Purwestri., Rarastoeti Pratiwi. 2019. Macronutrient And Mineral Contents Offive Local Black Rice (*Oryza sativa*) Cultivars in Indonesia. *Biodiversitas*. 20(12).
- Pawar, Bhausahab., Phrashant Kale., Jyoti Bahurupe., Ashok Jadhav., Anil Kale., Sharad Pawar. 2015. Proline and Glutamine Improve *In-vitro* Callus Induction and Subsequent Shooting in Rice. *Rice Science*. 22(6).
- Pierik, R. L. M. 1971. **Plant Tissue Culture as Motivation for The Symposium** dalam J. V. Braght *et al* [eds]. *Effect of Sterilisation on Components in Nutrien Media*. Wageningen: Vennman and Zonen.
- Prabaningrum, Hesti., Ary Susanto Nugroho., Fibria Kaswinarni. 2018. Keanekaragaman Tumbuhan yang Berpotensi Sebagai Bahan Pangan di Cagar Alam Cebugan Semarang. *Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*. 5(2): 26-33.
- Prasad, Balasubramaniam Jaya. Pazhaniyandi Subramania Sharavanan., Rengaraj Sivaraj. 2019. Health Benefits of Black Rice - A Review. *Grain and Oil Science and Technology*. 2(4) : 109-113.
- Pratiwi, Rarastoeti and Yekti Asih Purwestri. 2017. Black Rice as Functional Food in Indonesia. *Functional Foods in Health and Disease*. 7(3).
- Purnamaningsih, Ragapadmi. 2006. Induksi Kalus dan Optimasi Regenerasi Empat Var. Padi Melalui Kultur *In-vitro*. *Jurnal AgroBiogen*. 2(2): 74-80.
- Purwanto, E., W Hidayati and Nandariyah. 2018. The yield and quality of black rice varieties in different altitude. *IOP Conf. Series: Earth and Enviromental Science*. 142.
- Qamar, Rukhsana., Sibgha Noreen., Muhammad Safdar., Masroor Ellahi Babar. 2019. Influence of Exogenous Application of Proline On Some Physio Biochemical Parameters of Maize (*Zea mays* L.) Under Drought Stress. *International Journal of Scientific and Research Publication*. 9(8).
- Radziah, Che C. M. Z., Arshad Naji Alhasnawi., Ahsan A. Kadhimi., Anizan Isahak., Azhar Mohamad., Mehdi Farshad Ashraf., Febri Doni and Wan Mohtar Wan Yusoff. 2016. Develoment of a Technique for Callus Induction and Plant

Regeneration in *Oryza sativa* L. Var. MRQ74 and MR269. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 13(3).

Rahayu, Bekti., Solichatun., Endang Anggarwulan. 2003. Pengaruh Asam 2,4D Terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Favonoid Kultur Kalus *Acalypha indica*. *Biofarmasi*. 1(1).

Rahmi, Atika Fathur., Agus Purwito., Ali Husni dan Diny Dinarti. 2017. Embriogenesis dan Desikasi Embrio Somatik Jeruk Keprok Batu 55 (*Citrus reticulata* Blanco.) untuk Meningkatkan Frekuensi Perkecambahan. *J. Hort. Indonesia*. 8(2): 79-87.

Rattana, K., Theerakulpisut and S. Bunnag. 2012. The Effect of Plant Growth Regulators and Organic Supplements on Callus Induction and Plant Regeneration in Rice (*Oryza sativa* L.). *Asian Journal of Plant Sciences*. 11(4): 182-189.

Royani, Ida., Zulkifli., Prapti Sedijani. 2015. Induksi Kalus Kacang Tanah (*Arachis hypogea*) Var. Kelinci Dengan perlakuan 2,4-D dan BAP. *Journal Penelitian Pendidikan IPA*. 1(2).

Rukmana, Rizal Maarif., Nyoman Puniawati Soesilo., Rumiya., Rarastoeti Pratiwi. 2016. The Effect of Ethanolic Extract of Black and White Rice Bran (*Oryza sativa* L.) on Cancer Cells. *Indonesia Journal of Biotechnology*. 21(1).

Rukmi, Veronica Krestiani. 2013. Kajian Konsentrasi Naa Dan Kinetin Terhadap Pertumbuhan Kalus dari Kotiledon Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Ness.) Secara *In-vitro*. *Jurnal Fakultas Pertanian UMK*. 6(1): 16-20.

Rusdianto dan Ari Andrianto. 2012. Induksi Kalus Embriogenik Pada Wortel (*Daucus carota* L.) Menggunakan 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Jurnal Bionature*. 13(2).

Sabila, Nabila Dienna., Syafrizal dan Dwi Susanto. 2016. Studi Jenis Serbuk Sari Yang Terdapat Pada Saluran Pernapasan Atas Penderita Ispa Di Rsud Dr. Kanujoso Djati Wibowo Balikpapan. *Biosprospek*. 11(1): 23-32.

Saepudin, Adam., Nurul Khumaida., Didy Sopandi., dan Sintho Wahyuning Ardie. 2016. Induksi dan Proliferasi Embriogenesis Somatik *In-vitro* Pada Lima Genotip Kedelai. *J. Agron. Indonesia*. 44(3) : 261-270.

