

**MULTIPLIKASI SUBKULTUR TUNAS DELIMA HITAM
(*Punica granatum* L.) MENGGUNAKAN ASAM AMINO GLUTAMIN
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :
DENIS AMALIA
NIM. 16620061



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

**MULTIPLIKASI SUBKULTUR TUNAS DELIMA HITAM
(*Punica granatum L.*) MENGGUNAKAN ASAM AMINO GLUTAMIN
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :
DENIS AMALIA
NIM. 16620061



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

**MULTIPLIKASI SUBKULTUR TUNAS DELIMA HITAM
(*Punica granatum* L.) MENGGUNAKAN ASAM AMINO GLUTAMIN
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :
DENIS AMALIA
NIM. 16620061

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)

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020

HALAMAN PERSETUJUAN

MUPLIKASI SUBKULTUR TUNAS DELIMA HITAM
(*Punica granatum L.*) MENGGUNAKAN ASAM AMINO GLUTAMIN
SECARA *IN VITRO*

SKRIPSI

Oleh :

DENIS AMALIA


NIM. 16620061


Telah Diperiksa dan Disetujui Untuk Diuji

Tanggal : 18 Desember 2020

Pembimbing I.


Pembimbing II.


Suyono, M.P.
NIP. 19710622 200312 1 002


Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I
NIPT. 20142011409

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi


Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PENGESAHAN

MUPLIKASI SUBKULTUR TUNAS DELIMA HITAM
(*Punica granatum L.*) MENGGUNAKAN ASAM AMINO GLUTAMIN
SECARA *IN VITRO*

SKRIPSI

Oleh :
DENIS AMALIA
NIM. 16620061

Telah Dipertahankan di Depan Penguji Skripsi dan Dinyatakan Diterima Sebagai
Salah Satu Persyaratan Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal : 18 Desember 2020

Penguji Utama : Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

(.....)

Ketua Penguji : Ruri Siti Resmisari, M.Si
NIDT. 19790123 20160801 2 063

(.....)



Sekretaris Penguji : Suyono, M.P
NIP. 19710622 200312 1 002

(.....)

Anggota Penguji : Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I
NIPT. 20142011409

(.....)

Mengetahui dan Mengesahkan
Ketua Program Studi Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Denis Amalia
 NIM : 16620061
 Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Biologi
 Judul Penelitian : Multiplikasi Subkultur Tunas Delima Hitam (*Punica granatum L.*) menggunakan Asam Amino Glutamin secara *In Vitro*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa hasil penelitian ini tidak terdapat unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali secara tertulis dikutip dalam naskah dan disebutkan dalam sumber kutipan atau daftar pustaka. Apabila pernyataan hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur penjiplakan, maka saya bersedia untuk bertanggungjawab serta diproses sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Malang, 10 Desember 2020

Yang Membuat Pernyataan,



6000
 DENIS AMALIA

Denis Amalia
 NIM.16620061

MOTTO

**“AKU HARUS SEGERA WISUDA,
BIAR BAPAK IBU BAHAGIA”**

“HIDUP PASTI BANYAK UJIAN, KAMU HARUS BERJUANG”



HALAMAN PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah, sujud syukur saya panjatkan kepada Allah *subhanahuwata'ala* Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang yang senantiasa melimpahkan rahmat serta hidayahNya sehingga saya dapat menuntut ilmu yang semoga barokah ini. Sholawat serta salam tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW.

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

Bapak Winarto dan Ibu Wiwik Monarwiati Tercinta

Beliau berdua malaikat tanpa sayap yang telah Allah *subhanahuwata'ala* kirimkan kepada saya yang tanpa lelah mendidik dan membesarkan saya dengan penuh kasih sayang dan kesabaran. Terimakasih saya ucapkan kepada Bapak dan Ibu atas dukungan doa, semangat, motivasi dan pengorbanan yang tidak terhitung nilainya. Serta juga adikku Tito Dimas Mahendra yang selalu membuat semangat saya tumbuh untuk menjadi kakak yang dapat dijadikan panutan.

Temanku

Terimakasih sebanyak-banyaknya kepada teman-temanku Dwi Candra Nursita, Selfia Felinda, Itsnatul Azizah, Olga Yolanda Della Rizka, Dyah Putri Purnama Sari, Nur Jazilatul Chikmah, Radhwa Hayyu Aufa Haq, Nurillah Vicamilia, Afif Qiri Putri, M. Meta Rizky Alhamdi dan Rizky Mujahidin Mulyono yang telah menjadi keluarga kecil yang selalu ada serta selalu memberikan semangat maupun motivasi dalam setiap langkah menimba ilmu sampai skripsi ini terselesaikan.

Delima Hitam Squad

Terimakasih juga saya ucapkan kepada teman-teman sepenelitian kultur jaringan tumbuhan Khana Linalatil Fadzilah, Intan Popilia dan Mita Devi Rohmah yang tidak lelah membantu, memberi saran serta motivasi kepada saya sehingga cita-cita saya dapat saya raih.

Serta semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu yang telah membantu sampai terselesaikannya skripsi ini. Semoga Allah *subhanahuwata'ala* melimpahkan rahmat dan barokahNya kepada kita semua.

Aamiin Yaa Rabbal Alamin..

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



**Multiplikasi Subkultur Tunas Delima Hitam (*Punica granatum L.*)
Menggunakan Asam Amino Glutamin Secara *In Vitro***

Denis Amalia, Suyono dan M. Mukhlis Fahrudin

ABSTRAK

Delima merupakan salah satu tanaman istimewa karena telah disebutkan dalam ayat Al-qur'an. Delima hitam memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, namun mulai jarang ditemui karena memiliki kendala dalam budidaya secara konvensional. Multiplikasi merupakan suatu tahapan pada kultur *in vitro* yang bertujuan untuk mendapatkan bibit dalam jumlah yang banyak. Glutamin merupakan salah satu faktor pendukung keberhasilan dalam kultur *in vitro* pada beberapa tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi glutamin terhadap multiplikasi tunas hasil subkultur dari delima hitam (*Punica granatum L.*). Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 6 kali ulangan. Dalam penelitian ini terdapat satu faktor perlakuan yaitu glutamin dengan konsentrasi 0 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l dan 50 mg/l. Hasil pengamatan dianalisis menggunakan ANAVA yang kemudian diuji lanjut dengan uji DMRT 5% apabila terdapat pengaruh nyata pada variabel pengamatan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian glutamin berpengaruh nyata terhadap semua variabel kuantitatif pada multiplikasi tunas delima hitam. Konsentrasi glutamin 20 mg/l efektif untuk semua variabel pengamatan yaitu, hari muncul tunas (HMT) yaitu sebesar 14,6 HST, jumlah tunas yaitu 4,8 tunas, tinggi tunas yaitu 3,0 mm dan persentase tumbuh tunas yaitu 88,9%. Hasil pengamatan morfologi juga menunjukkan penggunaan glutamin konsentrasi 10-30 mg/l mampu membentuk tunas yang berwarna hijau muda dengan daun hijau tua.

Kata kunci : *Punica granatum*, multiplikasi tunas, glutamin

In Vitro Multiplication of Black Pomegranate (*Punica granatum* L.) Shoots Subculture Using The Amino Acide Glutamine

Denis Amalia, Suyono and M. Mukhlis Fahrudin

ABSTRACT

Pomegranate is one of the special plants because it has been mentioned in the verses of the Al-quran. Black pomegranate is a plant with high antioxidant activity, but is rarely encountered because it has problem in conventional cultivation. Multiplication is a stage on in vitro culture to produce a large number of seeds. Glutamine can be factor supporting on in vitro culture in some plants. This research aims to determine the effect of several glutamine concentrations on the multiplication of shoots resulting from subculture of black pomegranate (*Punica granatum* L.). This experimental research using a completely randomized design (CRD) with 6 treatments and 6 replications. One factor in this research is glutamine with a concentration of 0 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l and 50 mg/l. The results of the observations were analyzed using ANAVA then DMRT 5% test if there was a significant effect on the observed variables. The results showed that glutamine had a significant effect on the quantitative variable on shoots multiplication of black pomegranate. Glutamine concentration of 20 mg/l was effective for all observation variables that is, shoot emergence days that is 14,6 day after palnting (DAP), number of shoots that is 4,8 shoots, hight of shoots that is 3,0 mm and shoots growth percentage that is 88,9%. Morphological observations also showed that the use of glutamine concentrations of 10-30 mg/l can form light green shoots with dark green leaves.

Keywords : *Punica granatum*, shoots multiplication, glutamine

عملية الضرب في فسائل الرمان الأسود (*Punica granatum L.*) باستخدام الحمض الأميني الجلوتامين في المختبر

دينيس عملية، سوينو، ومجد مخلص فخر الدين

تجريد

إن الرمان نبات من النباتات المميزة التي قد ذكرت في القرآن الكريم. يحتوي الرمان الأسود على نسبة عالية من مضادات الأكسدة، لكنه أصبح نادرًا بسبب بعض المشاكل في الزراعة التقليدية. وعملية الضرب هي مرحلة في الزراعة المختبرية التي تهدف إلى الحصول على كميات كبيرة من البذور. والجلوتامين عامل من العوامل التي تدعم نجاح الزراعة المختبرية في بعض النباتات. يهدف هذا البحث إلى تحديد تأثير العديد من تراكيز الجلوتامين على تكاثر عملية الضرب في فسائل الرمان الأسود (*Punica granatum L.*). كان هذا البحث تجريبيًا باستخدام التصميم العشوائي الكامل مع 6 معاملات و 6 مكررات. وهناك عامل واحد من العلاج، وهو الجلوتامين مع تركيز 0 مجم / لتر، 10 مجم / لتر، 20 مجم / لتر، 30 مجم / لتر، 40 مجم / لتر و 50 مجم / لتر. وتحليل نتائج الملاحظات باستخدام (ANAVA) ثم القيام باختباره بعد ذلك باستخدام اختبار (DMRT) بنسبة 5 % إذا كان هناك تأثير كبير على المتغيرات المرصودة. أظهرت النتائج أن الجلوتامين كان له تأثير معنوي في المتغير الكمي لعملية الضرب في فسائل الرمان الأسود. كان تركيز الجلوتامين البالغ 20 مجم / لتر فعالاً لظهور الفسائل (العلف) التي كانت بنسبة 14.6 (HST). وتركيز الجلوتامين بنسبة 20 ملجم / لتر كان فعالاً للعدد، وارتفاع الجذع ونسبة نمو النبات، وهي 4.8 فسائل، 3.0 مم و 88.9%.

الكلمة المفتاحية: (*Punica granatum*)، عملية الضرب في الفسائل، الجلوتامين

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanahuwata'ala* atas segala limpahan rahmat, karunia serta kasih sayangNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan rangkaian penyusunan skripsi yang berjudul “**Multiplikasi Subkultur Tunas Delima Hitam (*Punica granatum L.*) Menggunakan Asam Amino Glutamin Secara *In Vitro***”. Sholawat serta salam juga penulis panjatkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah memberi penerangan bagi umat manusia sehingga sampai pada zaman yang penuh dengan hidayah salah satunya melalui ilmu pengetahuan.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam menyelesaikan rangkaian skripsi ini telah banyak mendapat bantuan berupa doa, dukungan, semangat serta motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan dan ketulusan hati, penulis ingin mengucapkan banyak terimakasih kepada :

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P selaku Ketua Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Suyono, M.P selaku Dosen Pembimbing Skripsi yang telah banyak memberi arahan, nasihat dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi.
5. Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I selaku Dosen Pembimbing Agama yang telah memberikan pengarahan ilmu keagamaan dan integrasi kepada penulis.
6. Dr. Kiptiyah, M.Si selaku Dosen Wali yang telah membimbing penulis dan selalu memberi motivasi dalam proses menuntut ilmu di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

7. Alm. Romaidi, M.Si., D.Sc selaku Dosen Wali dari awal semester sampai semester VII yang telah sabar membimbing dan mempermudah segala urusan administrasi.
8. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P dan Ruri Siti Resmisari, M.Si selaku Dosen Penguji yang telah memberi kritik dan saran yang sangat membantu.
9. Segenap Dosen, Civitas Akademika serta Laboran Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
10. Keluarga tercinta Bapak Winarto, Ibu Wiwik Monarwiati, adik Tito Dimas Mahendra dan semua keluarga di Kabupaten Blitar yang telah memberi dukungan berupa doa, motivasi maupun berupa materiil. Semoga senantiasa mendapat limpahan ridhoNya.
11. Tim delima hitam tercinta Intan Popilia, Khana Linalatil, Mita Devi serta teman-teman Biologi Angkatan 2016 terkhusus BIOLOGI B Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang selalu memberi motivasi dan mendengar keluh kesah penulis.
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang turut membantu dalam menyelesaikan studi sampai tugas akhir.

Semoga Allah *subhanahuwata'ala* memberikan balasan atas segala bantuan dan pemikirannya. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca yang dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan. Aamiin Yaa Rabbal Alamin.

Wassalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh

Malang, 18 Desember 2020

Denis Amalia

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	iii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iv
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	vi
MOTTO.....	vii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	viii
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI.....	ix
ABSTRAK.....	x
ABSTRACT.....	xi
المخلص.....	xii
KATA PENGANTAR.....	xiii
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
DAFTAR SINGKATAN.....	xx
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan.....	6
1.4 Manfaat.....	6
1.5 Hipotesis.....	7
1.6 Batasan Masalah.....	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Delima Hitam dalam Perspektif Islam.....	9
2.2 Botani dan Klasifikasi Delima Hitam.....	11
2.3 Manfaat dan Kandungan Fitokimia Delima Hitam.....	13
2.4 Perbanyakkan Tanaman Delima Hitam Secara Konvensional.....	13
2.5 Kultur <i>In Vitro</i>	14
2.6 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kultur <i>In Vitro</i>	15
2.7 Multiplikasi Tunas.....	19
2.8 Peran Asam Amino pada Tanaman.....	21
2.9 Penggunaan Glutamin pada Kultur <i>In Vitro</i>	22
BAB III. METODE PENELITIAN	
3.1 Rancangan Percobaan.....	24
3.2 Variabel Penelitian.....	24
3.3 Waktu dan Tempat.....	24
3.4 Alat dan Bahan.....	24
3.4.1 Alat.....	24
3.4.2 Bahan.....	25

3.5 Langkah Kerja	25
3.5.1 Sterilisasi Alat	25
3.5.2 Pembuatan Larutan Stok Glutamin	25
3.5.3 Pembuatan Media	26
3.5.4 Sterilisasi Ruangan	27
3.5.5 Sterilisasi Biji Delima Hitam	28
3.5.6 Inisiasi Tunas	28
3.5.7 Multiplikasi Tunas Delima Hitam	29
3.5.8 Tahap Pengamatan	29
3.6 Analisis Data	30
3.7 Desain Penelitian	31
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Konsentrasi Glutamin yang Efektif dan Optimal untuk Hasil Multiplikasi Tunas Delima Hitam (<i>Punica granatum</i> L.) secara <i>In Vitro</i>	32
4.2 Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi Glutamin terhadap Morfologi Tunas Delima Hitam (<i>Punica granatum</i> L.) Secara <i>In Vitro</i>	37
4.3 Dialog Hasil Penelitian dalam Integrasi Sains dan Islam	40
BAB V. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	56

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Hasil Pengamatan Warna Tunas Hasil Multiplikasi pada Hari ke-28.....	38



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Morfologi daun, bunga dan batang delima	12
2.2 Buah dan biji delima hitam	12
2.3 Struktur kimia ZPT <i>Benzyl Adenine</i>	18
3.1 Desain penelitian	31
4.1 Hasil ringkasan uji DMRT 5% pemberian berbagai konsentrasi glutamin terhadap multiplikasi tunas delima hitam (<i>Punica granatum L.</i>)	32
4.2 Hasil pengamatan multiplikasi tunas delima hitam (<i>Punica granatum L.</i>) pada hari ke-28	35
4.3 Hasil analisis regresi pemberian glutamin terhadap hari muncul tunas, jumlah tunas, tinggi tunas dan persentase tumbuh tunas pada multiplikasi tunas delima hitam (<i>Punica granatum L.</i>)	36



DAFTAR LAMPIRAN

1. Data Hasil Pengamatan	56
2. Hasil ANAVA dan Uji Lanjut DMRT 5%	57
3. Perhitungan Komposisi Media	63
4. Perhitungan Larutan Stok ZPT dan Glutamin	64
5. Foto Bahan Penelitian	65
6. Foto Alat Penelitian	66
7. Bukti Konsultasi Skripsi	67



DAFTAR SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Keterangan
ANOVA	<i>Analysis of Variant</i>
Atm	Atmosfer
BA	Benzyl Adenine
TDZ	Thidiazuron
Cm	Centimeter
°c	Derajat Celcius
DMRT	<i>Duncan's Multiple Range Test</i>
G	Gram
HCl	Asam Klorida
Mg	Miligram
L	Liter
LAF	<i>Laminar Air Flow</i>
MS	<i>Murashige and Skoog</i>
NaOH	Natrium Hidroksida
Ph	<i>Power of Hidrogen</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
UV	Ultraviolet
ZPT	Zat Pengatur Tumbuh
HMT	Hari Muncul Tunas
HST	Hari Setelah Tanam
%	Persen
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature and Natural Resources</i>
AC	<i>Air Conditioner</i>
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutions</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan merupakan makhluk hidup yang memegang peranan penting bagi kelangsungan makhluk hidup lain seperti manusia (Corlett, 2016). *World Health Organization* (WHO) memperkirakan bahwa saat ini terdapat lebih dari 80% populasi masyarakat di dunia menggunakan obat-obatan tradisional terutama dari tumbuhan untuk perawatan kesehatan (Kia *et al.*, 2018). Obat-obat herbal tersebut dari hari ke hari popularitasnya semakin meningkat karena dianggap memiliki efek samping yang lebih rendah (Dipak *et al.*, 2012 & Jacob *et al.*, 2019). Penciptaan berbagai jenis tumbuhan yang memiliki khasiat obat di muka bumi tersebut telah Allah SWT jelaskan dalam Surah Asy-Syu'ara' ayat 7 yang berbunyi :

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

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam (tumbuh-tumbuhan) yang baik?” (QS. Asy-Syu'ara' / 26 : 7).

Tafsir Al-Aisar (Al-Jazairi, 2008) menjelaskan bahwa Allah SWT mengajak manusia untuk belajar dari kejadian alam berupa ditumbuhkannya berbagai macam tumbuhan dari kondisi tanah yang tadinya tandus kemudian menjadi subur setelah diturunkan air dari langit. Ayat ini menunjukkan bahwa Allah SWT saja yang berhak untuk disembah, dan hal inilah yang tidak dilakukan oleh kaum musyrik. Yaitu tidak memperhatikan apa yang mereka lihat di bumi, padahal di bumi Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang baik dan membawa manfaat seperti potensinya sebagai obat. Tumbuhan dengan manfaat ini seharusnya diperhatikan dan dipelajari umat manusia sebagai *khalifah* di bumi. Salah satu tumbuhan yang memiliki manfaat berupa berkhasiat obat adalah delima (*Punica granatum* L.).

Delima merupakan tanaman asli dari Iran yang saat ini banyak ditemukan di daerah tropis dan subtropis termasuk Indonesia, karena kemampuannya beradaptasi dalam berbagai kondisi iklim serta berbagai jenis tanah (Chandra *et al.*, 2010; Shaygannia *et al.*, 2016 & Khan *et al.*, 2017). Terdapat tiga jenis tanaman delima di Indonesia berdasarkan warna buahnya yaitu delima merah, delima putih dan delima hitam (ungu) (Hernawati, 2015). Saat ini delima hitam sudah jarang ditemui dan mulai menjadi tanaman langka (Khasanah, 2011). Selain itu, berdasarkan hasil penelitian Ardekani *et al.* (2011) delima hitam ini memiliki aktivitas antioksidan tinggi daripada delima merah dan delima putih. Penelitian tersebut menyebutkan bahwa pada kulit delima hitam terdapat kandungan fenol dan flavonoid yang lebih tinggi daripada 8 jenis kultivar delima lain yaitu sebesar 250,13 mg/g dan 36,40 mg/g.

