

**KULTUR KALUS DAN SUSPENSI SEL EMBRIOGENIK NILAM
(*Pogostemon cablin* Benth.) MENGGUNAKAN 2,4-D, BAP
(6-Benzyl amino purin) DAN NAA (*Naphthalene Acetic Acid*)**

CALLUS CULTURE AND EMBRIOGENIC CELL SUSPENSION
CULTURE OF PATCHOULI (*Pogostemon cablin* Benth.)
USING 2,4-D, BAP (6-Benzyl amino purin), and NAA
(*Naphthalene Acetic Acid*)

NURANNA NURDIN



**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**KULTUR KALUS DAN SUSPENSI SEL EMBRIOGENIK NILAM
(*Pogostemon cablin* Benth.) MENGGUNAKAN 2,4-D, BAP
(6-Benzyl amino purin) DAN NAA (*Naphthalene Acetic Acid*)**

CALLUS CULTURE AND EMBRIOGENIC CELL SUSPENSION
CULTURE OF PATCHOULI (*Pogostemon cablin* Benth.)
USING 2,4-D, BAP (6-Benzyl amino purin), and NAA
(*Naphthalene Acetic Acid*)

NURANNA NURDIN



**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023

**CALLUS CULTURE AND EMBRIOGENIC CELL SUSPENSION
CULTURE OF PATCHOULI (*Pogostemon cablin* Benth.)
USING 2,4-D, BAP (6-Benzyl amino purin), and NAA
(*Naphthalene Acetic Acid*)**

NURANNA NURDIN



**GRADUATE PROGRAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR, INDONESIA
2023**

**KULTUR KALUS DAN SUSPENSI SEL EMBRIOGENIK NILAM
(*Pogostemon cablin* Benth.) MENGGUNAKAN 2,4-D, BAP
(6-Benzyl amino purin) DAN NAA (*Naphthalene acetic Acid*)**

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Agroteknologi

Disusun dan diajukan oleh

NURANNA NURDIN

G012202005

kepada

PROGRAM MAGISTER AGROTEKNOLOGI

FAKULTAS PERTANIAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

TESIS**KULTUR SUSPENSI SEL EMBRIOGENIK NILAM
(*Pogostemon cablin* Benth.) MENGGUNAKAN
2,4-D, BAP (6-Benzyl amino purin) DAN NAA
(*Naphthalene acetic Acid*)**

disusun dan diajukan oleh:

NURANNA NURDIN

Nim : G012202005

Telah dipertahankan didepan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Agroteknologi Fakultas Pertanian
Universitas Hasanuddin

Pada tanggal 27 November 2023

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama



Prof. Ir. Rinaldi Sjahril, M. Agr.Ph.D
NIP. 19660925 199412 1 001

Pembimbing Pendamping



Dr. Ir. Feranita Haring, M.P
NIP. 19591220 198601 2 002

Ketua Program Studi
Magister Agroteknologi

Dr. Ir. Muhi Riadi, M.P
NIP. 19640905 198903 1 003

Dekan Fakultas Pertanian
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Ir. Salengke, M.Sc
NIP. 19631203 198811 1 005

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Nuranna Nurdin
NIM : G012202005
Program Studi : Agroteknologi
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa Tesis dengan judul **Kultur Suspensi Sel Embriogenik Nilam (*Pogostemon cablin Benth.*) Menggunakan 2,4-D, BAP (6-Benzyl amino purin) DAN NAA (*Naphthalene acetic Acid*)** adalah karya saya dan tidak melanggar hak cipta lain. Apabila dikemudian hari Tesis karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan adalah hasil karya orang lain yang saya gunakan dengan cara melanggar hak cipta lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, November 2023

Yang menyatakan



Nuranna Nurdin

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT atas rahmat dan Hidayah-Nya sehingga penelitian dan penulisan tesis ini dapat terselesaikan dengan baik. Salam dan shalawat kepada junjungan Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabatnya, tabi'in, tabi'uttabin dan orang-orang yang istiqomah.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam penyusunan tesis ini tidak jarang menemukan kesulitan dan hambatan, namun berkat dorongan dan bantuan dari berbagai pihak sehingga tesis ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu, pada kesempatan ini dengan kerendahan hati dan ketulusan hati penulis mengucapkan rasa terima kasih kepada:

1. Ayahanda Nurdin dan Ibunda Kartina serta adik-adik penulis Nuranni Nurdin, Tri Suci Wulandari N dan Andika Yudha Pratama atas segala bantuan, dukungan, motivasi dan doanya.
2. Prof. Ir. Rinaldi Sjahril, M.Agr.Ph.D dan Dr. Ir. Feranita Haring, M.P selaku pembimbing yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran selama membimbing penulis.
3. Prof.Dr.Ir. Yunus Musa, M.Sc , Ir. Ifayanti Ridwan Saleh, M. P. Ph.D dan Dr.Ir. Teuku Tajuddin, M.Sc selaku tim penguji yang telah memberikan saran untuk perbaikan tesis ini.
4. Ibu Elly Nurdin, S.P., yang telah banyak membimbing penulis selama melakukan penelitian di Laboratorium Biosains dan Bioteknologi

Reproduksi tanaman, Fakultas Pertanian bertempat di Unit perbenihan Teaching Industry, Universitas Hasanuddin, Makassar.