- Saika, Hiroaki., and Seichii Toki. 2010. Mature Seed-derived Callus of The Model Indica Rice Variety Kasalath is Highly Competent in Agrobacterium-mediated Transformation. *Plant cell Rep.* Vol. 29(12).
- Sartika, Dewi dan Djoko Santosa. 2012. Pengaruh Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (2,4-D dan Kinetin) Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Metabolit Sekunder pada Kalus *Phaleria macrocarpa*. *Jurnal Litbang KemKes.* 5(1).
- Satria, Teguh M., Neliyati dan Jasminarni. 2019. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D (Dichlorophenoxyacetid- Acid) Dan Kinetin Terhadap Induksi Kalus Dari Eksplan Daun Kayu Manis (*Cinnamomun Burmanii*). *Jurnal Agroecotania.* 2 (1).
- Shahsavari, E. 2011. Impact of Tryptophan and Glutamine on The Tissue Culture of Upland Rice. *Plant Soil Environ.* 57 (1).
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Vol.10*. Jakarta: Lentera Hati
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Vol.3*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shinta dan Eko Budi Minarno. 2018. Karakter Fenotipik Tanaman Padi Beras Hitam (*Oryza sativa* L.) Var. Wojalaka Hasil Induksi Kolkisin. *Seminar Nasional Sains dan Teknologi Terapan.*
- Shinta, Serafinah Indriyani dan Endang Arisosilaningsih. 2014. Morphological Variation of Six Pigmented Rice Field in Sengguruh Villag, Kepanjen District, Malang Regency. *The Journal of Tropical Life Science.* 4(2): 149-150.
- Simbolon, Dian., Revandy I M Damanik., Rosmayanti. 2017. Karakteristik kalus beberapa varietas Kedelai dengan pemberian 2,4D dan Kinetin Pada Kondisi Hipoxia secara In-vitro. *Agroekoteknologi.* 5 (4).
- Singh, Shilpy., Arun Kumar., Vivek Rana., Ashwini Kumar and V Rakesh Sharma. 2018. *In-vitro* callus induction and plant regeneration in basmati rice (*Oryza Sativa* L.) varieties. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.*
- Suhendra, Ahmad. 2013. Tinjauan Hadits Nabi Terhadap Upaya Reboisasi Pertanian. *ADDIN.* 7(2).
- Susanto, Febri Adi., Putri Wijayanti., Anisa Nazera Fauzia., Resta Dewi Komalasari., Tri Rini Nungtyas., Yekti Asih Purwesti. 2020. Establishment of a Plant Tissue Culture System and Genetic Transformation for Agronomic Improvement of

- Indonesian Black Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC).
- Tambunan Ika Roostika dan Ika Mariska. 2003. Pemanfaatan Teknik Kriopreservasi dalam Penyimpanan Plasma Nutfah Tanaman. *Buletin Plasma Nutfah*. 9 (2).
- Tanjung, Sopa Putri., Revandy I.M. Damanik dan Luthfi Aziz Mahmud Siregar. 2017. Potensi Terbentuknya Kalus Embriogenik pada Beberapa Var. Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) Toleran terhadap Kondisi Hipoksia secara *In-vitro*. *Jurnal Agroteknologi FP USU*. 5(3): 546-558.
- Thadavong, S., P. Sripichitt, W. Wongyai and P. Jompuk. 2002. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of glutinous rice (*Oryza sativa* L.) cultivar TDK1. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 36: 334-344.
- Thanuja, B and Parimavalli P. 2019. Role of Black Rice in Health and Diseases. *International Journal of Health Sciences and Research*. 8(2).
- Towill, L.E. 2005. Germplasm preservation. p. 277-284. In R.N. Trigiano and D.J. Gray (eds.) *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. Boca Raton, USA.
- Umar, Ruliana., Yossi Wibisono and Netty Ermawati. 2017. Effect of Medium Compositions on The Growth of Rice (*Oryza sativa* L. Cv. Ciherang) Callus. *Towards The Extended Use Of Basic Science For Enhancing Health, Environment, Energy And Biotechnology*.
- Upadhyaya, Gouraga., Moutushi Sen., Amitava Roy. 2015. In Vitro Callus Induction and Plant Regeneration of Rice (*Oryza sativa* L.) var. Sita, Rupali, and swarna Masuri. *Pelagia Research Library*. 5(5).
- Utama, M. Zulman Harja. 2019. **Budidaya Padi Hitam dan Merah pada Lahan Marginal dengan sistem SBSU**. Yogyakarta: penerbit ANDI.
- Verslues, Paul E and Sandeep Sharma. 2010. Proline Metabolism and Implications for Plant-Environment Interaction. *The Arabidopsis Book*. 8.
- Wahyuni, Amalina., Benni Satria., Aprizal Satrial. 2020. Induksi Kalus Gaharu dengan NAA dan BAP secara *In-Vitro*. *Jurnal Penelitian Agrosains*. 22(1).
- Wagiran, Alina., Ismanizan Ismail., Che Radziah and Ruslan Abdullah. 2008. Improvement of plant Regeneration from Embryogenic Suspension Cell Culture of Japonica Rice. *Journal of Biological Sciences*. 8(3).