Kandungan senyawa aktif pada delima hitam menjadikan tumbuhan ini banyak dimanfaatkan sebagai sumber obat alami (Syed *et al.*, 2018). Senyawa aktif yang terdapat pada delima hitam diantaranya adalah antosianin, flavonoid, alkaloid, tannin, triterpen dan fitosterol (Haque *et al.*, 2015). Delima hitam juga mengandung asam ellagic dan ellagitannin (Faria & Calhau, 2011). Senyawa bioaktif dari delima hitam ini mampu menunjukkan sifat antimikroba, menurunkan tekanan darah serta memerangi beberapa penyakit seperti diabetes, kanker, gejala artritis dan aterosklerosis (Opara *et al.*, 2009; Kahramanoglu & Usanmaz, 2016 & Rahmani *et al.*, 2017). Vitamin dan mineral serta asam folat yang terkandung dalam delima hitam juga mampu meningkatkan kekebalan tubuh (Bhowmik *et al.*, 2013).

Dalam beberapa waktu terakhir, terjadi permintaan yang meningkat pada delima (Sumaiya *et al.*, 2018). Hal ini dikarenakan kandungan antioksidan pada delima yang dipercaya berpotensi sebagai sumber obat (Bhowmik *et al.*, 2013). Namun, peningkatan permintaan ini belum diimbangi dengan tersedianya bibit yang sehat dan cukup karena selama ini budidaya delima di Indonesia masih menggunakan cara konvensional. Selain itu, pemanfaatan delima secara berlebihan tanpa diimbangi dengan upaya pelestarian yang tepat juga dapat meningkatkan resiko kepunahan delima hitam. Saat ini, diketahui bahwa delima

terdaftar dalam *Red List* IUCN dengan status *Least Concern*, yang artinya beresiko rendah. Untuk menghindari resiko kepunahan dari delima hitam ini, maka diperlukan upaya budidaya untuk pelestarian. Selain itu, budidaya yang dilakukan pada delima hitam juga berfungsi untuk penyediaan bibit yang nantinya dapat digunakan untuk penelitian.

Budidaya delima hitam secara konvensional dilakukan dengan dua cara, yaitu vegetatif dan generatif. Budidaya vegetatif konvensional salah satunya dengan metode *cutting* (stek) yang mudah dilakukan saat musim semi atau musim panas (Singh, 2017). Metode *cutting* ini belum menjamin hasil tanaman yang sehat dan bebas penyakit (Soni & Kanwar, 2016). Budidaya dengan cara ini juga membutuhkan banyak waktu (Deepika & Kanwar, 2010). Sedangkan budidaya secara generatif biasa dilakukan menggunakan biji. Namun, budidaya dengan biji masih dianggap kurang efisien karena perkecambahan biji delima yang lambat dan tidak seragam. Hal ini disebabkan karena keberadaan kulit biji keras (*spermodermis*) yang mengelilingi biji dan adanya agen penghambat yaitu senyawa fenolik yang dapat menunda perkecambahan biji (Silva *et al.*, 2017). Keberadaan dan kondisi embrio ini juga menjadi penyebab tidak seragamnya perkecambahan biji pada saat budidaya. Sehingga, budidaya delima secara konvensional memiliki kekurangan yaitu membutuhkan waktu yang lama, bibit yang dihasilkan berjumlah terbatas serta menghasilkan tanaman yang belum tentu bebas penyakit.

Seiring dengan ilmu pengetahuan yang semakin berkembang, untuk mendapatkan bibit dalam jumlah banyak dan dalam waktu yang singkat digunakan metode kultur *in vitro* untuk mengatasi beberapa kendala budidaya delima hitam secara konvensional (Samir *et al.*, 2009). Prinsip dari kultur *in vitro* adalah teori totipotensi, yaitu kemampuan suatu sel untuk tumbuh menjadi tanaman lengkap (Wetherell, 1982). Kultur *in vitro* memiliki beberapa kelebihan, seperti dapat dilakukan kapan saja karena tidak bergantung pada musim dan cuaca, menghasilkan ratusan bahkan ribuan tanaman dalam waktu yang relatif singkat serta menghasilkan tanaman bebas virus atau penyakit (Idowu *et al.*, 2009; Kara & Baydar, 2012).

Kultur *in vitro* memiliki beberapa tahap, yaitu inisiasi, multiplikasi pengakaran dan aklimatisasi (Baday, 2018). Multiplikasi dalam kultur *in vitro* salah satunya dapat dilakukan dengan cara organogenesis (Pardal, 2002). Organogenesis merupakan pembentukan organ dari jaringan vegetatif yang bersifat meristematik (Chieng *et al.*, 2014). Multiplikasi tunas merupakan proses dari organogenesis langsung dengan tujuan untuk memperbanyak eksplan yang berasal dari inisiasi tunas yang nantinya dapat tumbuh menjadi tunas adventif atau tunas aksilar (Armini *et al.*, 1992). Tunas-tunas yang dihasilkan dari multiplikasi nantinya akan melalui tahap pengakaran sehingga diperoleh planlet lengkap yang siap masuk tahap aklimatisasi.

Keberhasilan pertumbuhan tunas pada multiplikasi dipengaruhi oleh komposisi media kultur (Kartha, 1982). Media *Murashige and Skoog* (MS) merupakan media yang dapat digunakan untuk berbagai spesies tanaman. Media MS ini juga dapat dimodifikasi untuk mendapatkan hasil kultur *in vitro* yang lebih baik. Contoh modifikasi media MS dapat dilakukan dengan penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) atau asam amino (Wetherell, 1982). Zat pengatur tumbuh yang sering digunakan dalam multiplikasi tunas adalah sitokinin, yang berperan untuk menginisiasi pertumbuhan tunas (George *et al.*, 2008; Zulkarnain, 2009). Thidiazuron (TDZ) merupakan sitokinin yang memiliki kemampuan untuk menginduksi kemunculan tunas. Hal ini dikarenakan thidiazuron mampu mendorong terjadinya perubahan sitokinin ribonukleotida menjadi lebih aktif (Sari *et al.*, 2015). Selain zat pengatur tumbuh, asam amino juga sering ditambahkan pada beberapa penelitian kultur *in vitro*.

Asam amino merupakan salah satu faktor pendukung keberhasilan dalam kultur *in vitro* untuk mendapatkan hasil yang lebih baik (George *et al.*, 2007). Hal ini dikarenakan tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* akan bersifat heterotrof, sehingga penambahan asam amino pada media akan dimanfaatkan secara langsung oleh tanaman (Sitorus *et al.*, 2011). Asam amino memiliki fungsi sebagai sumber nitrogen, penyusun protein yang berguna sebagai pengkoordinasi aktivitas organisme, perespon sel terhadap rangsangan, pergerakan serta penyakit dan mampu mempercepat reaksi-reaksi kimiawi secara selektif. Selain itu, asam

amino juga memiliki peran sebagai aktivator fitohormon (Campbell, 2004 & Fitriani *et al.*, 2015). Setiap tumbuhan yang ditumbuhkan secara *in vitro* memiliki kebutuhan nutrisi yang berbeda, termasuk jenis dan kadar penambahan asam amino pada media.

Glutamin merupakan salah satu asam amino yang digunakan dalam kultur *in vitro* untuk induksi pembentukan maupun pertumbuhan tunas. Glutamin berperan dalam memulai dan mempercepat masuknya amonia dan nitrit ke dalam metabolisme nitrogen organik (Okumoto *et al.*, 2016). Glutamin yang ditambahkan pada media kultur *in vitro* mampu menjadi salah satu donor nitrogen untuk biosintesis komponen organik bernitrogen seperti klorofil dan nukleotida. Penambahan glutamin menyebabkan eksplan yang ditanam tidak lagi harus melakukan sintesis glutamin dari NH_4^+ pada media, karena sel akan menggunakan persediaan glutamin yang siap pakai. Glutamin yang telah ada pada media menjadikan eksplan lebih cepat terpacu untuk melakukan pembelahan sel (Temple *et al.*, 1998; Ireland & Lea, 1999).

Glutamin pada beberapa penelitian terdahulu dilaporkan mampu meningkatkan laju multiplikasi. Menurut Greenwell & Ruter (2018), penggunaan glutamin dengan konsentrasi berbeda yaitu 0 g/l, 0,01 g/l, 0,05 g/l, 0,1 g/l dan 0,5 g/l pada eksplan tunas *Hibiscus moscheutos* menunjukkan bahwa setelah tujuh minggu, perlakuan 0,01 g/l glutamin menghasilkan tunas tertinggi yaitu 5,8 cm. Siwach *et al.* (2012) dalam penelitiannya juga menyatakan bahwa pada multiplikasi tunas hasil subkultur dari *Citrus reticulata* Blanco menghasilkan jumlah tunas terbanyak yaitu 7,24 tunas dengan penambahan glutamin 25 mg/l. Selain itu, pada penelitian multiplikasi nodus *Ocimum basilicum* oleh Shahzad *et al.* (2012), media dengan penambahan glutamin 30 mg/l mampu menghasilkan rata-rata jumlah tunas terbanyak yaitu 13,4 tunas daripada perlakuan lain. Mengacu pada beberapa hasil penelitian tersebut, terdapat 6 taraf konsentrasi glutamin yang digunakan pada penelitian ini yaitu 0 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l dan 50 mg/l.

Sampai saat ini belum diketahui konsentrasi glutamin yang mampu menunjang multiplikasi tunas pada delima hitam. Berdasarkan permasalahan

tersebut, penelitian tentang penambahan glutamin pada media MS untuk multiplikasi tunas delima hitam (*Punica granatum* L.) perlu dilakukan untuk mengetahui konsentrasi glutamin yang efektif dan optimal terhadap multiplikasi tunas delima hitam. Penelitian ini juga merupakan salah satu wujud *tadabbur* pada ciptaan Allah SWT berupa delima hitam yang sudah menjadi tugas manusia untuk mempelajarinya serta sebagai upaya untuk menjaga ciptaanNya.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu :

1. Berapa konsentrasi glutamin yang efektif dan optimal untuk hasil multiplikasi tunas delima hitam (*Punica granatum* L.) secara *in vitro* ?
2. Bagaimana pengaruh pemberian berbagai konsentrasi glutamin terhadap hasil morfologi tunas delima hitam (*Punica granatum* L.) secara *in vitro* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan pada penelitian ini yaitu :

1. Untuk mengetahui konsentrasi glutamin yang efektif dan optimal untuk hasil multiplikasi tunas delima hitam (*Punica granatum* L.) secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui pengaruh pemberian berbagai konsentrasi glutamin terhadap hasil morfologi tunas delima hitam (*Punica granatum* L.) secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu :

1. Memberikan informasi tentang konsentrasi glutamin yang efektif dan optimal untuk hasil multiplikasi tunas delima hitam (*Punica granatum* L.) secara *in vitro*.
2. Memberikan informasi bagi instansi atau lembaga tertentu terkait perbanyakan delima hitam (*Punica granatum* L.) secara *in vitro* atau menjadi rujukan penelitian selanjutnya.
3. Mampu memproduksi bibit delima hitam (*Punica granatum* L.) dalam waktu yang cepat dan hasil yang banyak.

4. Merupakan upaya pengembangan dan pelestarian tanaman berpotensi obat pada masyarakat.
5. Sebagai wujud *tadabbur* pada ciptaan Allah SWT berupa tanaman delima hitam (*Punica granatum L.*) yang berpotensi sebagai tanaman obat.

1.5 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu :

1. Terdapat konsentrasi glutamin yang efektif dan optimal untuk hasil multiplikasi tunas delima hitam (*Punica granatum L.*) secara *in vitro*.
2. Terdapat pengaruh pemberian berbagai konsentrasi glutamin terhadap hasil morfologi tunas delima hitam (*Punica granatum L.*) secara *in vitro*.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini yaitu :

1. Buah delima yang digunakan berasal dari Malang, Jawa Timur.
2. Eksplan yang digunakan untuk inisiasi tunas yaitu biji.
3. Eksplan yang digunakan untuk multiplikasi yaitu tunas nodus kedua dan ketiga hasil subkultur.
4. Subkultur dilakukan sebanyak dua kali.
5. Media perlakuan dibuat dengan penambahan glutamin sesuai dengan perlakuan.
6. Media dasar yang digunakan yaitu *Murashige and Skoog* (MS).
7. Gula yang digunakan adalah 30 g/l.
8. Agar yang digunakan adalah 10 g/l.
9. Zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk media inisiasi tunas dan subkultur yaitu sitokinin jenis *Benzyl Adenine* (BA) dengan konsentrasi 2,5 mg/l.
10. Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan pada media perlakuan sebagai penyedia sitokinin yaitu TDZ 1 mg/l (Kulathuran & Narayanasamy, 2015).
11. Konsentrasi glutamin yang digunakan yaitu 0 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l, 30 mg/l, 40 mg/l dan 50 mg/l.

12. Parameter yang diamati yaitu hari muncul tunas (HMT), jumlah tunas, tinggi tunas, persentase tumbuh tunas serta morfologi tunas (warna daun dan warna tunas).
13. Analisis data yang digunakan yaitu *Analysis of Variant* (ANAVA) satu jalur (*One-Way ANAVA*) untuk mencari konsentrasi glutamin yang efektif. Apabila hasil dari sidik ragam memberikan pengaruh nyata maka dilakukan uji lanjut dengan analisis *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%. Untuk mencari konsentrasi glutamin yang optimal digunakan analisis regresi dengan Microsoft Excel.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Delima Hitam (*Punica granatum L.*) dalam Perspektif Islam

Tumbuhan merupakan salah satu ciptaan Allah SWT yang berguna untuk memenuhi kebutuhan makhluk hidup lain. Semua tumbuhan yang diciptakan Allah SWT memiliki manfaat. Manfaat tersebut dapat berupa sebagai pengendali ekosistem, bahan pangan, bahan bangunan, bahan minyak, bahan obat maupun penunjang kehidupan sehari-hari lainnya. Penciptaan berbagai macam tumbuhan di muka bumi sesuai dengan yang tertera dalam Al-Qur'an dalam Surah Ta-Ha ayat 53 yang berbunyi :

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

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

Arti dari Surah Ta-Ha ayat 53 tersebut menjelaskan bahwa air hujan yang Allah SWT turunkan dari langit, yang kemudian menjadikan bermacam-macam tumbuhan di muka bumi. Berbagai macam tumbuhan ini merupakan tumbuhan dengan berbagai warna, rasa, aroma, bentuk serta manfaat yang akan memberi nilai guna bagi manusia dan juga hewan. Hal ini menunjukkan bahwa Allah SWT telah menurunkan rahmatNya berupa air hujan sehingga dapat tumbuh berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat seperti delima hitam (Al-Maraghi, 1993).

Delima hitam merupakan salah satu tanaman yang memiliki suatu keistimewaan. Hal ini dapat dilihat bahwa delima secara langsung disebutkan dalam Al-Qur'an sebanyak tiga kali yaitu pada surah Al-An'am ayat 99 dan 141 serta pada surah Ar-Rahman ayat 68. Disebutkannya delima secara langsung dalam ketiga ayat tersebut menunjukkan bahwa delima hitam merupakan suatu rezeki dari Allah SWT untuk umat manusia sebagai bukti kekuasaanNya. Adanya buah delima hitam di muka bumi tersebut merupakan suatu tanda bahwa manusia

sebagai makhluk yang dikaruniai akal dan pikiran harusnya berfikir bagaimana cara dalam bertadabbur terhadap ciptaan Allah SWT tersebut.

Delima berdasarkan beberapa penelitian sains menunjukkan potensi sebagai obat. Hal ini membuktikan Maha Besar dan Maha Pengasih Allah SWT yang telah menciptakan delima hitam dengan komposisi serta kandungan yang berpotensi obat. Diriwayatkan dari Rabi'ah binti Iyadh Al-Kilabiyah, bahwa Ali r.a pernah berkata :

“Makanlah delima sedaging buahnya, sesungguhnya ia adalah penyamak saluran pencernaan.” (HR. Ahmad dalam An-Najjar, 2011).

Maksud hadist tersebut yaitu menjelaskan salah satu manfaat dari buah delima yang berkhasiat untuk pencernaan. Hal ini juga sesuai dengan hasil penelitian Akter *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa ekstrak kulit kayu, daun dan buah dari delima telah diuji dapat menyembuhkan diare, disentri dan pendarahan.

Potensi yang terkandung di dalam delima hitam tersebut menjadikan delima banyak dieksploitasi baik digunakan untuk obat ataupun tujuan penelitian. Apabila eksploitasi terus dilakukan tanpa adanya budidaya maka lama-kelamaan keberadaan delima di muka bumi akan sangat berkurang jumlahnya, sehingga perlu dipikirkan cara pelestariannya. Hal tersebut sudah menjadi tugas manusia untuk menjaga apa yang telah diturunkan Allah SWT dan mencari solusi dari permasalahan tersebut. Cara yang dapat dilakukan adalah dengan melakukan budidaya terhadap delima hitam dan budidaya yang efektif yaitu dengan kultur *in vitro*, karena budidaya konvensional terdapat beberapa kendala. Dalam kultur *in vitro* terdapat beberapa faktor pendukung yang mampu menjadikan pertumbuhan dan perkembangan eksplan dalam botol lebih optimal. Salah satu faktor pendukung dalam kultur *in vitro* tersebut adalah penambahan asam amino yang belum diketahui kadarnya. Penambahan asam amino yang pada penelitian ini menggunakan glutamin diharapkan dapat memacu multiplikasi tunas pada delima hitam.

Manusia sebagai makhluk Allah SWT yang dikaruniai akal dan pikiran harus mampu menjalankan perannya sebagai *khalifah* di bumi. Peran tersebut dapat

dilakukan dengan cara menjaga dan memanfaatkan sebaik-baiknya apa yang telah Allah SWT ciptakan dan memikirkan solusi apabila terjadi masalah. Penelitian multiplikasi tunas delima hitam menggunakan glutamin secara *in vitro* ini dapat dilakukan sebagai wujud *tadabbur* pada ciptaan Allah SWT. Eksplan yang awalnya kecil dapat tumbuh menghasilkan beberapa tunas. Selain itu, usaha manusia dalam membudidayakan delima hitam ini bukan bermaksud untuk menandingi kuasa Allah SWT dalam menghidupkan sesuatu. Hasil tanaman kultur *in vitro* yang hidup tersebut juga merupakan atas seizinNya, Allah SWT lah yang berhak menghidupkan eksplan dalam botol media. Hal ini menjadi pelajaran bagi manusia bahwa Allah SWT akan menunjukkan rahmatNya bagi yang mau berfikir, agar jauh dari sifat sombong dan tidak bersyukur.

2.2 Botani dan Klasifikasi Delima Hitam (*Punica granatum L.*)

Delima merupakan tanaman asli dari Iran yang termasuk dalam family Lythraceae dengan distribusi luas yang tersebar di daerah tropis dan subtropis (Graham & Graham, 2014; Khan *et al.*, 2017; Zeynalova & Novruzov, 2017). Delima hitam termasuk tanaman perdu berkayu atau pohon kecil dengan tinggi berkisar antara 1,5 sampai 5 meter atau lebih (Gambar 2.1A). Delima hitam memiliki sistem perakaran tunggang. Batang delima memiliki cabang berjumlah banyak serta ditumbuhi duri pada ketiak daunnya (Shaygannia *et al.*, 2016).

Daun dari delima hitam berwarna hijau gelap dengan panjang sekitar 3-7 cm serta lebar sekitar 2 cm. Daun delima memiliki permukaan yang kasar tetapi terlihat mengkilap (Dipak *et al.*, 2012). Bentuk daun delima lonjong dengan ujung tumpul, pangkal yang lancip dan tepi daun rata. Daun delima memiliki pertulangan daun menyirip (Gambar 2.1B). Daun delima ini termasuk daun tunggal dengan tangkai daunnya yang pendek serta letak daunnya yang berselang berhadapan (Savitri, 2008).