- Waryastuti, Defi Eka., Lilik Setyobudi dan Tatik Wardiyati. 2017. Pengaruh Tingkat Konsentrasi 2,4-D Dan BAP Pada Media MS Terhadap Induksi Kalus Embriogenik Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Jurnal Produksi Tanaman*. 5(1).
- Wetter, L. R. dan Constabel, F. 1991. **Metode Kultur Jaringan Tanaman**. Bandung: ITB Press.
- Wijawati, Nur., Noor Aini Habibah., Fajar Musafa. 2019. Pertumbuhan Kalus Rejasa dari Eksplan Tangkai Daun pada Kondisi Gelap. *Life Science*. 8 (1).
- Yelnititis. 2012. Pembentukan Kalus Remah dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*. 6(3) : 181-194.
- Yoshida, Shoichi. 1981. **Fundamental Of Rice Crop Science**. Philippines : The International Rice Research Institute.
- Zulkarnain. 2018. **Kultur Jaringan Tanaman solusi perbanyak tanaman budidaya**. Jakarta : Bumi Aksara.

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. DATA HASIL PENGAMATAN

1. HARI MUNCUL KALUS

NO	Perlakuan		Ulangan								Jumlah	Rata-rata
	2,4-D mg/L	Prolin mg/L	1	2	3	4	5	6	7	8		
1.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.		200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.		300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.	2	0	9	9	8	10	9	10	8	10	73	9,125
6.		100	9	9	7	8	8	6	10	9	66	8,25
7.		200	6	7	6	8	9	8	8	7	59	7,375
8.		300	7	8	10	6	7	6	9	7	60	7,5
9.	4	0	6	6	6	6	7	7	7	5	50	6,25
10.		100	7	6	5	5	7	6	5	6	47	5,875
11.		200	5	6	6	6	6	5	5	5	44	5,5
12.		300	5	6	6	5	6	7	6	6	47	5,875
13.	8	0	5	4	4	5	5	6	4	5	38	4,75
14.		100	5	5	4	5	5	4	7	5	40	5
15.		200	6	4	4	7	6	6	4	4	41	5,125
16.		300	5	5	5	6	5	5	5	6	42	5,25

2. BERAT BASAH KALUS

NO	Perlakuan		Ulangan								Jumlah	Rata-rata
	2,4-D mg/L	Prolin mg/L	1	2	3	4	5	6	7	8		
1.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.		200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.		300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.	2	0	0	66	0	48	0	0	0	62	176	22
6.		100	0	0	47	0	59	49	0	0	155	19,375
7.		200	61	79	0	0	0	83	76	0	299	37,375

8.		300	68	0	0	63	0	75	0	0	206	25,75
9.	4	0	0	110	70	74	0	0	81	0	335	41,875
10.		100	105	124	63	74	0	0	80	0	446	55,75
11.		200	70	0	0	84	110	0	0	108	372	46,5
12.		300	68	0	58	87	80	0	91	0	384	48
13.	8	0	92	198	70	0	75	0	79	89	603	75,375
14.		100	75	103	117	0	0	79	0	80	459	57,375
15.		200	0	0	117	97	78	0	75	106	473	59,125
16.		300	73	64	0	120	99	85	96	0	537	67,125

3. Persentase pembentukan kalus

NO	Perlakuan		Ulangan								Jumlah	Rata-rata
	2,4-D mg/L	Prolin mg/L	1	2	3	4	5	6	7	8		
1.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.		200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.		300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.	2	0	0	100	0	100	0	0	0	100	300	37,5
6.		100	0	0	100	0	100	100	0	0	300	37,5
7.		200	100	100	0	0	0	100	100	0	400	50
8.		300	100	0	0	100	0	100	0	0	300	37,5
9.	4	0	0	100	100	100	0	0	100	0	400	50
10.		100	100	100	100	100	0	0	100	0	500	62,5
11.		200	100	0	0	100	100	0	0	100	400	50
12.		300	100	0	100	100	100	0	100	0	500	62,5
13.	8	0	100	100	100	0	100	0	100	100	600	75
14.		100	100	100	100	0	100	0	100	500	62,5	
15.		200	0	0	100	100	100	0	100	100	500	62,5
16.		300	100	100	0	100	100	100	100	0	600	75

LAMPIRAN 2. HASIL ANALISIS VARIANSI (ANOVA) DAN UJI LANJUT DMRT 5%

1. HARI MUNCUL KALUS

a. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual	
N		96	
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,0000000	
	Std. Deviation	1,12700601	
Most Extreme Differences	Absolute	,071	
	Positive	,071	
	Negative	-,033	
Test Statistic		,071	
Asymp. Sig. (2-tailed)		,200 ^{c,d}	
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.	,684 ^e	
	99% Confidence Interval	Lower Bound	,672
		Upper Bound	,696

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

e. Based on 10000 sampled tables with starting seed 926214481.

b. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Hari Muncul Kalus

F	df1	df2	Sig.
1,587	11	84	,118

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + hormon + asamamino + hormon * asamamino

c. Uji Anova

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Hari Muncul Kalus

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	180,281 ^a	11	16,389	13,854	,000
Intercept	3863,344	1	3863,344	3265,619	,000
Hormon	161,063	2	80,531	68,072	,000
Asamamino	7,781	3	2,594	2,192	,095
hormon * asamamino	11,438	6	1,906	1,611	,154
Error	99,375	84	1,183		
Total	4143,000	96			
Corrected Total	279,656	95			

a. R Squared = ,645 (Adjusted R Squared = ,598)

d. Uji Lanjut DMRT 5%

Hari Muncul Kalus 2,4-D

Duncan ^{a,b}	2,4D	N	Subset		
			1	2	3
	8 mg/L	32	5,0000		
	4 mg/L	32		5,9375	
	2 mg/L	32			8,0938
	Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1,183.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 32,000.

b. Alpha = ,05.

2. BERAT BASAH KALUS

a. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual	
N		96	
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,0000000	
	Std. Deviation	8,89261718	
Most Extreme Differences	Absolute	,093	
	Positive	,093	
	Negative	-,059	
Test Statistic		,093	
Asymp. Sig. (2-tailed)		,039 ^c	
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.	,354 ^d	
	99% Confidence Interval	Lower Bound	,342
		Upper Bound	,366

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. Based on 10000 sampled tables with starting seed 299883525.

b. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Berat Basah Kalus

F	df1	df2	Sig.
1,425	11	84	,177

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + hormon + asamamino +
hormon * asamamino

c. Uji ANOVA

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Berat Basah Kalus

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	27963,115 ^a	11	2542,101	61,874	,000
Intercept	205812,760	1	205812,760	5009,460	,000
Hormon	24013,771	2	12006,885	292,246	,000
Asamamino	164,781	3	54,927	1,337	,268
hormon * asamamino	3784,563	6	630,760	15,353	,000
Error	3451,125	84	41,085		
Total	237227,000	96			
Corrected Total	31414,240	95			

a. R Squared = ,890 (Adjusted R Squared = ,876)

d. Uji Duncan Berat Basah Kalus Perlakuan 2,4D Berat Basah Kalus

2,4D	N	Subset		
		1	2	3
2 mg/L	32	26,1250		
4 mg/L	32		48,0313	
8 mg/L	32			64,7500
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 41,085.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 32,000.

b. Alpha = ,05.

e. Uji lanjut Kombinasi (Duncan)

Berat Basah Kalus

Duncan^a

Kombinasi	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
D1P1	8	19,3750					
D1P0	8	22,0000					
D1P3	8	25,7500					
D1P2	8		37,3750				
D2P0	8		41,8750	41,8750			
D2P2	8			46,5000			
D2P3	8			48,0000			
D2P1	8				55,7500		
D3P1	8				57,3750		
D3P2	8				59,1250		
D3P3	8					67,1250	
D3P0	8						75,3750
Sig.		,063	,164	,074	,326	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000.

3. PERSENTASE PEMBENTUKAN KALUS

a. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual	
N		96	
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	,0000000	
	Std. Deviation	7,51845682	
Most Extreme Differences	Absolute	,053	
	Positive	,053	
	Negative	-,042	
Test Statistic		,053	
Asymp. Sig. (2-tailed)		,200 ^{c,d}	
Monte Carlo Sig. (2-tailed)	Sig.	,934 ^e	
	99% Confidence Interval	Lower Bound	,927
		Upper Bound	,940

- a. Test distribution is Normal.
 b. Calculated from data.
 c. Lilliefors Significance Correction.
 d. This is a lower bound of the true significance.
 e. Based on 10000 sampled tables with starting seed 2000000.

b. Uji Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error

Variances^a

Dependent Variable: persentase pembentukan kalus

F	df1	df2	Sig.
,813	11	84	,627

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

- a. Design: Intercept + hormon + asamamino + hormon * asamamino

c. Uji Anova

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: persentase pembentukan kalus

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	16145,833 ^a	11	1467,803	59,621	,000
Intercept	292604,167	1	292604,167	11885,276	,000
Hormon	12708,333	2	6354,167	258,100	,000
Asamamino	312,500	3	104,167	4,231	,008
hormon * asamamino	3125,000	6	520,833	21,156	,000
Error	2068,000	84	24,619		
Total	310818,000	96			
Corrected Total	18213,833	95			

a. R Squared = ,886 (Adjusted R Squared = ,872)

d. Uji Lanjut DMRT 5%

persentase pembentukan kalus 2,4-D

Duncan ^{a,b}	2,4D	N	Subset		
			1	2	3
	2 mg/L	32	40,6250		
	4 mg/L	32		56,2500	
	8 mg/L	32			68,7500
	Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 24,619.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 32,000.

b. Alpha = ,05.

persentase pembentukan kalus prolin

Duncan^{a,b}

Prolin	N	Subset	
		1	2
100 mg/L	24	54,1667	
0 mg/L	24	54,1667	
200 mg/L	24	54,1667	
300 mg/L	24		58,3333
Sig.		1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 24,619.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

b. Alpha = ,05.