Bunga delima hitam memiliki 5-8 sepal (kelopak) yang menyatu dipangkalnya dan membentuk seperti vas. Petal (mahkota) dari bunga delima juga berjumlah 5-8 dengan bentuk obovate (bulat telur sungsang) dan sedikit berkerut. Sepal biasanya akan berwarna lebih tua daripada warna petalnya (Gambar 2.1C).

Bunga delima dapat muncul secara soliter atau berkelompok. Bunga soliter akan muncul di sepanjang cabang, sedangkan bunga berkelompok muncul di ujung cabang (Holland *et al.*, 2009).



Gambar 2.1 (A) Pohon delima (Kahramanoglu & Usanmaz, 2016)
(B) Daun tanaman delima (C) Bunga tanaman delima (Dipak *et al.*, 2012)

Buah delima hitam memiliki kulit kasar, berbentuk hampir bulat dengan ukuran sekitar 2,5-5 inci. Buah ini terhubung ke pohon melalui tangkai yang pendek. Buah delima ini dimahkotai oleh kelopak bunga yang masih menonjol (Gambar 2.2A). Warna buah delima tergantung dari varietas dan tahap pematangan buah, mulai dari warna hijau kekuningan, merah dan ungu tua yang hampir hitam (Holland *et al.*, 2009). Buah delima mengandung banyak biji yang dikelilingi oleh selaput pembungkus biji (*arillus*) (Mohammad & Kashani, 2012).



Gambar 2.2 (A) Buah delima hitam, (B) Biji delima hitam
(Dokumentasi Pribadi, 2020)

Biji delima hitam menempel dan tertanam pada plasenta dan jaringan spons di dinding bagian dalam yang berbentuk seperti lilitan tidak teratur (Gambar 2.2B). Bentuk biji delima yaitu oval dan ada juga yang agak pipih. Ujung dari biji delima ini berbentuk pipih agak cembung, sedangkan pangkalnya berbentuk cekung melingkar. Biji delima ini memiliki hilum dan mikrofil yang tidak jelas. Biji delima hitam terlindungi oleh kulit biji (*spermodermis*) yang keras dan tebal. *Spermodermis* ini dikelilingi oleh salut biji (*arillus*) yang berwarna putih. *Arillus*

ini berasal dari tali pusar (*funiculus*) yang ikut tumbuh (Graham & Graham, 2014).

Klasifikasi delima hitam menurut APG II (2003) adalah termasuk Kingdom Plantae, Division Magnoliophyta, Class Magnoliopsida, Order Myrtales, Family Lythraceae, Genus Punica dan Species *Punica granatum* L.

2.3 Manfaat dan Kandungan Fitokimia Delima Hitam

Delima hitam merupakan salah satu tanaman yang kaya akan manfaat. Delima telah digunakan dalam pengobatan alami untuk mengobati beberapa penyakit seperti sakit tenggorokan, batuk, infeksi saluran kemih, gangguan pencernaan, gangguan kulit dan radang sendi. Delima juga dapat digunakan untuk mengobati kondisi serius seperti kanker, osteoarthritis dan diabetes. Selain itu, ketika digunakan untuk diet sehat delima membantu mencegah penyakit jantung (Kumari *et al.*, 2012). Pemanfaatan lain dari delima adalah sebagai produk siap konsumsi seperti jus, selai, minuman fermentasi, ekstrak buah delima untuk bahan kosmetik, suplemen makan dan suplemen diet (Melgarejo & Valero, 2012).

Delima hitam digunakan sebagai sumber obat alami karena kandungan bahan aktif pada bagian-bagian tanamannya (Sumaiya *et al.*, 2018). Bagian bunga delima terdapat kandungan triterpenoid, asam asiatik dan asam ursolat. Daun delima juga mengandung tannin, luteolin dan flavonoid. Minyak biji delima mengandung sterol, asam ellagic dan 95% asam punic. Akar dan kulit delima mengandung alkaloid piperidin, ellagitannin dan punicalin. Sedangkan pada buah delima sendiri terdapat kandungan flavonoid, kuersetin dan rutin. Kandungan antioksidan pada bagian-bagian delima hitam ini memiliki potensi menyerap radikal bebas yang berbahaya bagi tubuh manusia (Li *et al.*, 2015; Mpahlele *et al.*, 2016 & Syed *et al.*, 2018).

2.4 Perbanyak Tanaman Delima Hitam secara Konvensional

Delima hitam dapat diperbanyak dengan cara generatif dan vegetatif. Perbanyak generatif delima dapat dilakukan menggunakan biji. Perbanyak dengan menggunakan biji sebenarnya merupakan metode yang praktis dan ekonomis, tetapi perkecambahannya dianggap lambat dan tidak seragam, karena

adanya kulit biji keras yang mengelilingi biji serta adanya senyawa fenolik yang bertindak sebagai agen penghambat atau penunda perkecambahan biji (Silva *et al.*, 2017). Selain itu, perkecambahan dari biji delima juga dipengaruhi oleh kondisi embrio, yaitu bahwa tidak semua biji memiliki embrio dan ukuran embrio pada biji juga mampu mempengaruhi perkecambahan delima. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Aini (2018) yang menunjukkan bahwa pada 300 biji delima hitam yang diamati terdapat 97 biji memiliki embrio ukuran besar dengan panjang 2085,33 μm dan lebar 1496,62 μm , 195 biji memiliki embrio ukuran kecil yaitu dengan panjang 1485,32 μm dan lebar 1062,03 μm serta 8 biji lainnya tidak memiliki embrio.

Perbanyakan vegetatif tanaman delima hitam dapat dilakukan dengan cara stek, cangkok (okulasi) dan layering (Singh, 2017). Stek merupakan metode termudah untuk perbanyakan delima. Namun, cara stek ini persentase keberhasilannya tergantung pada banyak faktor seperti kondisi tanaman induk, waktu stek, curah hujan dan fluktuasi suhu. Selain itu, kondisi lingkungan yang berbeda akan mempengaruhi proses pertumbuhan dan pengakaran pada saat hasil stek ditanam (Mehta *et al.*, 2018). Sedangkan cara cangkok dan layering jarang dilakukan dalam perbanyakan delima karena hasilnya belum cukup sukses untuk produksi secara komersial, sehingga perbanyakan delima hitam secara konvensional masih memiliki beberapa kekurangan seperti jumlah bibit yang dihasilkan rendah, dibutuhkan waktu panjang untuk budidaya serta bibit yang dihasilkan belum tentu bebas dari penyakit.

2.5 Kultur *In Vitro*

Kultur *in vitro* merupakan teknik perbanyakan tanaman dengan cara mengisolasi bagian-bagian tanaman (protoplas, sel, jaringan atau organ) yang kemudian ditumbuhkan pada media buatan yang aseptis dengan kondisi lingkungan yang terkendali sehingga mampu beregenerasi menjadi tanaman lengkap (Zulkarnain, 2009). Teknik ini menerapkan prinsip dasar *totipotensi* sel, yaitu kemampuan setiap sel atau organ tanaman untuk tumbuh menjadi individu baru apabila ditempatkan pada lingkungan yang sesuai (Yuliarti, 2010).

Sebagai salah satu teknik untuk memperbanyak tanaman, kultur *in vitro* ini memiliki beberapa kelebihan seperti mampu memperbanyak tanaman tertentu yang sulit diperbanyak dengan metode konvensional, tidak membutuhkan lokasi yang luas serta dapat dilakukan sewaktu-waktu (Yusnita, 2003). Kultur *in vitro* ini dapat dilakukan pada semua musim karena semua proses dilakukan pada lingkungan yang terkendali (Zulkarnain, 2009). Selain itu, kultur *in vitro* juga mampu menghasilkan tanaman dalam jumlah banyak dengan waktu yang relatif singkat dan menghasilkan tanaman anakan yang mempertahankan sifat unggul indukan seperti bebas hama penyakit, bakteri serta cendawan (Prihandana & Hendroko, 2006).

Perbanyak tanaman melalui kultur *in vitro* memiliki beberapa tahap seperti inisiasi, multiplikasi, pengakaran dan aklimatisasi. Inisiasi merupakan tahap yang dimulai dari persiapan eksplan, sterilisasi eksplan untuk memperoleh eksplan yang bebas dari kontaminan sampai penanaman eksplan pada media yang aseptis. Multiplikasi merupakan tahap memperbanyak eksplan dengan subkultur yang merupakan proses pemindahan eksplan pada media baru secara berulang-ulang untuk mempertahankan stok nutrisi tanaman. Pengakaran merupakan tahap terakhir sebelum eksplan dipindahkan ke lingkungan luar, sedangkan aklimatisasi merupakan pemindahan eksplan dari lingkungan yang terkendali dalam botol ke lingkungan alam luar (Kumar & Reddy, 2011).

2.6 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kultur *In Vitro*

Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan kultur *in vitro* diantaranya adalah eksplan, media kultur, proses sterilisasi, zat pengatur tumbuh, faktor lingkungan dan faktor-faktor lainnya. Eksplan dapat berupa meristem, tunas, batang, anther, daun, embrio, hipokotil, biji, rhizome dan akar (Wattimena *et al.*, 1992). Eksplan yang digunakan biasanya merupakan bagian tanaman dengan sel-selnya yang masih aktif membelah dari tanaman induk sehat dan berkualitas (Santoso & Nursandi, 2004). Bagian tanaman yang masih aktif membelah ini biasanya memiliki daya regenerasi yang tinggi dan masih mengandung sedikit kontaminan (Yusnita, 2003). Selain itu, eksplan dengan

ukuran kecil (<20 mm) akan memiliki kemungkinan kontaminasi lebih kecil dengan daya tahan eksplan rendah daripada eksplan yang berukuran lebih besar (>20 mm) (George & Sherrington, 1984).

Media kultur merupakan media steril yang digunakan untuk menumbuhkan eksplan. Unsur-unsur yang terkandung dalam media adalah hara makro, hara mikro, gula, vitamin, N organik, buffer, senyawa kompleks, arang aktif, ZPT, asam amino dan bahan pematat (Gunawan, 1988). Media kultur yang umumnya digunakan untuk perbanyakan secara *in vitro* adalah media dasar *Murashige and Skoog* (MS) (Yuliarti, 2010). Media MS umum digunakan untuk perbanyakan secara *in vitro* karena memiliki kandungan N dalam bentuk NH_4^+ dan NO_3 lebih tinggi daripada media lain (George & Sherrington, 1984). Pada media juga sering ditambahkan bahan pematat yaitu agar-agar. Pemilihan agar-agar dikarenakan agar-agar tidak bisa dicerna oleh tanaman, sehingga tidak mengganggu proses fisiologis pada tanaman. Selain itu, agar-agar juga memiliki sifat yang membeku pada temperatur $\leq 45^\circ\text{C}$ dan mencair pada temperatur 100°C , sehingga pada kondisi lingkungan kultur akan tetap membeku stabil untuk menopang eksplan agar tetap pada tempatnya (Gunawan, 1988).

Derajat keasaman (pH) pada media juga berpengaruh terhadap pertumbuhan eksplan. Media perlu diatur pH nya agar fungsi membran sel dan sitoplasma tidak terganggu pada saat eksplan ditanam (Gunawan, 1992). Media yang sesuai untuk pertumbuhan eksplan yaitu 5-6,5. Media dengan pH terlalu rendah (<4,5) dan terlalu tinggi (>7,0) akan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan menjadi abnormal. Senyawa yang biasa ditambahkan pada media yang terlalu asam adalah NaOH, sedangkan untuk media yang terlalu basa adalah HCl (Pierik, 1987).

Sterilisasi merupakan langkah penting yang harus dilakukan untuk menghilangkan kontaminan pada proses kultur *in vitro*. Kontaminan hidup yang dapat menyebabkan kontaminasi biasanya berupa cendawan, bakteri, serangga dan telur-telur insekta. Kontaminan hidup pada eksplan yang tidak dihilangkan akan menyebabkan organisme ini mengadakan pertumbuhan karena pada media kultur mengandung gula, vitamin dan mineral (Gunawan, 1998). Kontaminasi ini

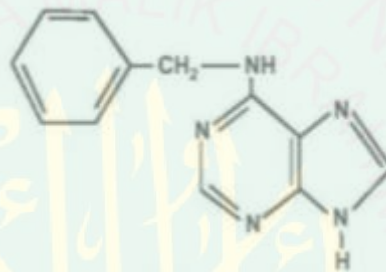
dapat dihindari dengan cara kerja pada *Laminar Air Flow* (LAF), sterilisasi media, sterilisasi alat-alat dan sterilisasi eksplan (Indrianto, 2002).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) yaitu senyawa organik bernutrisi yang aktif dalam jumlah kecil (10^{-6} - 10^{-5} mM) yang disintesis pada bagian tanaman tertentu yang akan ditranslokasikan dan menimbulkan respon dan tanggapan biokimia, fisiologis serta morfologis (Wattimena *et al.*, 1992). Zat pengatur tumbuh pada tanaman merupakan senyawa organik yang bukan termasuk unsur hara (nutrisi). Pada tanaman, ZPT dalam jumlah yang sedikit dan sesuai dapat bertindak sebagai pendukung proses fisiologis tanaman (*promote*), namun dalam jumlah yang berlebih ZPT dapat bertindak sebagai penghambat (*inhibitor*) (Abidin, 1983).

Zat pengatur tumbuh yang biasa digunakan pada kultur *in vitro* merupakan hormon sintetis (Hendaryono & Wijayani, 1994). Zat pengatur tumbuh tanaman terdiri dari lima kelompok yaitu auksin, sitokinin, giberelin, etilen dan asam absisat. Sitokinin merupakan salah satu ZPT yang berperan dalam pembelahan sel serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Zulkarnain, 2009). Pada umumnya, untuk pembentukan tunas digunakan sitokinin, sedangkan kombinasi sitokinin dan auksin digunakan untuk pembentukan kalus (Lestari, 2011). Sitokinin juga berperan dalam merangsang pertumbuhan tunas samping (*lateral*), meningkatkan klorofil daun serta memperlambat proses penuaan (*senescence*) pada daun, buah dan organ lain pada tanaman (Wattimena, 1988).

Sitokinin dalam proses pembelahan sel memiliki peran pada dua tahap. Tahap pertama, dalam siklus sel sitokinin memiliki peranan penting yaitu memacu sitokinesis dengan cara meningkatkan peralihan G2 ke mitosis sekaligus meningkatkan laju sintesis protein. Beberapa protein tersebut merupakan protein pembangun atau enzim yang dibutuhkan untuk mitosis. Sitokinin juga memperpendek fase S dengan cara mengaktifkan DNA, sehingga salinan DNA menjadi dua kali lebih besar kemudian laju sintesis DNA digandakan. Tahap kedua, sitokinin mampu mempengaruhi gen *KNOX* (*Knotted like homebox*), yaitu gen pengkode suatu protein yang memacu pertumbuhan dan pemeliharaan meristem ujung batang agar sel-selnya selalu bersifat meristematik (Wijayani & Mudyantini, 2007).

Salah satu sitokinin yang digunakan untuk inisiasi tunas dalam kultur *in vitro* yaitu *Benzyl Adenine* (BA). Sitokinin BA merupakan salah satu turunan dari adenin yang sering digunakan untuk perbanyakan tunas aksilar karena memiliki efektivitas tinggi. Penggunaan BA mampu mempengaruhi fisiologis eksplan yaitu memacu pembelahan sel dan pembentukan organ, menunda penuaan, memacu perkembangan tunas samping dan memacu pembesaran kotiledon (Salisbury & Ross, 1995). Selain itu, BA juga mempunyai sifat yang sulit di degradasi oleh enzim sehingga mempunyai daya rangsang lebih lama serta tidak mudah dirombak oleh sistem enzim dalam tanaman (Abidin, 1983).



Gambar 2.3 Struktur Kimia dari *Benzyl Adenine*
(Abidin, 1983)

Thidiazuron (TDZ) juga merupakan golongan sitokinin yang dalam beberapa penelitian digunakan untuk regenerasi tunas. TDZ merupakan senyawa sintetik seperti fenil urea sitokinin yang efektif dalam mengatur morfogenesis pucuk (Hui-mei *et al.*, 2008). TDZ mampu meningkatkan biosintesis dan akumulasi turunan adenin endogen sehingga induksi pucuk lebih cepat dan tunas yang terbentuk lebih banyak (Kumari *et al.*, 2017).

Lingkungan tempat peletakan botol kultur juga dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Faktor lingkungan yang berpengaruh pada eksplan yaitu oksigen, temperatur, cahaya dan pH (derajat keasaman). Suplai oksigen yang cukup mampu mendukung laju pertumbuhan eksplan. Temperatur yang optimum juga dibutuhkan eksplan dalam perbanyakan secara *in vitro*. Temperatur normal yang biasa digunakan yaitu antara 22°C-28°C. Sedangkan kisaran intensitas cahaya untuk inisiasi yaitu 0-1000 lux, untuk multiplikasi 1000-10000 lux, pengakaran 10000-30000 lux dan >30000 lux untuk

aklimatisasi. Namun, perkembangan embrio membutuhkan tempat gelap kira-kira selama 7-14 hari dan setelah itu dapat dipindahkan di tempat terang untuk membentuk klorofil. Selain itu, sel-sel yang dikembangkan dengan kultur *in vitro* memiliki kisaran pH yang relatif sempit yaitu sekitar 5,0-6,0. Kondisi lingkungan lain yang harus dibentuk dalam kultur *in vitro* adalah aseptis. Lingkungan aseptis akan menurunkan tingkat kontaminan, sehingga mampu meningkatkan keberhasilan dalam proses kultur *in vitro* (Santoso & Nursandi, 2004).

Faktor lain yang biasa terjadi pada kultur *in vitro* adalah *browning*, vitrifikasi dan nekrosis. *Browning* merupakan keadaan pencoklatan pada eksplan yang diakibatkan oleh pengaruh fisik maupun biokimia seperti memar, luka maupun adanya senyawa fenolik. Keadaan ini mampu menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Mariska & Sukmadjaja, 2003). Vitrifikasi merupakan munculnya pertumbuhan dan perkembangan yang tidak normal, tanaman yang dihasilkan kerdil, pertumbuhan batang cenderung ke arah penambahan diameter dan daunnya memiliki kecenderungan melebar pada bagian pangkal. Sedangkan nekrosis merupakan keadaan matinya jaringan pada pucuk dan tepi daun. Nekrosis ini terjadi karena adanya defisiensi unsur hara terutama boron dan kalium (Zulkarnain, 2009).

2.7 Multiplikasi Tunas

Berdasarkan arah tumbuhnya kultur *in vitro* dibagi menjadi dua, yaitu embriogenesis dan organogenesis. Embriogenesis merupakan bagian dari proses morfogenesis yang mana embriogenesis memiliki sifat bipolar, dimana dalam satu eksplan akan membentuk dua arah pertumbuhan yaitu bakal tunas dan bakal akar dalam waktu yang relatif sama. Sedangkan, organogenesis merupakan proses diferensiasi yang bersifat unipolar, dimana eksplan hanya akan tumbuh membentuk tunas atau akar saja (Manuhara, 2014).

Organogenesis dapat dilakukan pada sel-sel meristematik dan kompeten, yaitu sel yang mampu memberi tanggapan pada sinyal lingkungan atau hormonal sehingga mampu membentuk organ (Trigiano & Gray, 2005). Organogenesis dapat dibedakan menjadi dua yaitu organogenesis langsung dan tidak langsung.

Organogenesis langsung merupakan pertumbuhan eksplan secara langsung membentuk tunas atau akar, sedangkan organogenesis tidak langsung eksplan akan membentuk kalus terlebih dahulu sebelum membentuk organ. Organogenesis untuk regenerasi tunas dapat dilakukan melalui dua tahap yaitu induksi tunas dan multiplikasi tunas (Manuhara, 2014).