**f. Uji Lanjut Kombinasi
persentase pembentukan kalus**

Duncan^a

Kombinasi	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
D1P0	8	37,5000			
D1P1	8	37,5000			
D1P3	8	37,5000			
D1P2	8		50,0000		
D2P0	8		50,0000		
D2P2	8		50,0000		
D2P1	8			62,5000	
D2P3	8			62,5000	
D3P1	8			62,5000	
D3P2	8			62,5000	
D3P0	8				75,0000
D3P3	8				75,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

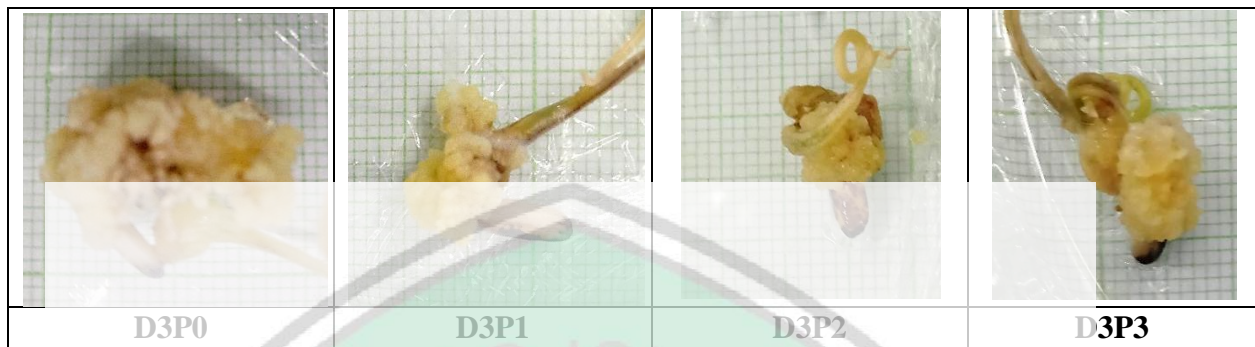
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000.

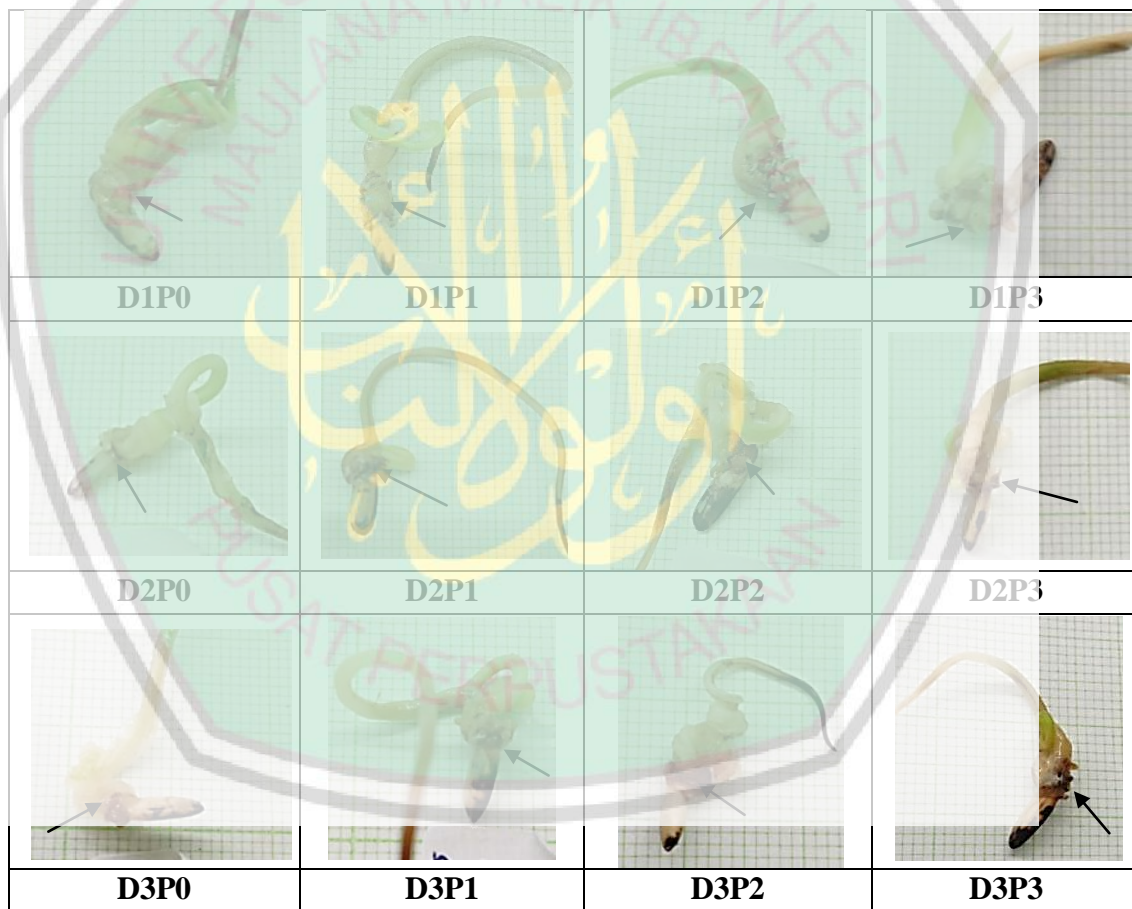
LAMPIRAN 3. GAMBAR HASIL PENGAMATAN MORFOLOGI DAN ANATOMI

1. MORFOLOGI KALUS





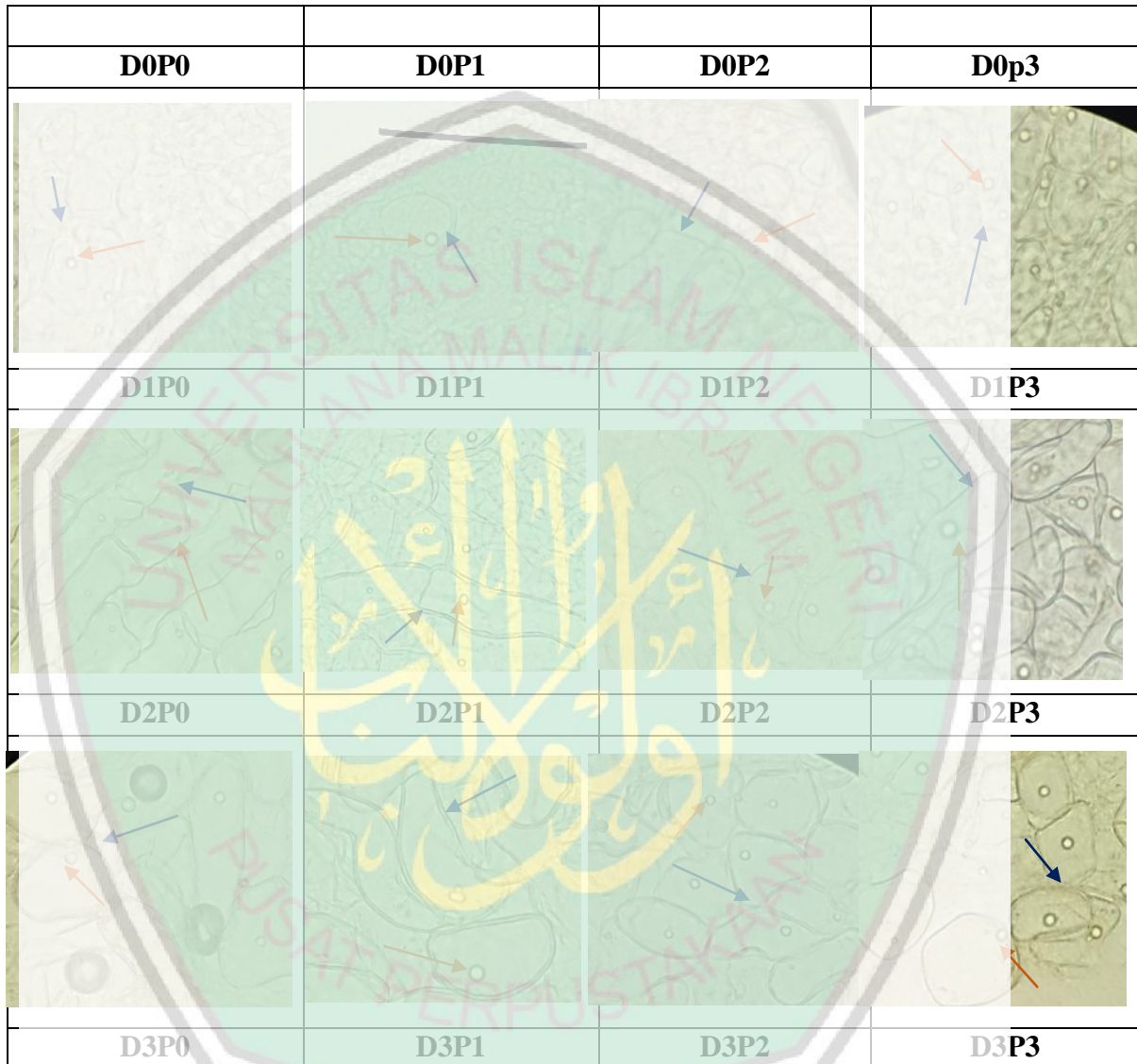
2. MORFOLOGI KALUS BROWNING



Keterangan: Panah hitam menunjukkan kalus browning

3. ANATOMI

Anatomi kalus dengan perbesaran 1000x



Keterangan panah orange: inti sel, panah biru: dinding sel

Keterangan

D0P0: MS0	D1P0: 2,4D 2 mg/L	D2P0: 2,4D 4 mg/L	D3P0: 2,4D 8 mg/L
D0P1: Pro 100 mg/L	D1P1: 2,4D 2 mg/L + Pro 100 mg/L	D2P1: 2,4D 4 mg/L + Pro 100 mg/L	D3P1: 2,4D 8 mg/L + Pro 100 mg/L
D0P2: Pro 200 mg/L	D1P2: 2,4D 2 mg/L + Pro 200 mg/L	D2P2: 2,4D 4 mg/L + Pro 200 mg/L	D3P2: 2,4D 8 mg/L + Pro 200 mg/L
D0P3: Pro 300 mg/L	D1P3: 2,4D 2 mg/L + Pro 300 mg/L	D2P3: 2,4D 4 mg/L + Pro 300 mg/L	D3P3: 2,4D 8 mg/L + Pro 300 mg/L