Multiplikasi merupakan salah satu tahap dalam kultur *in vitro* dimana terjadi diferensiasi sel menjadi tunas (Salisbury & Ross, 1995). Multiplikasi tunas juga dapat diartikan sebagai penggandaan tunas dari hasil inisiasi mata tunas maupun kalus. Multiplikasi ini menunjukkan hasil pembentukan tunas adventif dan tunas aksilar dalam waktu yang sama (Armini *et al.*, 1992). Pada umumnya, multiplikasi terjadi pada sel yang belum mengalami pertumbuhan sekunder, yaitu sel yang masih memiliki sifat meristematik. Sel dikatakan bersifat meristematik apabila masih melakukan pembelahan primer dan belum terspesifikasi menjadi jaringan lain (Hidayat, 1995).

Perkembangan eksplan dalam kultur *in vitro* dibagi menjadi tiga tahap utama. Tahap I disebut tahap persiapan eksplan. Pada tahap ini terjadi proses pemilihan bagian tanaman untuk dijadikan eksplan kemudian ditanam pada media kultur (Wetherell, 1982). Tahap II merupakan tahap penggandaan dengan cara subkultur eksplan dari tahap I untuk menghasilkan jumlah tunas yang diinginkan. Subkultur merupakan pemindahan sel, jaringan atau organ dari media lama ke media baru, baik komposisi media yang sama atau berbeda dengan tujuan untuk mendapatkan pertumbuhan atau perkembangan baru dari inokulum yang ditanam sebelumnya (Wattimena *et al.*, 1992). Sedangkan, tahap III merupakan proses pendewasaan eksplan yang biasanya dirangsang untuk membentuk akar (Wetherell, 1982).

Faktor yang mendukung pertumbuhan eksplan pada tahap multiplikasi yaitu media kultur serta suhu dan cahaya inkubasi (Yusnita, 2003). Selain itu, eksplan juga merupakan faktor penting dalam keberhasilan multiplikasi. *Shoot tip* dan bagian binodal merupakan bagian tanaman yang umumnya digunakan untuk multiplikasi. *Shoot tip* merupakan pucuk yang terdiri dari jaringan meristem apikal dengan beberapa primordia daun (Buitevelds *et al.*, 1993).

2.8 Peran Asam Amino pada Tanaman

Asam amino merupakan salah satu faktor penunjang keberhasilan dalam kultur *in vitro*. Media tanam dengan kandungan makronutrien, mikronutrien, zat pengatur tumbuh serta vitamin juga dapat ditambahkan dengan asam amino (George *et al.*, 2007). Asam amino dapat ditambahkan karena tumbuhan yang ditumbuhkan secara *in vitro* tidak lagi sepenuhnya bersifat autotrof, namun bersifat heterotrof (Sitorus *et al.*, 2011). Sehingga, asam amino ini pada tanaman dapat dimanfaatkan secara langsung oleh jaringan tanaman daripada nitrogen anorganik.

Asam amino berperan sebagai salah satu sumber nitrogen yang berperan dalam regenerasi tunas, induksi pembentukan kalus, embriogenesis dan androgenesis eksplan (Das & Mandal, 2010). Asam amino akan memulai dan mempercepat masuknya amonia dan nitrit ke dalam metabolisme nitrogen organik. Asam amino juga berfungsi sebagai tempat penyimpanan nitrogen dan menyediakan jalur yang efisien untuk asimilasi nitrogen selama transportasi metabolik (Greenwell & Ruter, 2018). Ketersediaan nitrogen yang optimal dapat meningkatkan pertumbuhan, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan rasio pucuk akar serta berperan dalam pembentukan klorofil. Ketersediaan klorofil yang cukup akan meningkatkan proses fotosintesis sehingga karbohidrat bertambah dan mempercepat pertumbuhan tanaman (Menendez *et al.*, 2002).

Asam amino yang tergolong dalam keluarga glutamin (glutamate) yaitu glutamin, glutamat, prolin, arginine memiliki fungsi memulai dan mempercepat ammonia dan nitrit masuk ke dalam metabolisme nitrogen organik pada tanaman. Pada katalisis sintetase glutamin, glutamin direduksi menjadi glutamate dan selanjutnya dapat dimodifikasi menjadi prolin atau arginin (Shahsavari, 2011). Selain itu, asam amino juga berfungsi sebagai tempat penyimpanan nitrogen sebagai intermedia untuk memasukkan ammonia menjadi asam amino yang nantinya digunakan sebagai bahan penyusun protein atau nukleotida, seperti purin dan pirimidin (Okumoto *et al.*, 2016). Sehingga, asam amino pada tanaman berfungsi sebagai sumber nitrogen yang efisien melalui sintesis langsung protein

dan menyediakan jalur yang efisien untuk asimilasi nitrogen selama transportasi metabolik jarak jauh (Rozali *et al.*, 2014; Okumoto *et al.*, 2016).

Setiap jenis tanaman dan eksplan yang digunakan mempunyai respon tersendiri terhadap pemberian asam amino. Penelitian Gabory & Abady (2018) dengan eksplan tunas stroberi menunjukkan bahwa pemberian glutamin 100 mg/l memberikan peningkatan tertinggi pada jumlah dan panjang tunas daripada perlakuan lain. Rata-rata jumlah tunas 7,60 dan rata-rata panjang tunas 1,88 cm yang dihasilkan menunjukkan hasil terbaik daripada perlakuan 0 mg/l, 25 mg/l atau 50 mg/l.

2.9 Penggunaan Glutamin pada Kultur *In Vitro*

Borpuzari & Kachari (2018) telah melakukan penelitian multiplikasi tunas pada gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.). Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan glutamin 0 mg/l dan 20 mg/l pada media MS menunjukkan bahwa media dengan penambahan glutamin 20 mg/l menghasilkan rata-rata jumlah tunas tertinggi yaitu sebanyak 24,81 tunas daripada tanpa penambahan glutamin. Penelitian induksi multiplikasi tunas *Hildegardia populifolia* yang dilakukan oleh Lavanya *et al.* (2012) juga menunjukkan bahwa glutamin 50 mg/l menunjukkan rata-rata jumlah aksilar dan apikal terbanyak daripada perlakuan lain, yaitu 15,6 dan 13,2 tunas. Rasullah *et al.* (2013) pada penelitiannya juga menyatakan bahwa glutamin 30 mg/l pada pertumbuhan tunas tebu varietas NXI 1-3 menghasilkan jumlah tunas yang berbeda nyata, sedangkan glutamin 20 mg/l menghasilkan panjang tunas yang berbeda nyata.

Hasil penelitian Haroun *et al.* (2010) menerangkan bahwa dengan penambahan glutamin 1 mM pada eksplan tunas *Phaseolus vulgaris* berpengaruh terhadap beberapa parameter yaitu panjang tunas, berat basah, berat kering dan kandungan air. Selain itu, Sanjaya *et al.* (2006) dalam penelitiannya menyatakan bahwa glutamin dengan konsentrasi 342,24 μ M ditambahkan pada media untuk proliferasi *Santalum album*. Penelitian Bora *et al.* (2018) juga menyatakan bahwa pada multiplikasi *Capsicum chinense* Jacq. dengan penambahan glutamin 1 mg/l

menunjukkan respon lebih baik untuk induksi multiplikasi tunas dan tinggi tunas daripada tanpa penambahan glutamin.

Glutamin merupakan salah satu asam amino non esensial, yang dapat dibentuk dalam tubuh tumbuhan tetapi dalam jumlah terbatas, sehingga masih memerlukan tambahan dari luar tubuh tumbuhan (Rasullah *et al.*, 2013). Glutamin merupakan salah satu jenis asam amino yang banyak digunakan pada kultur *in vitro* untuk induksi pembentukan maupun pertumbuhan tunas (Winarto, 2011). Glutamin merupakan produk utama dari asimilasi nitrogen dari sumber nitrogen anorganik dalam metabolisme nitrogen pada tanaman (Chellamuthu *et al.*, 2014). Glutamin ini merupakan donor amino utama untuk sintesis asam amino dan senyawa yang mengandung nitrogen lainnya pada tanaman (Kan *et al.*, 2015). Glutamin memiliki peran penting dalam diferensiasi sel, proliferasi dan menjaga potensi embrionik eksplan (Ogita *et al.*, 2001).

Tanaman menyerap nitrogen sebagian besar dalam bentuk ion nitrat atau ammonia. Molekul nitrat tersebut kemudian secara enzimatik dikonversi menjadi ammonia, yang kemudian berasimilasi dengan tanaman untuk sintesis asam amino (Paschalidis *et al.*, 2019). Penambahan glutamin pada media mampu menjadi salah satu donor nitrogen untuk biosintesis komponen organik bernitrogen seperti klorofil dan nukleotida. Penambahan glutamin menyebabkan eksplan yang ditanam tidak lagi harus melakukan sintesis glutamin dari NH_4^+ pada media, karena sel-sel pada eksplan akan menggunakan persediaan glutamin yang siap pakai. Hal ini akan menyebabkan eksplan akan lebih cepat terpacu untuk melakukan pembelahan sel (Temple *et al.*, 1998; Ireland & Lea, 1999).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Percobaan

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan 1 faktor yaitu pemberian berbagai konsentrasi glutamin pada media *Murashige and Skoog* (MS). Faktor glutamin yang digunakan terdiri dari 6 taraf yaitu 0 mg/l (G0), 10 mg/l (G1), 20 mg/l (G2), 30 mg/l (G3), 40 mg/l (G4) dan 50 mg/l (G5). Perlakuan pada penelitian ini diulang sebanyak 6 kali, sehingga terdapat 36 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri dari 3 eksplan, sehingga terdapat 108 eksplan.

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari tiga variabel yaitu variabel bebas, variabel terikat dan variabel terkontrol. Variabel bebas terdiri dari konsentrasi glutamin. Variabel terikat terdiri dari hari muncul tunas, jumlah tunas, tinggi tunas, persentase tumbuh tunas dan morfologi tunas (warna daun dan warna tunas). Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah media *Murashige and Skoog* (MS), konsentrasi sitokinin *benzyl adenine* (BA) 2,5 mg/l, konsentrasi TDZ 1 mg/l, agar 10%, gula 3%, suhu ruang inkubasi, pH media, kelembaban dan cahaya.

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus-November 2020. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu gelas beaker, gelas ukur, erlenmeyer, neraca analitik, spatula, pinset, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, kompor, mikropipet, botol media kultur, botol aquades steril, pH indikator,

autoklaf, oven, *Laminar Air Flow* (LAF), batang pengaduk, cawan petri, scalpel, mata pisau, kulkas, rak pendingin media, rak inkubasi, *Air Conditioner* (AC), lampu, bunsen, penyemprot alkohol, pensil, penggaris, buku catatan dan alat dokumentasi.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu biji delima hitam, sedangkan bahan untuk media yaitu *Murashige and Skoog* (MS), agar, gula, sitokinin BA dan TDZ, HCl, NaOH dan aquades. Untuk sterilisasi digunakan detergen cair, fungisida, bakterisida, alkohol 70%, alkohol 96%, clorox, aquades steril, betadine, spiritus, kertas, plastik tahan panas, karet gelang, kertas label dan aluminium foil.

3.5 Langkah Kerja

3.5.1 Sterilisasi Alat

Langkah kerja pada sterilisasi alat dilakukan secara dua tahap. Tahap pertama yaitu scalpel, pinset, spatula, batang pengaduk, gelas beaker, gelas ukur, botol kultur, botol aquades steril dan erlenmeyer dicuci dengan detergen cair sampai bersih kemudian dibilas dengan air mengalir. Alat-alat ini kemudian dioven pada suhu 121°C selama 3 jam, kecuali gelas beaker dan erlenmeyer. Tahap kedua pada sterilisasi alat ini yaitu scalpel, pinset, spatula dan batang pengaduk dibungkus dengan aluminium foil, sedangkan cawan petri dibungkus dengan kertas. Alat yang telah dibungkus kemudian dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Seluruh alat yang akan digunakan dalam LAF disemprot terlebih dahulu dengan alkohol 96% dan dibakar dengan api bunsen.

3.5.2 Pembuatan Larutan Stok Asam Amino Glutamin

Larutan stok dibuat untuk memudahkan dalam pembuatan media. Langkah pertama yang dilakukan dalam pembuatan larutan stok adalah ditimbang glutamin 10 mg dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 100 ml aquades pada erlenmeyer tersebut untuk dihomogenkan. Pengambilan larutan stok

asam amino glutamin dilakukan dengan menggunakan rumus pengenceran yaitu $M1.V1=M2.V2$. Misalkan dalam pembuatan 62,5 ml media, glutamin dengan konsentrasi 10 mg/l yang dibutuhkan yaitu :

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$100.V1 = 10.62,5$$

$$100.V1 = 625$$

$$V1 = 6,25 \text{ ml}$$

3.5.3 Pembuatan Media

A. Media MS + *Benzyl Adenine* (BA) (Media Pra-Perlakuan)

Media pra-perlakuan yang digunakan sebagai media inisiasi tunas dan subkultur delima hitam dibuat dengan cara menimbang 4,43 gram media instan *Murashige and Skoog* (MS), gula 30 gram dan agar 10 gram. Langkah selanjutnya yaitu media MS dan gula dimasukkan kedalam gelas beaker berukuran 1 liter dan ditambah aquades hingga volume total 1 liter, kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Langkah selanjutnya zat pengatur tumbuh BA dimasukkan dalam gelas beaker sebanyak 2,5 mg/l. Agar yang telah ditimbang selanjutnya dimasukkan kedalam gelas beaker kemudian secara bersama-sama dimasak menggunakan *hotplate* dan *magnetic stirrer* sampai media mendidih. Media yang telah mendidih kemudian diangkat dan diukur pH nya, apabila pH terlalu asam maka ditambahkan NaOH, dan apabila terlalu basa maka ditambahkan HCl hingga diperoleh pH senilai 5,9. Media yang telah memiliki pH sesuai kemudian dituang kedalam botol masing-masing sebanyak 12,5 ml. Selanjutnya botol ditutup plastik tahan panas dan diikat dengan karet gelang. Botol berisi media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

Pada kondisi pra-perlakuan juga dibuat media MS 0 yang digunakan untuk menanam eksplan sebelum dipindahkan ke media perlakuan. Media MS 0 dibuat sama seperti media pra-perlakuan dengan tidak menambahkan hormon BA.

B. Media MS + Glutamin (Media Perlakuan)

Media perlakuan dibuat dengan cara menimbang 4,43 gram media instan *Murashige and Skoog* (MS), gula 30 gram dan agar 10 gram. Pada media perlakuan ini digunakan hormon TDZ dengan konsentrasi yang seragam yaitu 1 mg/l yang berfungsi sebagai penyedia sitokinin pada media kultur. Media untuk masing-masing perlakuan dibuat sebanyak 62,5 ml. Konsentrasi glutamin yang digunakan yaitu 10 mg/l atau sebanyak 6,25 ml, 20 mg/l atau sebanyak 12,5 ml, 30 mg/l atau sebanyak 18,75 ml, 40 mg/l atau sebanyak 25 ml dan 50 mg/l atau sebanyak 31,25 ml. Glutamin diambil dari stok glutamin sebesar 100 ml. Semua bahan (kecuali agar dan glutamin) yang telah ditimbang dan ditakar dimasukkan kedalam gelas beaker ukuran 1 liter kemudian ditambahkan aquades sebanyak 375 ml sesuai perlakuan. Pada setiap perlakuan diberi label sesuai dengan masing-masing perlakuan. Masing-masing media dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* secara bergantian. Media kemudian dimasak bersama agar sampai mendidih menggunakan *hotplate* dan *magnetic stirrer*. Media yang telah mendidih diangkat dan diukur pH nya, apabila pH asam maka ditambahkan NaOH dan apabila pH basa ditambahkan HCl hingga diperoleh pH yang diinginkan yaitu 5,9. Media dengan pH yang sesuai selanjutnya dituangkan kedalam botol yang telah diberi label sesuai perlakuan sebanyak 12,5 ml. Langkah selanjutnya botol ditutup plastik tahan panas dan diikat dengan karet gelang. Botol berisi media ini disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm dalam waktu 15 menit.

3.5.4 Sterilisasi Ruangan

Sterilisasi ruangan dilakukan dengan cara membersihkan meja LAF dengan alkohol 70% sampai bersih. Alat-alat seperti pinset, scalpel, mata pisau, bunsen, jas laboratorium, cawan petri yang akan digunakan diletakkan pada meja kerja LAF. Dinyalakan blower LAF kemudian ditutup dan lampu UV dinyalakan selama 30 menit. Setelah 30 menit, UV dimatikan dan LAF dapat digunakan. Setiap alat yang diletakkan pada meja LAF harus disemprot terlebih dahulu dengan alkohol 70%.

3.5.5 Sterilisasi Biji Delima Hitam

Bahan yang melewati tahap sterilisasi dalam penelitian ini yaitu biji delima hitam (*Punica granatum* L.). Biji delima pertama-tama dibersihkan dari daging buah yang menempel. Biji yang telah bersih kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer ukuran 1 liter dan dialiri air keran selama 60 menit. Setelah itu, biji dicuci dengan 200 ml aquades dan 3 ml detergen cair selama 30 menit menggunakan *magnetic stirrer*. Dilakukan 3 kali pembilasan menggunakan air bersih pada biji yang telah dicuci dengan detergen. Biji kemudian dipindahkan pada gelas beaker yang berisi 200 ml aquades dan 2 ml fungisida kemudian digoyangkan dengan *magnetic stirrer* selama 30 menit. Selanjutnya, biji dimasukkan dalam gelas beaker yang berisi 200 ml aquades dan 2 ml bakterisida serta digoyangkan dengan *magnetic stirrer* selama 30 menit kemudian dibilas dengan air bersih sebanyak 3 kali. Sterilisasi biji selanjutnya dilakukan di dalam LAF.

Tahap pertama sterilisasi dalam LAF yaitu direndam biji dengan larutan clorox 30% selama 15 menit dengan digoyang-goyangkan botol. Selanjutnya, biji dibilas dengan aquades steril selama 5 menit sebanyak 3 kali bilasan. Biji kemudian direndam lagi dengan larutan clorox 10% selama 10 menit dengan digoyang-goyangkan botol. Dibilas kembali biji dengan aquades steril selama 5 menit dan sebanyak 3 kali bilasan. Selanjutnya, biji direndam dengan alkohol 70% selama 2 menit dengan digoyang-goyangkan botol dan dilanjutkan dengan dibilas selama 5 menit menggunakan aquades steril sebanyak 3 kali bilasan.

3.5.6 Inisiasi Tunas

Inisiasi tunas delima hitam yang berasal dari biji yang telah steril dilakukan pada LAF. Biji dipotong melintang menjadi dua bagian menggunakan scalpel steril. Pemotongan ini bertujuan untuk memudahkan embrio untuk menyerap nutrisi pada media. Pemotongan biji ini dilakukan pada cawan petri. Biji hasil pemotongan ditanam pada media inisiasi tunas. Pada setiap kegiatan membuka dan menutup botol media dilakukan didekat api bunsen untuk mencegah kontaminasi. Pada akhir kegiatan inisiasi, botol ditutup plastik tahan

panas dan diikat dengan karet gelang. Biji delima hitam yang telah tertanam pada media kemudian disimpan di ruang inkubasi selama 28 hari. Setelah pada biji muncul lebih dari satu tunas, dilakukan subkultur dengan cara memotong tunas nodus kedua dan ketiga yang kemudian ditanam pada media MS+BA 2,5 mg/l dan selanjutnya disimpan di ruang inkubasi selama 14 hari. Subkultur dilakukan sebanyak dua kali untuk mendapatkan eksplan multiplikasi yang seragam. Setelah melalui dua kali subkultur tunas kemudian ditanam pada media MS 0 dalam waktu 7 hari.