LAMPIRAN 4. PERHITUNGAN KONSENTRASI

Perhitungan larutan stok ZPT 2,4-D

Perhitungan konsentrasi pemberian Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) 2,4-D:

Dengan stok larutan 2,4-D 100 ppm.

a. Perhitungan konsentrasi ZPT 2,4-D 2 mg/L:

$$\begin{aligned} M1.V1 &= M2.V2 \\ 100.V1 &= 2 \text{ mg/L} \cdot 100 \text{ ml} \\ V1 &= 200/100 = 2 \text{ ml.} \end{aligned}$$

b. Perhitungan konsentrasi ZPT 2,4-D 4 mg/L:

$$\begin{aligned} M1.V1 &= M2.V2 \\ 100.V1 &= 4 \text{ mg/L} \cdot 100 \text{ ml} \\ V1 &= 400/100 = 4 \text{ ml.} \end{aligned}$$

c. Perhitungan konsentrasi ZPT 2,4-D 8 mg/L:

$$\begin{aligned} M1.V1 &= M2.V2 \\ 100.V1 &= 8 \text{ mg/L} \cdot 100 \text{ ml} \\ V1 &= 800/100 = 8 \text{ ml.} \end{aligned}$$

Perhitungan konsentrasi pemberian prolin dalam media:

Dengan stok larutan prolin 2500 ppm.

a. Perhitungan konsentrasi prolin 100 mg/L:

$$\begin{aligned} M1.V1 &= M2.V2 \\ 2500.V1 &= 100 \text{ mg/L} \cdot 100 \text{ ml} \\ V1 &= 10000/2500 = 4 \text{ ml.} \end{aligned}$$

b. Perhitungan konsentrasi prolin 200 mg/L:

$$\begin{aligned} M1.V1 &= M2.V2 \\ 2500.V1 &= 200 \text{ mg/L} \cdot 100 \text{ ml} \\ V1 &= 20000/2500 = 8 \text{ ml.} \end{aligned}$$

c. Perhitungan konsentrasi prolin 300 mg/L:

$$\begin{aligned} M1.V1 &= M2.V2 \\ 2500.V1 &= 300 \text{ mg/L} \cdot 100 \text{ ml} \\ V1 &= 30000/2500 = 12 \text{ ml.} \end{aligned}$$

LAMPIRAN 5. MEDIA MURASHIGE AND SKOOG






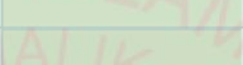


















Lampiran 1 Komposisi media dasar Murashige-Skoog

Unsur Hara Makro	Bahan Kimia (mg/L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Unsur Hara Mikro	Bahan Kimia (mg/L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	22.3
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	8.6
KI	6.2
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.83
MnSO ₄ 4H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.3
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8

Lampiran 2 Komposisi vitamin Murashige-Skoog (MS)





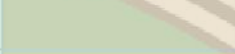

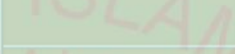

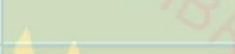








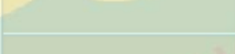






Vitamin	Bahan Kimia (mg/L ⁻¹)
Glycine	0.2
Myoinositol	100
Nicotinic Acid	0.05
Pyridoxine HCl (B6)	0.05
Thiamine HCl (B1)	0,01

Lampiran 6. Tabel color chart Pantone TPX

61TPX	11-0510TPX		Afterglow
61TPX	11-0617TPX		Transparent Yellow
61TPX	12-0715TPX		Double Cream
61TPX	13-0822TPX		Sunlight
61TPX	13-0922TPX		Straw
61TPX	14-0935TPX		Jojoba
61TPX	14-1031TPX		Rattan
62TPX	12-0619TPX		Dusty Yellow
62TPX	13-0613TPX		Chino Green
62TPX	13-0715TPX		Sea Mist
62TPX	13-0915TPX		Reed Yellow
62TPX	14-0925TPX		Parsnip
62TPX	14-1110TPX		Boulder
62TPX	15-0719TPX		Silver Fern
63TPX	12-0626TPX		Lemon Grass
63TPX	13-0624TPX		Golden Mist
63TPX	13-0725TPX		Raffia
63TPX	14-0740TPX		Bamboo
63TPX	14-0826TPX		Pampas
63TPX	15-0643TPX		Cress Green
63TPX	16-0847TPX		Olive Oil
64TPX	13-0640TPX		Acacia
64TPX	14-0626TPX		Dried Moss
64TPX	14-0647TPX		Celery