3.5.7 Multiplikasi Tunas Delima Hitam (*Punica granatum* L.)

Tunas yang telah seragam dari hasil subkultur kemudian ditanam pada media perlakuan yaitu MS+1 mg/l TDZ+glutamin dengan konsentrasi sesuai perlakuan. Proses multiplikasi dilakukan pada *Laminar Air Flow* dalam kondisi aseptis. Tunas hasil subkultur dipotong pada bagian nodus kedua dan ketiga menggunakan scalpel yang telah disterilkan dan kemudian ditanam pada media perlakuan. Setiap kegiatan harus dilakukan di dekat api bunsen agar tidak terjadi kontaminasi. Tunas yang digunakan dalam satu botol kultur berjumlah tiga buah. Hasil multiplikasi kemudian diletakkan di ruang inkubasi selama 28 hari dan dilanjutkan dengan proses pengamatan. Untuk mencegah kontaminasi, setiap dua hari sekali dilakukan penyemprotan alkohol 70% pada permukaan botol kultur di ruang inkubasi.

3.5.8 Tahap Pengamatan

Pengamatan dilakukan melalui 2 tahapan yaitu pengamatan harian dan pengamatan akhir, dengan parameter yaitu :

1. Hari Muncul Tunas (HMT)

Hari muncul tunas diamati setiap hari sejak hari pertama penanaman sampai tunas muncul yang ditandai dengan adanya tonjolan tunas berwarna hijau berukuran $\geq 0,5$ mm dan tunas menunjukkan tanda-tanda pertumbuhan ke atas.

2. Jumlah Tunas

Jumlah tunas diamati pada hari ke-28 sejak hari pertama penanaman dengan cara menghitung jumlah tunas yang muncul pada eksplan.

3. Tinggi Tunas

Tinggi tunas diamati pada hari ke-28 sejak hari pertama penanaman dengan cara mengukur tinggi tunas yang muncul pada eksplan menggunakan penggaris.

4. Presentase Tumbuh Tunas

Presentase tumbuh tunas diamati pada hari ke-28 sejak hari pertama penanaman dengan cara menghitung eksplan pada setiap perlakuan yang telah tumbuh tunas dengan ciri-ciri tunas berwarna hijau, ukuran tunas \geq 0,5 mm serta tunas yang muncul menunjukkan tanda-tanda pertumbuhan ke atas. Presentase tumbuh tunas dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ tumbuh tunas} = \frac{\Sigma \text{Eksplan yang tumbuh tunas pada setiap perlakuan}}{\Sigma \text{Seluruh eksplan pada setiap perlakuan}} \times 100\%$$

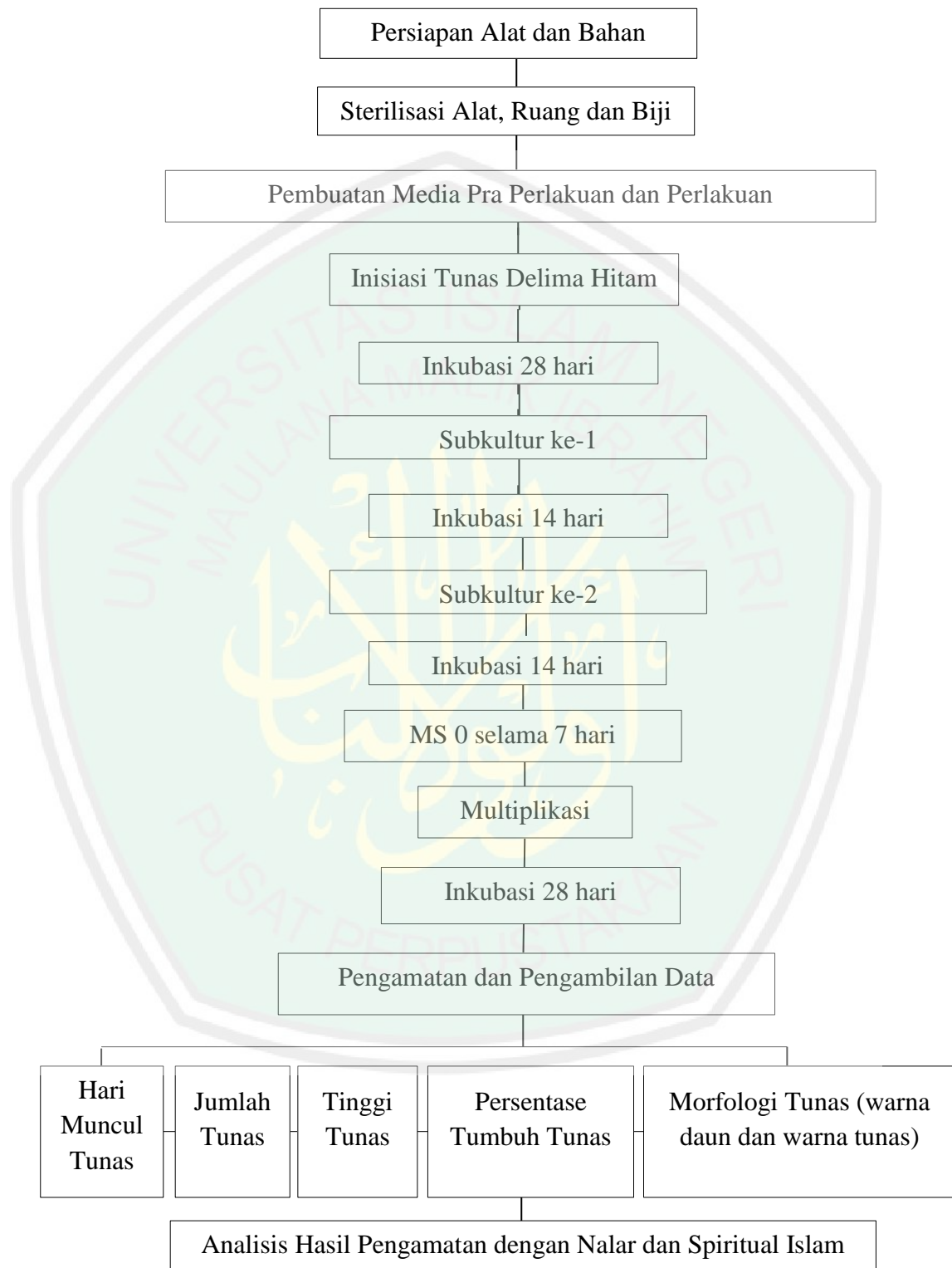
5. Morfologi Tunas

Morfologi tunas diamati pada hari ke-28 sejak hari pertama penanaman dengan cara melihat warna daun dan warna tunas berdasarkan skala warna Pantone Chart.

3.6 Analisis Data

Data hasil pengamatan berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif dianalisis dengan *Analysis of Variant* (ANOVA) satu jalur (*One-way ANOVA*) dan regresi dengan Microsoft Excel 2010 untuk mengetahui konsentrasi glutamin yang optimal untuk multiplikasi tunas delima hitam (*Punica granatum L.*). Apabila pada uji ANOVA terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan taraf 5%. Data hasil penelitian kemudian dianalisis dan diintegrasikan dengan ayat-ayat Al-Quran beserta tafsirnya atau Hadist, sehingga diperoleh hasil penelitian yang sesuai dengan nilai-nilai Islam.

3.7 Desain Penelitian

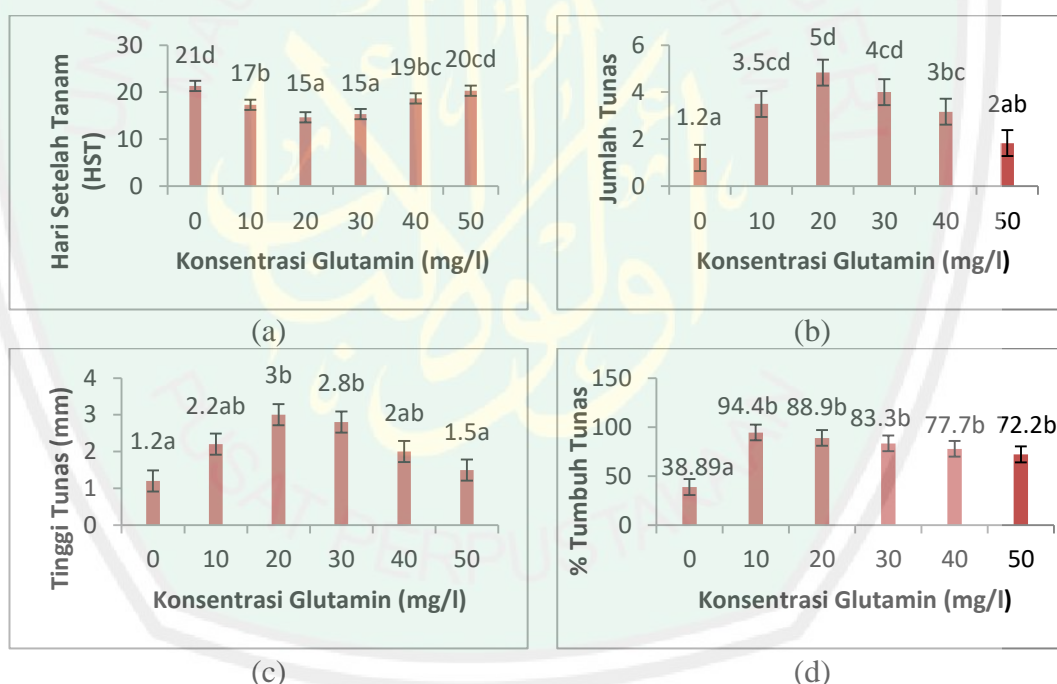


Gambar 3.1 Desain Penelitian

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Konsentrasi Glutamin yang Efektif dan Optimal untuk Hasil Multiplikasi Tunas Delima Hitam (*Punica granatum L.*) secara *In Vitro*

Berdasarkan hasil pengamatan yang dianalisis dengan analisis varian (ANOVA), diperoleh F hitung yang lebih besar dari F tabel pada semua variabel, yaitu hari muncul tunas (HMT), jumlah tunas, tinggi tunas dan persentase tumbuh tunas. Untuk mengetahui beda antar perlakuan sebagai pemberian berbagai konsentrasi glutamin pada multiplikasi tunas delima hitam secara *in vitro*, dilakukan uji lanjut dengan uji DMRT taraf 5% dengan hasil ditunjukkan pada gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil Uji DMRT 5% Pemberian Berbagai Konsentrasi Glutamin pada Multiplikasi Tunas Delima Hitam (*Punica granatum L.*) secara *In Vitro* (a) hari muncul tunas (b) jumlah tunas (c) tinggi tunas (d) persentase tumbuh tunas (keterangan : angka-angka yang diikuti huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan hasil tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%)

Glutamin dengan konsentrasi 20 mg/l merupakan konsentrasi efektif untuk hari muncul tunas pada multiplikasi tunas delima hitam dengan rata-rata muncul tunas yaitu 14,6 HST (Gambar 4.1a). Konsentrasi glutamin 30 mg/l juga

menunjukkan rata-rata muncul tunas yang tidak berbeda nyata dengan hasil dari rata-rata muncul tunas yang diberi glutamin 20 mg/l yaitu sebesar 15,3 HST (Gambar 4.1a). Tunas yang muncul dapat dilihat secara visual yang dicirikan dengan adanya warna hijau menonjol atau agak meruncing dibagian ujungnya. Penggunaan glutamin pada penelitian yang menunjukkan pengaruhnya terhadap waktu muncul tunas telah dilakukan oleh Hamasaki *et al.* (2005). Penelitian Hamasaki menunjukkan bahwa dengan penggunaan glutamin 8 mM pada organogenesis *Ananas comosus*, terlihat tonjolan tunas pada permukaan adaxial eksplan daun setelah 7 hari tanam. Selain itu, pada penelitian Hardjo (2013) juga menunjukkan bahwa dengan penambahan glutamin konsentrasi 25, 50 dan 100 mg/l memunculkan banyak calon tunas yang berasal dari eksplan kalus *Saccharum spp. hybrids* pada awal minggu ketiga dibandingkan perlakuan tanpa glutamin. Penelitian Patil *et al.* (2009) juga menunjukkan inisiasi tunas yang lebih cepat yaitu 7 HST pada multiplikasi tunas chickpea (*Cicer arietinum* L.) dengan penambahan glutamin 5 mM pada media MS+TDZ 1 μ M. Namun, masih belum banyak dilaporkan konsentrasi glutamin yang mempengaruhi waktu muncul tunas pada proses multiplikasi tunas tanaman dikotil secara *in vitro*. Selain itu, kebutuhan glutamin setiap tanaman berbeda-beda, tergantung dari jenis tanaman dan juga kondisi eksplan.

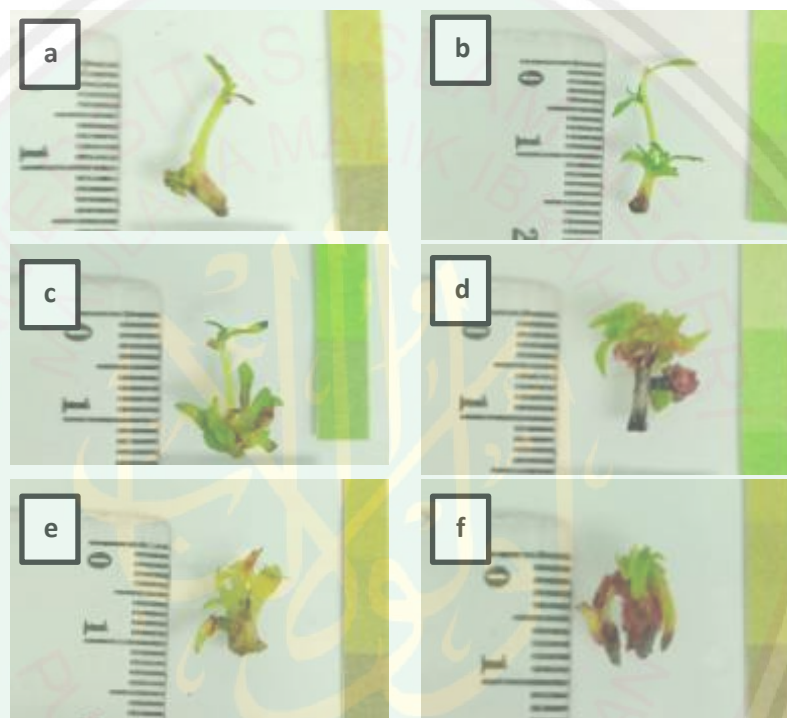
Pemberian glutamin dengan konsentrasi 20 mg/l memberikan hasil efektif untuk variabel jumlah tunas dengan rata-rata jumlah tunas yaitu 5,0 tunas (Gambar 4.1b). Tetapi konsentrasi 10 mg/l dan 30 mg/l juga tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 20 mg/l (Gambar 4.1b). Hal tersebut didukung oleh penelitian Borpuzari & Kachari (2018) pada multiplikasi tunas gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lam.) yang menunjukkan bahwa media dengan komposisi MS+20 mg/l glutamin menghasilkan rata-rata jumlah tunas tertinggi yaitu sebanyak 24,81 tunas daripada perlakuan lain. Kulathuran & Narayanasamy (2015) menambahkan melalui hasil penelitiannya pada pucuk tunas *Ricinus communis* L. bahwa penambahan glutamin 20 mg/l menghasilkan rata-rata jumlah tunas tertinggi yaitu 20,4 tunas daripada perlakuan lain. Siwach *et al.* (2012) dalam penelitiannya juga menyatakan bahwa pada multiplikasi tunas hasil subkultur dari *Citrus reticulata*

Blanco. menghasilkan rata-rata jumlah tunas terbanyak yaitu 7,24 tunas pada perlakuan dengan komposisi media MS+25 mg/l glutamin. Selain itu, pada penelitian multiplikasi nodus *Ocimum basilicum* oleh Shahzad *et al.* (2012), media dengan komposisi MS+30 mg/l glutamin mampu menghasilkan rata-rata jumlah tunas terbanyak yaitu 13,4 tunas daripada perlakuan lain.

Glutamin dengan konsentrasi 20 mg/l memberikan hasil efektif untuk variabel tinggi tunas dengan rata-rata tinggi tunas yaitu 3,0 mm (Gambar 4.1c). Tetapi konsentrasi 10 mg/l dan 30 mg/l juga tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata (Gambar 4.1c). Hasil tersebut didukung dengan penelitian Greenwell & Ruter (2018) yang menyatakan bahwa penggunaan glutamin dengan konsentrasi berbeda yaitu 0 g/l, 0,01 g/l, 0,05 g/l, 0,1 g/l dan 0,5 g/l pada eksplan tunas *Hibiscus moscheutos* menunjukkan bahwa setelah tujuh minggu, perlakuan 0,01 g/l glutamin menghasilkan tunas tertinggi yaitu 5,8 cm. Sharma *et al.* (2014) pada penelitian multiplikasi tunas *Decalepis hamiltonii* menunjukkan bahwa konsentrasi glutamin 30 mg/l mampu menghasilkan rata-rata tinggi tunas tertinggi yaitu 6,22 cm. Selain itu, Siwach *et al.* (2012) menyatakan bahwa pada multiplikasi tunas *Citrus reticulata* Blanco. dengan penggunaan 25 mg/l glutamin menghasilkan rata-rata tinggi tunas tertinggi yaitu 4,13 cm. Namun, meningkatnya jumlah tunas pada multiplikasi tunas delima hitam ini tidak diikuti dengan tinggi tunas. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Ramesh & Ramassamy (2014) yang menyatakan bahwa tinggi tanaman berbanding terbalik dengan jumlah tunas yang muncul, sehingga semakin sedikit tunas yang muncul, maka tinggi tanaman semakin meningkat dan sebaliknya, hal ini karena energi yang dibutuhkan untuk pemanjangan tunas digunakan untuk pembentukan calon tunas lainnya, sehingga tinggi tunas dapat mengalami penghambatan. Selain itu, waktu pengamatan yang kurang juga dapat menyebabkan hasil tunas masih belum menunjukkan tinggi yang maksimal.

Pemberian glutamin dengan konsentrasi 20 mg/l memberikan hasil efektif untuk variabel persentase tumbuh tunas dengan rata-rata persentase tumbuh tunas sebesar 88,9% (Gambar 4.1d). Penelitian Mookkan (2015) dengan eksplan nodus kotiledon *Cucurbita pepo* L. menunjukkan bahwa penambahan glutamin dengan

konsentrasi 15 mg/l menghasilkan persentase tunas beregenerasi paling besar yaitu 97%. Penelitian Shahzad *et al.* (2012) juga menunjukkan bahwa pada multiplikasi *Ocimum basilicum* dengan penambahan 30 mg/l glutamin pada media MS+BA menghasilkan persentase respon tunas tertinggi yaitu 100%. Selanjutnya, Kulathuran & Narayanasamy (2015) pada regenerasi tunas *Ricinus communis* L. menunjukkan bahwa dengan penambahan glutamin 20 mg/l mampu menghasilkan persentase respon tunas tertinggi yaitu 41% daripada perlakuan lain.