64TPX	15-0743TPX		Oil Yellow
64TPX	16-0742TPX		Green Sulphur
64TPX	17-0839TPX		Golden Palm
65TPX	14-0721TPX		Hemp
65TPX	14-1025TPX		Cocoon
65TPX	15-0836TPX		Golden Green
65TPX	15-0730TPX		Southern Moss
65TPX	15-0732TPX		Olivenite
65TPX	16-0730TPX		Antique Gold
65TPX	16-0737TPX		Burnished Gold
66TPX	11-0616TPX		Pastel Yellow
66TPX	11-0618TPX		Wax Yellow
66TPX	11-0620TPX		Elfin Yellow
66TPX	11-0710TPX		Tender Yellow
66TPX	12-0721TPX		Lemonade
66TPX	12-0722TPX		French Vanilla
66TPX	12-0740TPX		Limelight
67TPX	12-0833TPX		Canary Yellow
67TPX	12-0738TPX		Yellow Cream
67TPX	13-0832TPX		Endive
67TPX	13-0720TPX		Custard
67TPX	13-0739TPX		Cream Gold
67TPX	14-0836TPX		Muted Lime
67TPX	14-0827TPX		Dusky Citron

68TPX	12-0752TPX		Buttercup
68TPX	13-0648TPX		Green Sheen
68TPX	13-0746TPX		Maize
68TPX	13-0752TPX		Lemon
68TPX	14-0756TPX		Empire Yellow
69TPX	13-0758TPX		Dandelion
69TPX	13-0850TPX		Aspen Gold
69TPX	13-0858TPX		Vibrant Yellow
69TPX	13-0859TPX		Lemon Chrome
69TPX	14-0760TPX		Cyber Yellow
69TPX	14-0848TPX		Mimosa
69TPX	14-0852TPX		Freesia
70TPX	12-0720TPX		Mellow Yellow
70TPX	12-0727TPX		Sunshine
70TPX	12-0736TPX		Lemon Drop
70TPX	12-0824TPX		Pale Banana
70TPX	12-0825TPX		Popcorn
70TPX	13-0755TPX		Primrose Yellow
70TPX	14-0754TPX		Super Lemon
71TPX	14-0837TPX		Misted Yellow
71TPX	15-0751TPX		Lemon Curry
71TPX	15-0850TPX		Ceylon Yellow
71TPX	15-0942TPX		Sauterne
71TPX	16-0946TPX		Honey

71TPX	16-0954TPX		Arrowwood
72TPX	15-0948TPX		Chinese Yellow
72TPX	15-0953TPX		Golden Yellow
72TPX	15-1132TPX		Fall Leaf
72TPX	16-0948TPX		Harvest Gold
72TPX	16-0952TPX		Nugget Gold
72TPX	16-1126TPX		Antelope
72TPX	18-1133TPX		Mustard Gold
73TPX	14-1036TPX		Ochre
73TPX	15-1046TPX		Mineral Yellow
73TPX	15-1142TPX		Honey Gold
73TPX	16-0945TPX		Tinsel
73TPX	16-0947TPX		Bright Gold
73TPX	16-0950TPX		Narcissus
73TPX	16-1139TPX		Amber Gold
74TPX	14-1113TPX		Marzipan
74TPX	16-0925TPX		Curry
74TPX	16-1326TPX		Prairie Sand
74TPX	17-1047TPX		Honey Mustard
74TPX	17-1129TPX		Wood Thrush
74TPX	18-0937TPX		Bronze Brown
74TPX	18-0940TPX		Golden Brown
75TPX	17-0942TPX		Medal Bronze
75TPX	17-1036TPX		Bistre



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Safira Makhrusa Zulda
NIM : 16620063
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Genap TA 2019/2020
Pembimbing : Shinta, M.Si
Judul Skripsi : Induksi Kalus Padi Hitam (*Oryza sativa* L.) Varietas Wojalaka Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxy Acetid Acid (2,4D) dan Asam Amino Prolin Secara *In-vitro*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	23/03/2020	Judul	<i>h</i>
2.	7/04/2020	BAB I	<i>h</i>
3.	22/04/2020	BAB I	<i>h</i>
4.	13/04/2020	BAB I dan BAB II	<i>h</i>
5.	28/04/2020	BAB I, BAB II dan BAB III	<i>h</i>
6.	6/05/2020	BAB I, BAB II dan BAB III Acc	<i>h</i>
7.	30/10/2020	BAB IV, V	<i>h</i>
8.	30/10/2020	Acc skripsi	<i>h</i>

Pembimbing Skripsi,

Shinta, M.Si
NIP. 19880110201608012064

Malang, 30 Oktober 2020
Ketua Program Studi,



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 1974101820033122002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Safira Makhrusa Zulda
NIM : 16620063
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Genap TA 2019/2020
Pembimbing : Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
Judul Skripsi : Induksi Kalus Padi Hitam (*Oryza sativa* L.) Varietas Wojalaka Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxy Acetid Acid (2,4D) dan Asam Amino Prolin Secara *In-vitro*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	15/09/2020	Integrasi BAB I dan BAB II	
2.	15/09/2020	Acc Integrasi BAB I dan BAB II	
3.	02/11/2020	Integrasi BAB IV	
4.	02/11/2020	Acc Integrasi BAB IV	

Pembimbing Skripsi,

Dr. H. Ahmad Barizi, M.A
NIP. 197312121998031008

Malang, 5 November 2020
Ketua Program Studi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 1974101820033122002