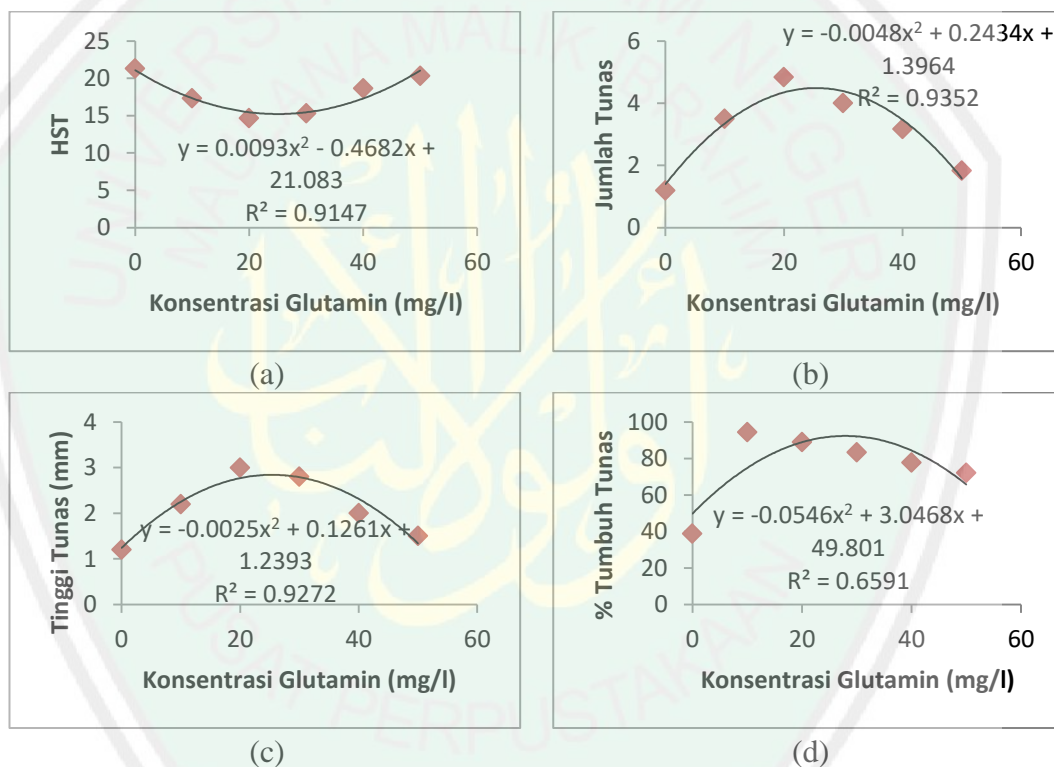


Gambar 4.2 Hasil Multiplikasi Tunas Delima Hitam (*Punica granatum* L.) pada Hari ke-28 (a) glutamin 0 mg/l (b) glutamin 10 mg/l (c) glutamin 20 mg/l (d) glutamin 30 mg/l (e) glutamin 40 mg/l (f) glutamin 50 mg/l

Tunas yang terbentuk pada penelitian ini menunjukkan keberhasilan regenerasi dari eksplan yang ditanam secara *in vitro*. Hal ini dikarenakan semakin cepat tunas muncul maka akan semakin cepat juga mendapatkan bibit yang banyak. Remita *et al.* (2013) menyatakan bahwa untuk memacu pertumbuhan tunas pada eksplan diperlukan asam amino. Glutamin merupakan salah satu asam amino yang ditambahkan pada media kultur *in vitro* yang berfungsi sebagai salah satu donor nitrogen organik. Fungsi nitrogen baik dalam bentuk ammonia, nitrat dan gas nitrogen sebagai sumber nitrogen anorganik serta asam amino sebagai

suplemen nitrogen anorganik pada tanaman yaitu mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Pada tanaman yang tumbuh pada lingkungan alami, tanaman menyerap nitrogen dari atmosfer maupun nitrat yang diserap dari tanah. Sebelum diangkut ke jalur metabolisme, nitrogen dan nitrat tersebut perlu direduksi menjadi ammonia terlebih dahulu (Canovas *et al.*, 1998).

Untuk mengetahui konsentrasi optimum dari glutamin untuk multiplikasi tunas delima hitam secara *in vitro* maka dilakukan analisis regresi. Hasil analisis regresi pengaruh pemberian glutamin terhadap 4 variabel kuantitatif tersaji pada gambar 4.3.



Gambar 4.3 Hasil analisis regresi penggunaan glutamin terhadap (a) hari muncul tunas (HMT), (b) jumlah tunas, (c) tinggi tunas dan (d) persentase tumbuh tunas pada multiplikasi tunas delima hitam (*Punica granatum* L.) secara *in vitro*

Perhitungan dari persamaan $y = 0,0093x^2 - 0,4682x + 21,083$ pada hari muncul tunas (HST), dicapai titik tertinggi pada koordinat (25,17 : 15,19) (Gambar 4.3a). Hal tersebut menunjukkan bahwa glutamin dengan konsentrasi 25,17 mg/l menyebabkan waktu muncul tunas paling cepat yaitu 15,19 HST. Perhitungan persamaan $y = -0,0048x^2 + 0,2454x + 1,369$ pada jumlah tunas, dicapai titik tertinggi pada koordinat (25,56 : 4,51) (Gambar 4.3b). Hal tersebut menunjukkan bahwa

glutamin dengan konsentrasi 25,56 mg/l menyebabkan jumlah tunas paling banyak yaitu 4,51 tunas per eksplan. Selanjutnya, perhitungan dari persamaan $y = -0,0025x^2 + 0,1261x + 1,2393$ pada tinggi tunas, dicapai titik tertinggi pada koordinat (25,22 : 2,82) (Gambar 4.3c). Hal tersebut menunjukkan bahwa glutamin dengan konsentrasi 25,22 mg/l menyebabkan tinggi tunas dengan nilai paling tinggi yaitu 2,82 mm. Sedangkan, perhitungan dari persamaan $y = -0,0546x^2 + 3,0468x + 49,801$ pada persentase tumbuh tunas, dicapai titik tertinggi pada koordinat (27,90 : 92,31) (Gambar 4.3d). Hal tersebut menunjukkan bahwa glutamin dengan konsentrasi 27,90 mg/l menyebabkan persentase tumbuh tunas optimal dengan nilai paling tinggi yaitu sebesar 92,31%.









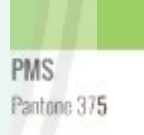



Berdasarkan kurva regresi yang terbentuk, pada semua variabel pengamatan menunjukkan kurva yang terus mengalami peningkatan sampai titik konsentrasi 0-30 mg/l. Kemudian kurva mengalami penurunan pada konsentrasi 40 mg/l. Peningkatan kurva tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi glutamin yang diberikan pada eksplan memberikan respon baik dan sebaliknya, kurva yang mengalami penurunan menandakan terjadinya penghambatan pertumbuhan eksplan yang diakibatkan oleh penambahan konsentrasi glutamin yang terlalu tinggi.

4.2 Pengaruh Pemberian Berbagai Konsentrasi Glutamin terhadap Morfologi Tunas Delima Hitam (*Punica granatum L.*) secara *In Vitro*

Multiplikasi tunas delima hitam dengan penambahan beberapa konsentrasi glutamin secara *in vitro* menunjukkan respon morfologi yaitu warna daun dan warna tunas yang berbeda-beda pada proses pengamatan selama 28 hari.

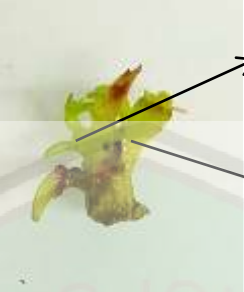



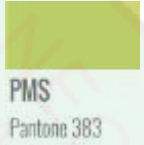

Eksplan yang ditanam pada media dengan konsentrasi glutamin 0 mg/l selama 28 hari menunjukkan ada beberapa daun pada eksplan yang berwarna hijau kekuningan kemudian rontok. Pada perlakuan 0 mg/l glutamin ini tunas baru dapat diamati pada hari ke-28 dengan hasil tunas berwarna kekuningan dengan ukuran 1 mm. Pemberian 0 mg/l glutamin pada media multiplikasi ini tidak menyebabkan eksplan membentuk kalus (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Hasil Pengamatan Morfologi Tunas Hasil Multiplikasi pada Hari ke-28

Konsentrasi Glutamin	Dokumentasi	Skala Warna Pantone Chart	
		Warna Daun	Warna Tunas
0 mg/l			
10 mg/l			
20 mg/l			
30 mg/l			

(Skala warna berdasarkan Pantone Chart)

Keterangan : t = tunas, d = daun dan k = kalus

Konsentrasi Glutamin	Dokumentasi	Skala Warna Pantone Chart	
		Warna Daun	Warna Tunas
40 mg/l			
50 mg/l			

(Skala warna berdasarkan Pantone Chart)

Keterangan : t = tunas, d = daun dan k = kalus

Eksplan yang ditanam pada media dengan konsentrasi 10 mg/l menunjukkan eksplan yang masih segar dan berwarna hijau (Tabel 4.1). Eksplan pada konsentrasi 10 mg/l ini menunjukkan tunas yang berwarna hijau tetapi masih dalam ukuran ≥ 1 mm. Hal ini sesuai dengan pernyataan Greenwell dan Ruter (2018) yang menyatakan bahwa penambahan glutamin 10 mg/l dapat mencegah nekrosis daun daripada perlakuan tanpa glutamin.

Media dengan konsentrasi glutamin 20 mg/l pada akhir pengamatan menunjukkan hasil eksplan yang hijau segar dan daun berwarna hijau. Tunas yang dihasilkan pada glutamin 20 mg/l ini berukuran kecil dan berwarna hijau. Eksplan dan tunas yang berwarna hijau menunjukkan adanya klorofil. Perlakuan 30 mg/l glutamin menunjukkan hasil eksplan dan daun yang hijau segar serta menghasilkan tunas berukuran kecil tetapi berwarna hijau (Tabel 4.1). Rozali *et al.* (2014) menyatakan bahwa media multiplikasi yang ditambahkan glutamin akan menghasilkan tunas dengan warna hijau terang dengan persentase daun nekrosis yang rendah.

Perlakuan 40 mg/l glutamin, menunjukkan hasil beberapa eksplan yang masih hijau segar dan beberapa eksplan yang daunnya berwarna kuning kecoklatan. Daun dan batang yang dekat dengan media membentuk kalus berwarna ungu kemerahan, sedangkan tunas yang dihasilkan berukuran kecil dan berwarna hijau. Selanjutnya, pada perlakuan 50 mg/l glutamin menunjukkan hasil eksplan yang sebagian besar daunnya berwarna kuning kecoklatan kemudian rontok, tetapi beberapa tunas baru tetap muncul dari ketiak dengan warna hijau. Konsentrasi glutamin 50 mg/l ini menyebabkan batang dan daun yang tidak rontok membentuk kalus (Tabel 4.1). Hal ini sesuai dengan hasil beberapa penelitian yang menyatakan bahwa konsentrasi glutamin yang tinggi digunakan untuk pembentukan kalus pada tanaman dikotil. Hal ini sesuai dengan pernyataan Busaidi (2016) yang menunjukkan bahwa glutamin dengan konsentrasi 400 mg/l mampu membentuk kalus dengan persentase tertinggi pada *Mangifera indica* L. cv. Baramasi. Selain itu, Magdum & Kumar (2013) juga menyatakan bahwa penambahan glutamin 50 mg/l mampu membentuk kalus dengan persentase 81%.

4.3 Dialog Hasil Penelitian dalam Integrasi Sains dan Islam

Tanaman yang telah diciptakan Allah SWT tersirat berbagai ilmu yang seharusnya manusia pahami, mulai dari proses penciptaannya, bagaimana tanaman mendapatkan nutrisi, bagaimana tanaman berkembangbiak, serta bagaimana proses fisiologis lain yang terjadi dalam tanaman. Selain itu, dari berbagai macam tanaman tersebut tidak ada yang diciptakan tanpa manfaat. Salah satu tanaman yang memiliki manfaat karena kandungan fitokimianya adalah delima (*Punica granatum* L.).

Senyawa bioaktif dari delima mampu menunjukkan sifat antimikroba, menurunkan tekanan darah serta mampu memerangi penyakit lain seperti diabetes dan kanker (Kahramanoglu & Usanmaz, 2016). Selain itu, vitamin, mineral dan asam folat yang terkandung dalam delima juga mampu meningkatkan kekebalan tubuh (Bhowmik *et al.*, 2013). Hal ini membuktikan bahwa Maha Besar dan Maha Pengasih Allah SWT yang telah menciptakan tanaman delima lengkap dengan kandungan fitokimianya yang memiliki potensi sebagai obat. Namun, budidaya

secara konvensional pada delima masih memiliki kendala sehingga menjadikan tanaman delima saat terdaftar pada *Red List* IUCN dengan status *Least Concern*. Adanya permasalahan tersebut sudah menjadi tugas manusia sebagai *khalifah* di muka bumi untuk memikirkan solusi dari masalah yang muncul. Sehingga dengan akal dan pikiran serta ilmu pengetahuan yang semakin berkembang dapat ditemukan solusi untuk menjaga dan melestarikan tanaman delima melalui kultur *in vitro*.

Metode kultur *in vitro* menggunakan media tanam buatan yang komposisinya disesuaikan dengan kebutuhan tanaman. Kultur *in vitro* mengkondisikan kehidupan tanaman seperti pada habitat aslinya dengan cara mengatur lingkungan tumbuh hasil kultur secara aseptis. Media kultur *in vitro* juga tidak jarang diberikan suatu faktor penunjang yang dapat mempengaruhi pertumbuhan suatu tanaman. Salah satu faktor penunjang yang biasanya ditambahkan pada media kultur yaitu asam amino seperti glutamin. Konsentrasi glutamin pada media disesuaikan dengan kebutuhan dan tujuan pertumbuhan suatu tanaman. Penambahan glutamin dengan konsentrasi yang sesuai akan mempercepat dan memperbanyak tunas yang tumbuh dan sebaliknya, penambahan konsentrasi glutamin yang tidak sesuai dapat mengganggu proses fisiologis pada tanaman.

Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an surah Al-Qamar ayat 49 yang berbunyi :

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

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

Menurut Al-Sheikh (1994) dalam tafsir Ibnu Katsir menjelaskan bahwa segala sesuatu yang Allah SWT ciptakan sesuai dengan ukuran dan ketetapanNya. Allah SWT menciptakan segala sesuatu disertai dengan ketetapan takdirnya. Hal ini sesuai dengan penelitian ini yang menunjukkan bahwa penggunaan beberapa konsentrasi glutamin untuk multiplikasi subkultur tunas delima hitam secara *in vitro* menunjukkan beberapa respon pada eksplan. Penggunaan glutamin dengan konsentrasi 20 mg/l merupakan konsentrasi yang efektif untuk parameter hari muncul tunas (HMT) yaitu 14,6 HST, jumlah tunas dengan rata-rata jumlah tunas

4,8 tunas, tinggi tunas dengan rata-rata tinggi tunas 3,0 mm dan persentase tumbuh tunas sebesar 88,9%. Selain itu, hasil pengamatan morfologi juga menunjukkan bahwa glutamin konsentrasi 10-30 mg/l juga menghasilkan tunas dan daun yang berwarna hijau daripada perlakuan lain. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa untuk mempercepat dan memperbanyak pertumbuhan tunas delima hitam pada proses multiplikasi dibutuhkan konsentrasi yang sesuai.

Hasil dari penelitian ini merupakan wujud keagungan Allah SWT. Dalam hal ini manusia tidak bermaksud menandingi kuasa Allah SWT. Biji delima hitam yang ditanam secara *in vitro* atas ridhoNya mampu tumbuh dengan baik yang akan digunakan sebagai eksplan multiplikasi. Kemudian hasil multiplikasi tunas dengan penambahan glutamin menunjukkan pertumbuhan beberapa tunas yang berasal dari tunas kecil menjadi tunas yang lebih tinggi dalam waktu relatif singkat. Dari hal tersebut Allah SWT telah menunjukkan kasih sayangNya melalui pertumbuhan tanaman delima hitam yang tumbuh dalam botol. Maha Suci Allah atas segala ciptaanNya. Allah berfirman dalam Al-Qur'an surah Al-Insyiqaq ayat 19 yang berbunyi :

لَتَرْكَبُنَّ طَبَقًا عَن طَبَقٍ ﴿١٩﴾

Artinya : “*Sesungguhnya kamu melalui tingkat demi tingkat (dalam kehidupan).*”
(QS. Al-Insyiqaq/ 84 : 19).

Menurut Imam al-Bikhari diriwayatkan dari Mujahid dala tafsir Ibnu Katsir (2007) bahwa Ibnu Abbas mengatakan “*sesungguhnya kamu melalui tingkat demi tingkat (dalam kehidupan)*” yang berarti sesuatu dadi perubahan ke perubahan lain. Apabila hal tersebut ada pada tanaman, maka tingkat demi tingkat ini dapat dilihat dari pertumbuhan suatu tanaman, yang pada penelitian ini dapat dilihat pada pertumbuhan biji menjadi tunas kemudian berlanjut ke tunas yang akan bertambah banyak jumlahnya karena ada tahap multiplikasi.

Dari penelitian ini sudah sepatutnya manusia meningkatkan keimanan dan ketaqwaan pada Allah SWT. Segala ciptaanNya di muka bumi ini semata-mata untuk kepentingan dan kesejahteraan seluruh makhluknya terutama manusia.

Namun tetap perlu diingat, manusia juga harus tetap berperan sebagai ilmuwan muslim yang selalu menjaga etikanya dalam melakukan penelitian.

Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an surah Al-Baqarah ayat 30 yang berbunyi :

وَإِذْ قَالَ رَبُّكَ لِلْمَلٰٓئِكَةِ اِنِّىْ جَاعِلٌ فِى الْاَرْضِ خَلِيْفَةًۭۙ قَالُوْۤا اَجْعَلْ فِىْهَا مَنْ يُّفْسِدُ فِىْهَا وَيَسْفِكُ الدِّمَآءَ
وَنَحْنُ نُسَبِّحُ بِحَمْدِكَ وَنُقَدِّسُ لَكَۙ قَالَ اِنِّىْۤ اَعْلَمُ مَا لَا تَعْلَمُوْنَۙ ﴿٣٠﴾

Artinya : *“dan (ingatlah) ketika Tuhanmu berfirman kepada para malaikat : “sesungguhnya Aku hendak menjadikan seorang khalifah di muka bumi.” mereka berkata : “mengapa Engkau hendak menjadikan (khalifah) di bumi itu orang yang akan membuat kerusakan padanya dan menumpahkan darah, padahal kami senantiasa bertasbih dengan memuji Engkau dan mensucikan Engkau ?” Tuhan berfirman : “sesungguhnya aku mengetahui apa yang tidak kamu ketahui.” (QS. Al-Baqarah/ 2 : 30).*

Dalam surah Al-Baqarah ayat 30 menjelaskan bahwa manusia adalah makhluk pilihan Allah SWT yang diberi gelar sebagai *khalifah* di bumi. Maksud dari *khalifah* adalah makhluk Allah SWT yang dipercaya mampu menjalankan kehendak dan menerapkan ketetapan-ketetapan Allah SWT. Dengan karunia akal dan pikiran serta ilmu pengetahuan manusia diharapkan tidak melalukan kerusakan di muka bumi dan dapat mengemban amanatnya sebagai *khalifah* (Al-Maraghi, 1985). Dari ayat ini sudah jelas bahwa dari penelitian ini diharapkan manusia lebih meningkatkan keimanan, ketaqwaan, menjaga semua ciptaanNya dan menjaga tingkah lakunya untuk selalu mendekati diri kepadaNya. Apabila tidak bisa memperlajari proses perbanyakan tanaman secara keilmuan, maka cukup dengan tidak mengeksploitasi tanaman yang ada di muka bumi, karena hal ini bukanlah cerminan dari seorang diri *khalifah*.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dari multiplikasi subkultur tunas delima hitam (*Punica granatum*) menggunakan asam amino glutamin secara *in vitro*, dapat disimpulkan bahwa :

1. Konsentrasi glutamin 20 mg/l efektif untuk semua variabel multiplikasi tunas, yaitu hari muncul tunas (HMT) dengan rata-rata muncul tunas 14,6 HST, jumlah tunas dengan rata-rata jumlah tunas 4,8 tunas per eksplan, tinggi tunas dengan rata-rata tinggi tunas 3,0 mm dan persentase tumbuh tunas dengan persentase sebesar 88,9%. Konsentrasi optimal untuk hari muncul tunas (HMT) yaitu 25,17 mg/l dengan waktu muncul tunas 15,19 HST, untuk jumlah tunas yaitu 25,56 mg/l dengan rata-rata jumlah tunas 4,51 tunas, untuk tinggi tunas yaitu 25,22 mg/l dengan rata-rata tinggi tunas 2,82 mm dan untuk persentase tumbuh tunas yaitu 27,90 mg/l dengan persentase tumbuh tunas sebesar 92,31%.
2. Pemberian asam amino glutamin pada rentang konsentrasi 10-30 mg/l menunjukkan tunas berwarna hijau muda, daun berwarna hijau tua dan tidak membentuk kalus.

5.2 Saran

Saran dari penelitian ini yaitu :

1. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai kriteria tunas hasil dari subkultur yang baik digunakan untuk multiplikasi.
2. Diperlukan penelitian lanjutan dengan interval konsentrasi glutamin yang lebih kecil untuk mengetahui respon dari eksplan dalam hal pembentukan tunas pada proses multiplikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. 1983. **Dasar-dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh**. Bandung : Angkasa.
- Aini, M. 2018. Pengaruh Skarifikasi Kimia dengan H₂SO₄ dan GA₃ terhadap Perkecambahan dan Pertumbuhan Tanaman Delima Hitam (*Punica granatum* L.). *Skripsi*. Malang : Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Akter, S., Sarker, A. & Hossain, M. S. 2013. Antidiarrhoeal Activity of Rind of *Punica granatum*. *International Current Pharmaceutical Journal*. Vol. 2. No. 5.
- Al-Jazairi, Abu Bakar Jabir. 2008. **Tafsir Al-Aisar Jilid 4**. Jakarta : Darus Sunah Press.
- Al-Maraghi, A. M. 1985. **Tafsir Al-Maraghi (Terjemahan)**. Juz 15. Semarang : Toha Putra.
- Al-Maraghi, A. M. 1993. **Tafsir Al-Maraghi**. Diterjemahkan oleh Abubakar, B., Aly, H. N. & Sitanggal, A. U. Semarang : Toha Putra.
- Al-Sheikh, A. 1994. **Tafsir Ibnu Katsir Jilid 6 (diterjemahkan oleh Ghoffar, M)**. Kairo : Mu'assasah Daar al-Hilaal.
- Andriani, V. 2015. Karakterisasi Anatomi dan Aktivitas Antioksidan Delima (*Punica granatum* L.). *Tesis*. Yogyakarta : Universitas Gadjah Mada.
- Angiosperm Phylogeny Group [APG]. 2003. An Update of The Angiosperm Phylogeny Group Classification for The Orders and Families of Flowering Plants : APG II. *Botanical Journal of The Linnean Society*.
- An-Najjar, Z. 2011. **Sains dalam Hadist**. Jakarta : Bumi Aksara.
- Ardekani, M. R. S., Hajimahmoodi, M., Oveisi, M. R., Sadeghi, N., Jannat, B., Ranjbar, A. M., Gholam, N. & Moridi, T. 2011. Comparative Antioxidant Activity and Total Flavonoid Content of Persian Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. Vol. 10. No. 3.
- Armini, N. M., Wattimena, G. A. & Gunawan, L. W. 1992. *Perbanyakan Tanaman Bioteknologi Tanaman Laboratorium Kultur Jaringan*. Bogor : Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor.
- Baday, S. J. S. 2018. Plant Tissue Culture. *International Journal of Agriculture and Environmental Research*. Vol. 4. No. 4.

- Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B. P., Duraivel, S., Aravind, D. & Kumar, K. P. S. 2013. Medicinal Uses of *Punica granatum* and Its Health Benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. Vol. 1. No. 5.
- Bora, G., Gogoi, H. K. & Handique, P. J. 2018. Influence of Silver Nitrate and Glutamine on In Vitro Organogenesis of Lota Bhot (*Capsicum chinense* Jacq.) an Indigenous Pungent Pepper Variety of Assam. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. Vol. 7. No. 1.
- Borpuzari, P. P. & Kachari, J. 2018. Effect of Glutamine for High Frequency *In Vitro* Regeneration of *Aquilaria malaccensis* Lam. Through Nodal Culture. *Journal of Medicinal Plant Studies*. Vol. 6. No. 2.
- Buitevelds, J., Molenaar, P. F. R. J. C. & Hooymans, C. M. J. 1993. Callus Induction and Plant Regeneration from Explant of Commercial Cultivars of Leek (*Allium ampeloprasum* var. *Porrium* L.). *Plant Cell Report*. Vol. 2.
- Busaidi, K. T., Shukla, M., Burashdi, A. H., Blushi, G. S., Jabri, M. H., Kalbani, B. S & Hasani, H. D. 2016. In Vitro Regeneration of Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Baramasi through Nucellar Embryogenesis. *Journal of Horticulture and Forestry*. Vol. 8. No. 5.
- Campbell, N. A. 2004. **Biologi Edisi 5 Jilid 2**. Jakarta : Erlangga.
- Canovas, F. M., Canton, F. R., Garcia, G. A., Gallardo, F. & Crespillo, R. 1998. Molecular Physiology of Glutamine and Glutamate Biosynthesis in Developing Seedlings of Conifers. *Physiologia Plantarum*. Vol. 103.
- Chandra, R., Babu, K. D., Jadhav, V. T. & Silva, J. A. T. 2010. Origin, History and Domestication of Pomegranate. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*. Vol. 4. No. 2.
- Chellamuthu, V. R., Ermilova, E., Lapina, T., Luddecke, J., Minaeva, E., Hermann, C., Hartmann, M. D. & Forchhammer, K. 2014. A Widespread Glutamine Sensing Mechanism in The Plant Kingdom. *Cell*. Vol. 159. 1188-1199.
- Chieng, L. M. N., Chen, T. Y., Sim, S. L. & Goh, D. K. S. 2014. **Induction Organogenesis and Somatic Embryogenesis of *Gonystylus bancanus* (Miq.) Kurz (Ramin) in Sarawak**. Malaysia : Sarawak Corporation & ITTO.
- Corlett, T. R. 2016. Plant Diversity In a Changing World : Status, Trend, and Conservation Needs. *Plant Diversity*. 38. 10-16.
- Dar, R. A., Shahnawaz, M. & Qazi, P. H. 2017. General Overview of Medicinal Plants : A Review. *The Journal of Phytopharmacology*. Vol. 6. No. 6.

- Das, A. & Mandal, N. 2010. Enhanced Development of Embryogenic Callus in *Stevia rebaudiana* Bert. by Additive and Amino Acids. *Biotechnology*. 1-5.
- Deepika, R. & Kanwar, K. 2010. *In Vitro* Regeneration of *Punica granatum* L. Plants From Different Juvenile Explants. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. Vol. 18. No. 1.
- Devidas, T., Sharad, T. & Nagesh, D. 2017. Multiple Shoot Induction of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Through Different Juvenile Explants. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. Vol. 17. No. 1.
- Dipak, G., Axay, P., Manodeep, C. & Jagdish, K. V. 2012. Phytochemical and Pharmacological Profile of *Punica granatum* : On Overview. *International Research Journal of Pharmacy*. Vol. 3. No. 2.
- Faria, A. & Calhau, C. 2011. The Bioactivity of Pomegranate : Impact on Health and Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 51. 626-634.
- Fathi, H. & Jahani, U. 2012. Review of Embryo Culture in Fruit Trees. *Annals of Biological Research*. Vol. 3. No. 9.
- Fitriani, D., Miswar & Sholikhah, U. 2015. Pengaruh Pemberian Asam Amino (Glisin, Sistein dan Arginin) terhadap Pembentukan Tunas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Secara *In Vitro*. *Berkala Ilmiah Pertanian*. Vol. 10. No. 10.
- Gabory, M. T. E. & Abady, I. W. 2018. Effect of Glutamine and Polyamines in Micropropagation of Strawberry Plants. *Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*. Vol. 11. No. 5.
- George, E. F. & Sherrington, P. O. 1984. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. London : Exegetics Limited.
- George, E. F. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture Part 1. 2nd Edition**. England : Exegetics Limited.
- George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G. 2008. **Micropropagation : Uses and Methods in Plant Propagation By Tissue Culture, 3rd Edition**. Dordrecht : Springer. 29-65.
- George, E. F., Hall, M. A. & De Klerk, G. J. 2007. **Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition**. UK : Exegetic Basingstone.
- Graham, S. A. & Graham, A. 2014. Ovary, Fruit and Seed Morphology of The Lythraceae. *International Journal of Plant Sciences*. Vol. 175. No. 2.

- Greenwell, Z. L. & Ruter, J. M. 2018. Effect of Glutamine and Arginine on Growth of *Hibiscus moscheutos* "In Vitro". *Ornamental Horticulture*. Vol. 24. No. 4.
- Gunawan, L. W. 1988. **Budidaya Anggrek**. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Gunawan, L. W. 1992. **Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan**. Laboratorium Kultur Jaringan. Bogor : IPB Press.
- Gunawan, L. W. 1995. **Teknik Kultur Jaringan (In Vitro) dalam Hortikultura**. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Gunawan, L. W. 1998. **Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan**. Jakarta : Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. 304.
- Hadjo, P. H. 2013. Perbanyak Mikro Tebu (*Saccharum* spp. hybrids) Melalui Kultur Kalus. *Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi*. Vol. 7. No. 1.
- Hamasaki, R. M., Purgatto, E. & Mercier, H. 2005. Glutamine Enhances Competence for Organogenesis in Pineapple Leaves Cultivated In Vitro. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. Vol. 17. No. 4.
- Haque, N., Sofi, G., Ali, W., Rashid, M. & Itrat, M. 2015. A Comprehensive Review of Phytochemical and Pharmacological Profile of Annar (*Punica granatum* Linn) : A Heaven's Fruit. *Journal of Ayuverdic and Herbal Medicine*. Vol. 1. No. 1.
- Harahap, F. & Nusirwan. 2012. Induksi Pertumbuhan Nanas (*Ananas comosus* L.) In Vitro Asal Pangaribuan dengan Pemberian Zat Pengatur Tumbuh Kinetin. *Prosiding Seminar dan Rapat Tahunan*. Universitas Negeri Medan.
- Haroun, S. A., Shukry, W. M. & El-Sawy, O. 2010. Effect of Asparagine or Glutamine on Growth and Metabolic Changes in *Phaseolus vulgaris* Under In Vitro Conditions. *Bioscience Research*. Vol. 7. No. 1.
- Hendaryono, D. P. S. & Wijayani, A. 1994. **Teknik Kultur Jaringan : Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman secara Vegetatif Moderen**. Yogyakarta : Kanisius.
- Hernawati, S. 2015. Ekstrak Buah Delima sebagai Alternatif Terapi Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS). *Stomatognatic*. Vol. 12. No. 1.
- Hidayat, E. B. 1995. **Anatomi Tumbuhan Berbiji**. Bandung : ITB Press.
- Holland, D., Hatib, K. & Bar-Ya'akov, I. 2009. Pomegranate : Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural Reviews*. Vol. 35.
- Hui-mei, W., Hong-mei, L., Wen-jie, W. & Yuan-gang, Z. 2008. Effects of Thidiazuron, Basal Medium and Light Quality on Adventitious Shoot

- Regeneration from In Vitro Culture Stem of *Populus alba* x *P.berolinensis*. *Journal of Forestry Research*. Vol. 19. No. 3.
- Ibnu Katsir. 2004. **Tafsir Ibnu Katsir Surat Ar-Rahman Juz 27**. Bogor : Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Ibnu Katsir. 2007. **Tafsir Ibnu Katsir Jilid 5**. Bogor : Pustaka Imam As-Syafi'i.
- Ibrahim, A. B., Heredia, F. F., Pinheiro, C. B., Aragao, F. J. L. & Campos, F. A. P. 2008. Optimization of Somatic Embryogenesis and Selection Regimes for Particle Bombardment of Friable Embryogenic Callus and Somatic Cotyledons of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). *African Journal of Biotechnology*. Vol. 7. No. 16.
- Idowu-Akin, P. E., Ibitoye, D. O. & Ademoyegun, O. T. 2009. Tissue Culture As a Plant Production Technique for Horticultural Crops. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 8. No. 16.
- Indrianto, A. 2002. **Bahan Ajar Kultur Jaringan Tumbuhan**. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Ireland, R. J. & Lea, P. J. 1999. *The Enzyme of Glutamine, Glutamate, Asparagine and Aspartate Metabolism*. Singh BK (ed) Plant Amino Acids : Biochemistry and Biotechnology. New York : Marcel Dekker.
- Jacob, J., Rajiv, P. & Laksmanaperumalsamy, P. 2019. An Overview of Phytochemical and Pharmacological Potentials of *Punica granatum* L. *Pharmacognosy Journal*. Vol. 11. No. 5.
- Kahramanoglu, I. & Usanmaz, S. 2016. **Pomegranate Production and Marketing**. Ebook. New York : CRC Press.
- Kan, C. C., Chung, T. Y., Juo, Y. A. & Hsieh, M. H. 2015. Glutamine Rapidly Induces The Expression of Key Transcription Factor Genes Involved in Nitrogen and Stress Responses in Rice Roots. *BioMedCentral (BMC) Genomics*. Vol. 16. 731.
- Kara, N. & Baydar, H. 2012. Effects of Different Explants Sources on Micropropagation in Lavender (*Lavandula* sp.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. Vol. 15. No. 2.
- Kartha, K. K. 1982. *Organogenesis dan Embriogenesis dalam Wetter, L. R. & Constabel, F. Metode Kultur Jaringan Tanaman*. Diterjemahkan Oleh Mathilda B. Widodo. Bandung : ITB Press.
- Khan, N. H., Ying, A. L. T., Tian, C. G. Z., Yi, O. W. & Vijayabalan, S. 2017. Screening of *Punica granatum* Seeds for Antibacterial and Antioxidant Activity with Various Extracts. *Journal Biotechnology and Phytochemistry*. Vol. 1. No. 1.

- Khasanah, N. 2011. Kandungan Buah-buahan dalam Al-qur'an : Buah Tin (*Ficus carica* L.), Zaitun (*Olea europea* L.), Delima (*Punica granatum* L.), Anggur (*Vitis vinifera* L.) dan Kurma (*Phoenix dactylifera* L.) untuk Kesehatan. *Jurnal Phenomenon*. Vol. 1. No. 1.
- Kia, F. J., Lorigooini, Z. & Khoei, H. A. 2018. Medicinal Plants : Past History and Future Perspective. *Journal of Herbmmed Pharmacology*. Vol. 7. No. 1.
- Kulathuran, G. K. & Narayanasamy, J. 2015. A Comparative Study of PGRs and Pluronic F68, A Surfactant on In Vitro Regeneration of Castor (*Ricinus communis* L.) Using Shoot Tip and Cotyledonary Node Explant. *International Journal of Current Biotechnology*. Vol. 3. No. 9.
- Kumar, N. & Reddy, M. P. 2011. In Vitro Plant Propagation : A Review. *Journal of Forest Science*. Vol. 27. No. 2.
- Kumari, A., Dora, J., Kumar, A. & Kumar, A. 2012. Pomegranate (*Punica granatum*)-Overview. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*. Vol. 1. No. 4.
- Kumari, K., Lal, M. & Saxena, S. 2017. Enhanced Micropropagation and Tiller Formation in Sugarcane through Pretreatment of Explants with Thidiazuron (TDZ). *Biotech*. Vol. 7.
- Lavanya, A. R., Muthukrishnan, S., Kumaresan, V., Benjamin, J. H. F. & Rao, M. V. 2012. In Vitro Micropropagation of *Hildegardia populifolia* (Roxb.) Schott & Endl an Endangered Tree Species from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. *Journal of Agricultural Technology*. Vol. 8. No. 5.
- Lestari, E. G. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyak Tanaman melalui Kultur Jaringan. *Jurnal AgroBiogen*. Vol. 7. No. 1.
- Li, X., Wasila, H., Liu, L., Yuan, T., Gao, Z. & Zhao, B. 2015. Physicochemical Characteristics, Polyphenol Compositions and Antioxidant Potential of Pomegranate Juices from 10 Chinese Cultivars and The Environmental Factors Analysis. *Food Chemistry*.
- Magdum, S. & Kumar, S. 2013. Organogenesis of *Ammi majus* via Callus Culture from Leaf. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. Vol. 23. No. 1.
- Mandang, J. S. 2013. **Media Kultur Jaringan**. Manado : Banyumedia Publishing.
- Manuhara, Y. S. W. 2014. **Kapita Selekt Kultur Jaringan Tumbuhan**. Surabaya : Airlangga University Press.
- Mariska, I. & Sukmadjaja, D. 2003. **Perbanyak Bibit Abaka Melalui Kultur Jaringan**. Bogor : Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika Pertanian.

- Mehta, S. K., Singh, K. K. & Harsana, A. S. 2018. Effect of IBA Concentration and Time of Planting on Rooting in Pomegranate (*Punica granatum*) Cuttings. *Journal of Medicinal Plants Studies*. Vol. 6. No. 1.
- Melgarejo, P. & Valero, D. 2012. International Symposium on the Pomegranate. *Series A : Mediterranean Seminars*. Mediterranean Agronomic Studies. Universitas Miguel Hernandez de Elche.
- Menendez, M., Herrera, J. & Comin, F. A. 2002. Effect of Nitrogen and Phosphorus Supply on Growth, Chlorophyll Content and Tissue Composition of The Macroalga *Chaetomorpha linum*. *Scientia Marina*. Vol. 66. No. 4.
- Mohammad, S. M. & Kashani, H. H. 2012. Chemical Composition of The Plant *Punica granatum* L. (Pomegranate) and its Effect on Heart and Cancer. *Journal of Medical Plants Research*. Vol. 6. No. 40.
- Mookkan, M. 2015. Direct Organogenesis from Cotyledonary Node Explants of *Cucurbita pepo* (L.)-An Important Zucchini Type Vegetable Crop. *American Journal of Plant Sciences*. Vol. 6.
- Mpahlele, R. R., Fawole, O. A., Makunga, N. P. & Opara, U. L. 2016. Effect of Drying on The Bioactive Compounds, Antioxidant, Antibacterial and Antityrosinase Activities of Pomegranate Peel. *Complementary and Alternative Medicine*. Vol. 16. 143.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum*. Vol. 15. 473-497.
- Ogita, S., Sasamoto, H., Yeung, E. C. & Thorpe, T. A. 2001. The Effects of Glutamin on The Maintenance of Embryogenic Cultures of *Cryptomeria japonica*. *In Vitro Cell and Developmental Biology Plant*. Vol. 37. 268-273.
- Okumoto, S., Funck, D., Trovato, M. & Forlani, G. 2016. Editorial : Amino Acids of The Glutamate Family : Function Beyond Primary Metabolism. *Frontiers in Plant Sciences*. Vol. 7.
- Opara, L. U., Al-ani, M. R. & Al-Shuaibi, Y. S. 2009. Physicochemical Properties, Vitamin C Content and Antimicrobial Properties of Pomegranate Fruit (*Punica granatum* L.). *Food Bioprocess Technology*. Vol. 2. 315-321.
- Pardal, S. J. 2002. Perkembangan Penelitian Regenerasi dan Transformasi pada Tanaman Kedelai. *Buletin AgroBio*. Vol. 5. No. 2.
- Paschalidis, K., Tsaniklidis, G., Wang, B. Q., Delis, C., Trantas, E., Loulakakis, K., Makky, M., Sarris, P. F., Ververidis, F. & Liu, J. H. 2019. The Interplay among Polyamines and Nitrogen in Plant Stress Responses. *Journal Plants*. Vol. 8. 315.

- Patil, G., Patel, R., Jaat, R., Pattanayak, A., Jain, P. & Srinivasan, R. 2009. Glutamine Improves Shoot Morphogenesis in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Acta Physiol Plant*. Vol. 31.
- Pierik, R. M. L. 1987. **In Vitro Culture of Higher Plant**. Nederland : Marthinus Nijhoft Pub.
- Prihandana, R. & Hendroko, R. 2006. **Petunjuk Budidaya Jarak Pagar**. Jakarta : PT. Agromedia Pustaka.
- Rahmani, A. H., Alsahli, M. A. & Almatroodi, S. A. 2017. Active Constituents of Pomegranate as Potential Candidates in the Management of Health Through Modulation of Biological Activities. *Pharmacognosy Journal*. Vol. 9. No. 5.
- Rahmat, H. R. 2003. **Delima**. Yogyakarta : Kanisius.
- Ramesh, Y. & Ramassamy, V. 2014. Effect of Gelling Agents in In Vitro Multiplication of Banana var. Poovan. *International Journal Advanced Biology Research*. Vol. 4. No. 3.
- Rasullah, F. F. F., Nurhidayati, T. & Nurmalasari. 2013. Respon Pertumbuhan Tunas Kultur Meristem Apikal Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*) Varietas NXI 1-3 secara *In Vitro* pada Media MS dengan Penambahan Arginin dan Glutamin. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. Vol. 2. No. 2.
- Remita, Y., Nurhidayati, T. & Nurmalasari. 2013. Pengaruh Medium MS dengan Penambahan Arginin 100 ppm Terhadap Pertumbuhan Tunas Apikal Tebu (*Saccharum officinarum*) Varietas NXI 1-3, HW-1 dan THA secara *In Vitro*. *Sains dan Seni Pomits*. Vol. 2. No. 2.
- Rizqi, A. K. 2019. Induksi Tunas dari Eksplan Biji Delima Hitam (*Punica granatum* L.) menggunakan Zat Pengatur Tumbuh BA (*Benzil Adenin*) secara *In Vitro* dengan Teknik TCL (*Thin Cell Layer*). *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rozali, S. E., Rashid, K. A. & Taha, R. M. 2014. Micropropagation of An Exotic Ornamental Plant, *Calathea crotalifera*, for Production of High Quality. *The Scientific World Journal*.
- Salisbury, F. B. & Ross, C. W. 1995. **Fisiologi Tumbuhan**. Jilid 4. Bandung : ITB.
- Samir, Z., El-Agamy., Rafat, A. A., Mostafa., Mokhtar, M., Shaaban., Marwa, T. & El-Mahdy. 2009. In Vitro Propagation of Manfalouty and Nab El-Gamal Pomegranate Cultivars Research. *Journal of Agricultural and Biological Science*. Vol. 5. No. 6.

- Sanjaya, Muthan, B., Rathore, T. S. & Rai, V. R. 2006. Micropropagation of An Endangered Indian Sandalwood (*Santalum album* L.). *Journal of Forest Research*. Vol. 11.
- Santoso, U. & Nursandi, F. 2004. **Kultur Jaringan Tanaman**. Malang : UMM Press.
- Sari, D. I., Suwirnen. & Nasir, N. 2015. Pengaruh Konsentrasi Thidiazuron (TDZ) dan Arang Aktif pada Subkultur Tunas Pisang Kepok Hijau (*Musa paradisiaca* L.). *Online Journal of Natural Science*. Vol. 4. No. 3.
- Savitri, E. S. 2008. **Rahasia Tumbuhan Berkasiat Obat Perspektif Islam**. Malang : UIN Press.
- Sayyid, A. B. M. 2008. **Terapi Herbal dan Pengobatan Cara Nabi saw**. Jakarta : Penebar Plus.
- Shahsavari, E. 2011. Impact of Tryptophan and Glutamine on The Tissue Culture of Upland Rice. *Plant, Soil and Environment*. Vol. 57. No. 1.
- Shahzad, A., Faisal, M., Ahmad, N., Anis, M., Alatar, A. & Hend, A. A. 2012. An Efficient System For In Vitro Multiplication of *Ocimum basilicum* Through Node Culture. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 11. No. 22.
- Shaygannia, E., Bahmani, M., Zamanzad, B. & Kopaei, M. R. 2016. A Review Study on *Punica granatum* L. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. Vol. 21. No. 3.
- Shihab, M. Q. 1996. **Wawasan Al-Qur'an Tafsir Maudhu'i atas Pelbagai Persoalan Umat**. Bandung : Mizan.
- Silva, J. G. D., Lopes, K. P., Cavalcante, J. A. C., Pereira, N. A. E. & Barbosa, R. C. A. 2017. Pre-germinative Treatment in Pomegranate Seeds (*Punica granatum* L.) : Effect in Physiological Quality. *The Revista Brasileira de Frutica*. Vol. 39.
- Singh, K. K. 2017. Vegetative Propagation of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Through Cutting. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Vol. 6. No. 10.
- Singh, P., Patel, R. M. & Kadam, S. 2013. *In Vitro* Mass Multiplication of Pomegranate from Cotyledonary Nodal Explant cv. Ganesh. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 12. No. 20.
- Sitorus, E. N., Endah, D. H. & Setiari, N. 2011. Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) secara *In Vitro* pada Media *Murashige and Skoog* dengan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda. *Bioma*. Vol. 13. No. 1.

- Siwach, P. & Gill, A. R. 2012. Enhanced Shoot Multiplication in *Ficus religiosa* L. in The Presence of Adenine Sulphate, Glutamine and Phloroglucinol. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. Vol. 17. No. 3.
- Soni, M. & Kanwar, K. 2016. Rejuvenation Influences Indirect Organogenesis from Leaf Explants of Pomegranate (*Punica granatum* L.) “Kandhari Kabuli”. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. Vol. 91. No. 1.
- Sumaiya, K., Jahurul, M. H. A. & Zaman, W. 2018. Evaluation of Biochemical and Bioactive Properties of Native and Imported Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars Found in Bangladesh. *International Food Research Journal*. Vol. 25. No. 2.
- Syed, Q. A., Batool, Z., Shukat, R. & Zahoor, T. 2018. Nutritional and Therapeutic Properties of Pomegranate. *Scholarly Journal of Food and Nutrition*. Vol. 1. No. 4.
- Temple, S. J., Vance, C. P. & Gantt, J. S. 1998. Glutamate Synthase and Nitrogen Assimilation. *Trends in Plant Science*. Vol. 3. 51-56.
- Trigiano, R. N. & Gray, D. J. 2005. **A Brief Introduction to Plant Anatomy**. In : Trigiano, R. N. & Gray, D. J (eds.). *Plant Development and Biotechnology*. New York : CRC Press.
- Wattimena, G. A. 1988. **Zat Pengatur Tumbuh Tanaman**. Laboratorium Kultur Jaringan. Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor. Bogor : IPB.
- Wattimena, G. A., Livy, W. G., Nurhayati, A. M., Endang, S., Ni Made, A. W. & Andri, E. 1992. **Bioteknologi Tanaman**. Bogor : Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, PAU Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Wetherell, D. F. 1982. **Pengantar Propagasi Tanaman secara *In Vitro***. Diterjemahkan Oleh Koensoemardiyah. Semarang : IKIP Semarang Press.
- Wijayani, Y. & Mudyantini, W. 2007. Pertumbuhan Tunas dan Struktur Anatomi Protocorm Like Body Angrek *Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl. dengan Pemberian Kinetin dan NAA. *Bioteknologi*. Vol. 4. No. 2.
- Winarto, B. 2011. Pengaruh Glutamin dan Serin terhadap Kultur Anter *Anthurium andreanum* cv. Tropical. *Jurnal Hortikultura*. Vol. 21. No. 4.
- Yuliarti, N. 2010. **Kultur Jaringan Tanaman Skala Rumah Tangga**. Yogyakarta : Lily Publisher.
- Yusnita. 2003. **Kultur Jaringan : Cara Memperbanyak Tanaman secara Efisien**. Jakarta : Agromedia Pustaka.

Zeynalova, A. M. & Novruzov, E. N. 2017. Origin, Taxonomy and Systematic of Pomegranate. *Proceedings of the Institute of Botany, Azerbaijan National Academy of Sciences*. Vol. 37.

Zulkarnain. 2009. **Kultur Jaringan Tanaman : Solusi Perbanyak Tanaman Budi Daya**. Jakarta : Bumi Aksara.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel Data Hasil Pengamatan

1. Hari Muncul Tunas (HMT)

No.	Perlakuan	Ulangan						Jumlah	Rata-Rata
		1	2	3	4	5	6		
1.	G0	22	20	22	20	22	22	22	21.3
2.	G1	16	18	18	16	18	18	104	17.3
3.	G2	14	14	16	16	14	14	88	14.6
4.	G3	18	16	16	12	14	16	92	15.3
5.	G4	18	18	20	18	20	18	112	18.6
6.	G5	22	20	18	24	18	20	122	20.3

2. Jumlah Tunas

No.	Perlakuan	Ulangan						Jumlah	Rata-Rata
		1	2	3	4	5	6		
1.	G0	1	2	1	1	1	1	7	1.1
2.	G1	3	2	6	3	3	4	21	3.5
3.	G2	6	4	6	4	6	3	29	4.8
4.	G3	5	3	6	5	4	1	24	4
5.	G4	4	3	5	1	4	2	19	3.1
6.	G5	2	1	3	2	1	2	11	1.8

3. Tinggi Tunas (dalam ukuran mm)

No.	Perlakuan	Ulangan						Jumlah	Rata-Rata
		1	2	3	4	5	6		
1.	G0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	7.0	1.2
2.	G1	2.0	1.0	4.0	2.0	2.0	2.0	13.0	2.2
3.	G2	4.0	3.0	4.0	2.0	4.0	1.0	18.0	3.0
4.	G3	4.0	2.0	4.0	3.0	3.0	1.0	17.0	2.8
5.	G4	3.0	2.0	3.0	1.0	2.0	1.0	12.0	2.0
6.	G5	1.0	1.0	2.0	2.0	1.0	2.0	9.0	1.5

4. Persentase Tumbuh Tunas

No.	Perlakuan	Ulangan						Jumlah	Rata-Rata
		1	2	3	4	5	6		
1.	G0	33.3	66.7	33.3	33.3	33.3	33.3	233.3	38.9
2.	G1	100	66.7	100	100	100	100	566.7	94.5
3.	G2	100	66.7	100	100	66.7	100	533.4	88.9
4.	G3	100	66.7	100	66.7	66.7	100	500.1	83.3
5.	G4	66.7	66.7	100	66.7	100	66.7	466.8	77.8
6.	G5	100	66.7	66.7	100	33.3	66.7	433.3	72.2

Lampiran 2. Hasil Perhitungan Statistika Analisis Varian (ANOVA) dan Uji Lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) 5%

1. Hari Muncul Tunas

a. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		36
Normal Parameters ^a	Mean	.0000000
	Std. Deviation	2.84795348
Most Extreme Differences	Absolute	.156
	Positive	.156
	Negative	-.145
Kolmogorov-Smirnov Z		.933
Asymp. Sig. (2-tailed)		.348

a. Test distribution is Normal.

b. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

HARI MUNCUL TUNAS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.705	5	30	.164

c. ANOVA

ANOVA

HARI MUNCUL TUNAS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	213.889	5	42.778	18.333	.000
Within Groups	70.000	30	2.333		
Total	283.889	35			

d. DMRT 5%

HARI MUNCUL TUNAS

Duncan

KONSENTRASI GLUTAMIN	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
20 mg/l	6	14.6667			
30 mg/l	6	15.3333			
10 mg/l	6		17.3333		
40 mg/l	6		18.6667	18.6667	
50 mg/l	6			20.3333	20.3333
0 mg/l	6				21.3333
Sig.		.456	.141	.068	.266

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

2. Jumlah Tunas

a. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		36
Normal Parameters ^a	Mean	.0000000
	Std. Deviation	1.72839432
Most Extreme Differences	Absolute	.131
	Positive	.131
	Negative	-.103
Kolmogorov-Smirnov Z		.783
Asymp. Sig. (2-tailed)		.571

a. Test distribution is Normal.

b. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

JUMLAH TUNAS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.248	5	30	.075

c. ANOVA

ANOVA

JUMLAH TUNAS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	55.917	5	11.183	6.870	.000
Within Groups	48.833	30	1.628		
Total	104.750	35			

d. DMRT 5%

JUMLAH TUNAS

Duncan

KONSENTRASI RASI GLUTAMIN	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0 mg/l	6	1.1667			
50 mg/l	6	1.8333	1.8333		
40 mg/l	6		3.1667	3.1667	
10 mg/l	6			3.5000	3.5000
30 mg/l	6			4.0000	4.0000
20 mg/l	6				4.8333
Sig.		.373	.080	.295	.096

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

3. Tinggi Tunas

a. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		36
Normal Parameters ^a	Mean	.0000000
	Std. Deviation	1.08850935
Most Extreme Differences	Absolute	.209
	Positive	.209
	Negative	-.139
Kolmogorov-Smirnov Z		1.254
Asymp. Sig. (2-tailed)		.086

a. Test distribution is Normal.

b. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

TINGGI TUNAS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.468	5	30	.230

c. ANOVA

ANOVA

TINGGI TUNAS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.556	5	3.111	3.590	.012
Within Groups	26.000	30	.867		
Total	41.556	35			

d. DMRT 5%

TINGGI TUNAS

Duncan

KONSENTRASI GLUTAMIN	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0 mg/l	6	1.1667	
50 mg/l	6	1.5000	
40 mg/l	6	2.0000	2.0000
10 mg/l	6	2.1667	2.1667
30 mg/l	6		2.8333
20 mg/l	6		3.0000
Sig.		.098	.098

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

4. Persentase Tumbuh Tunas

a. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Unstandardized Residual
N		36
Normal Parameters ^a	Mean	.0000000
	Std. Deviation	24.08556290
Most Extreme Differences	Absolute	.193
	Positive	.125
	Negative	-.193
Kolmogorov-Smirnov Z		1.156
Asymp. Sig. (2-tailed)		.138

a. Test distribution is Normal.

b. Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

% TUMBUH TUNAS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.177	5	30	.344

c. ANOVA

ANOVA

% TUMBUH TUNAS

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11742.723	5	2348.545	7.321	.000
Within Groups	9623.717	30	320.791		
Total	21366.440	35			

d. DMRT 5%

% TUMBUH TUNAS

Duncan

KONSENTRASI GLUTAMIN	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0 mg/l	6	38.8667	
50 mg/l	6		72.2333
40 mg/l	6		77.8000
30 mg/l	6		83.3500
20 mg/l	6		88.9000
10 mg/l	6		94.4500
Sig.		1.000	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Ringkasan Hasil ANAVA Pengaruh Pemberian Glutamin terhadap Hasil Kuantitatif dari Multiplikasi Tunas Delima Hitam (*Punica granatum L.*) secara *In Vitro*

Variabel Pengamatan	F Hitung	F Tabel 5%
Hari Muncul Tunas	18,333*	2,534
Jumlah Tunas	6,870*	2,534
Tinggi Tunas	3,590*	2,534
Persentase Tumbuh Tunas	7,321*	2,534

Keterangan : (*) menunjukkan bahwa pemberian glutamin berpengaruh nyata terhadap variabel pengamatan

Lampiran 3. Perhitungan Komposisi Media

a. MS (4,43 g/l)

$$\begin{aligned}
 \text{MS yang digunakan} &= \frac{\text{berat (g)}}{\text{volume (ml)}} \times \text{volume media yang dibutuhkan} \\
 &= \frac{4,43 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 375 \\
 &= 1,66125 \text{ g (untuk 6 perlakuan dengan 5x ulangan)}
 \end{aligned}$$

b. Gula (30 g/l)

$$\begin{aligned}
 \text{Gula yang dipakai} &= \frac{\text{berat (g)}}{\text{volume (ml)}} \times \text{volume media yang dibutuhkan} \\
 &= \frac{30 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 375 \\
 &= 11,25 \text{ g (untuk 6 perlakuan dengan 5x ulangan)}
 \end{aligned}$$

c. Agar (10 g/l)

$$\begin{aligned}
 \text{Agar yang dipakai} &= \frac{\text{berat (g)}}{\text{volume (ml)}} \times \text{volume media yang dibutuhkan} \\
 &= \frac{10 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 62,5 \\
 &= 0,625 \text{ (untuk 1 perlakuan dengan 5x ulangan)}
 \end{aligned}$$

Lampiran 4.

A. Perhitungan Larutan Stok Hormon BA dan TDZ

Hormon BA

$$\text{Stok hormon BA } 100 \text{ mg/l} = \frac{\text{berat (mg)}}{\text{volume (l)}} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ l}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Cara pembuatan stok hormon BA yaitu ditimbang 10 mg serbuk BA kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades.

Hormon TDZ

$$\text{Stok hormon TDZ } 100 \text{ mg/l} = \frac{\text{berat (mg)}}{\text{volume (l)}} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ l}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Cara pembuatan stok hormon TDZ yaitu ditimbang 10 mg serbuk TDZ kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades.

B. Perhitungan Larutan Stok Glutamin

Pembuatan larutan stok glutamin 100 mg/l :

$$\text{Larutan stok glutamin} = \frac{\text{berat (mg)}}{\text{volume (l)}} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ l}} = \frac{100 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Cara pembuatan stok glutamin yaitu ditimbang 10 mg serbuk glutamin kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquades.

C. Perhitungan Pengambilan Glutamin dari Larutan Stok

1. Glutamin Konsentrasi 10 mg/l

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 100 \text{ mg/l} \times V_1 &= 10 \text{ mg/l} \times 62,5 \text{ ml} \\ V_1 &= 6,25 \text{ ml} \end{aligned}$$
2. Glutamin Konsentrasi 20 mg/l

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 100 \text{ mg/l} \times V_1 &= 20 \text{ mg/l} \times 62,5 \text{ ml} \\ V_1 &= 12,5 \text{ ml} \end{aligned}$$
3. Glutamin Konsentrasi 30 mg/l

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 100 \text{ mg/l} \times V_1 &= 30 \text{ mg/l} \times 62,5 \text{ ml} \\ V_1 &= 18,75 \text{ ml} \end{aligned}$$
4. Glutamin Konsentrasi 40 mg/l

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 100 \text{ mg/l} \times V_1 &= 40 \text{ mg/l} \times 62,5 \text{ ml} \\ V_1 &= 25 \text{ ml} \end{aligned}$$
5. Glutamin Konsentrasi 50 mg/l

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 100 \text{ mg/l} \times V_1 &= 50 \text{ mg/l} \times 62,5 \text{ ml} \\ V_1 &= 31,25 \text{ ml} \end{aligned}$$

Lampiran 5. Foto Bahan Penelitian

		
Delima Hitam	Media MS	Alkohol 70% dan 96%
		
Clorox dan Spirtus	NaOH 1% dan HCl 0,1N	Agar-agar
		
Asam Amino Glutamin	Fungisida	Bakterisida
		
ZPT BA dan TDZ	Detergen Cair	Gula

Lampiran 6. Foto Alat Penelitian

		
Timbangan Analitik	<i>Hot plate</i>	Oven dan Kulkas
		
Penyemprot	Cawan Petri	<i>Beaker glass</i>
		
Gelas Ukur	LAF	Autoklaf
		
Bunsen dan Korek Api	Alat Diseksi dan Mikropipet	pH indikator



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 : Denis Aralia
NIM : 16620061
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil TA 2020/2021
Pembimbing : Suyono, M.P
Judul Skripsi : Multiplikasi Subkultur Tunas Delima Hitam (*Punica granatum L.*) Menggunakan Asam Amino Glutamin Secara *In Vitro*

No.	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	20 Nov 2019	Judul	
2.	22 Nov 2019	Judul dan Metode	
3.	28 Nov 2019	Judul dan Metode	
4.	5 Des 2019	Metode	
5.	7 Jan 2020	BAB I	
6.	15 Jan 2020	BAB III	
7.	19 Mar 2020	BAB I dan BAB III	
8.	20 Mar 2020	BAB III	
9.	13 April 2020	BAB I, BAB II dan BAB III	
10.	7 Des 2020	BAB IV	
11.	8 Des 2020	ACC BAB IV	
12.	25 Des 2020	ACC BAB I-V	

Pembimbing Skripsi,

Suyono, M.P
NIP. 19710622 200312 1 002

Malang, 25 Desember 2020
Ketua Program Studi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