5. Ibu Idarni Tenri Pada Badwi, S.P., sebagai teman seperjuangan selama menempuh pendidikan di sekolah pasca sarjana Agroteknologi, Universitas Hasanuddin
6. Kamsinar, S.P. sebagai teman seperjuangan di laboratorium Biosains dan Bioteknologi Reproduksi tanaman, Fakultas Pertanian bertempat di Unit perbenihan Teaching Industry, Universitas Hasanuddin, Makassar.
7. Seluruh anggota Rinaldi's crew yang selalu memberikan banyak bantuan dan dukungan kepada penulis.
8. Teman-teman Mahasiswa dan mahasiswi PG-PRIMING angkatan 2020

Penulis mengharapkan saran dan kritikan yang bersifat membangun dari berbagai pihak demi perbaikan karya ilmiah ini. Akhir kata, semoga karya ilmiah ini dapat memberi manfaat kepada semua pihak yang membutuhkan secara umum dan bermanfaat kepada penulis sendiri secara khusus.

Makassar, September 2023

Nuranna Nurdin

ABSTRAK

NURANNA NURDIN. Kultur Suspensi Sel Embriogenik Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) Menggunakan BAP(6-Benzyl Amino Purin) dan NAA (Naphthalene Acetic Acid). (dibimbing oleh **Rinaldi Sjahril** dan **Feranita Haring**)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi 2,4-D yang memberikan pengaruh terbaik pada pengkalusan dan dilanjutkan untuk mengetahui konsentrasi BAP dan NAA yang terbaik untuk kultur suspensi sel tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth.). Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biosains dan Bioteknologi Reproduksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin yang berlangsung dari Desember 2021 sampai Juli 2023. Penelitian ini terdiri dari dua tahap percobaan. Percobaan pertama adalah induksi kalus menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan konsentrasi 2,4-D (0,5; 1,0; dan 1,5 mg L⁻¹). Pada percobaan kedua yakni kultur suspensi sel menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan konsentrasi BAP yaitu tanpa BAP, 1,0 dan 2 mg L⁻¹ dan konsentrasi NAA yaitu tanpa NAA, 0,15 dan 0,30 mg L⁻¹. Hasil percobaan induksi kalus menunjukkan bahwa perlakuan pemberian 2,4-D dengan konsentrasi 1 mg L⁻¹ merupakan konsentrasi terbaik dengan bobot kalus rata-rata (1,02 g) sedangkan pada tahap dua suspensi sel menunjukkan keberhasilan penggunaan BAP dan NAA dengan konsentrasi 1 mg L⁻¹ + 0,15 mg L⁻¹ dengan bobot kallus rata-rata yaitu (16,70 g).

Kata kunci: Nilam, Induksi Kalus, Suspensi Sel.

ABSTRACT

NURANNA NURDIN. Callus Culture and Embriogenic Cell Suspension Culture of Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) using 2,4-D, BAP, and NAA (Supervised by Rinaldi Sjahril and Feranita Haring)

The purpose of this study is to examine and analyze the best combination of growth regulators 2,4-D, BAP and NAA for patchouli cell suspension culture. This research consists of two stages. The first stage is patchouli callus induction using a complete randomized design with 2,4-D (0.5; 1.0; and 1.5 mg L⁻¹). The second stage used a Factorial Complete Randomized Design with two factors, namely the combination of BAP (0.0; 1.0; and 2.0 mg L⁻¹) and NAA (0.00; 0.15; and 0.30 mg L⁻¹). The result showed that the compound of 2,4-D can induce patchouli callus with the best concentration at 1.0 mg L⁻¹ which produced yellowish callus color and friable texture. Furthermore, the best callus from the first stage was suspended in the treatment of the second stage. The result of the research in the second stage showed that the concentration of BAP 1.0 mg L⁻¹ + NAA 0.15 mg L⁻¹ which gave the best average weight at 16.70 g.

Keywords: Patchouli, Callus Induction , cell suspension.

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI.....	x
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Penelitian	4
1.3. Hipotesis.....	4
1.3.1. Percobaan 1 (Induksi Kalus)	4
1.3.2. Percobaan 2 (Kultur suspensi)	4
1.3.3. Tujuan Penelitian	5
1.3.4. Kegunaan penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Tanaman Nilam	6
2.2 Deskripsi Tanaman	6
2.3. Kandungan dan manfaat Nilam	8
2.4. Kultur Jaringan	8
2.5. Kultur Suspensi Sel.....	10
2.6. Kultur Suspensi Sel Tanaman nilam.....	11
2.7. Somatik Embriogenesis	11
2.8. Kalus Embriogenik	13
2.9. Zat Perangsang Tumbuh	13
2.10. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman Nilam	14
BAB III METODE PENELITIAN	17
3.1. Tempat dan Waktu	17
3.2. Alat dan Bahan	17
3.3. Metode Penelitian	18
3.3.1 Metode Penelitian Tahap 1 (Induksi kalus).....	18
3.4. Pelaksanaan	20
3.4.1 Pelaksanaan Penelitian	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
4.1. Hasil.....	25
4.1.2. Waktu Muncul Kalus	25
4.1.3. Warna kallus	26

4.1.4. Tekstur Kallus	27
4.1.5. Berat kallus	28
4.1.6. Berat kallus suspensi sel	29
4.2. Pembahasan	31
4.2.1 Percobaan tahap 1 (Induksi kallus)	31
4.2.2. Percobaan tahap 2 (Kultur Suspensi Sel)	35
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1. Kesimpulan	38
5.2. Saran	38
DAFTAR PUSTAKA.....	39
LAMPIRAN	44

DAFTAR TABEL

NO	Teks	Halaman
1.	Tabel 1. Waktu Muncul Kalus.....	31
2.	Tabel 2. Warna Kalus.....	32
3.	Tabel 3. Tekstur Kalus.....	34
4.	Tabel 4. Berat Kalus.....	35
5.	Tabel 5. Berat Hasil Suspensi Sel.....	36

DAFTAR GAMBAR

No.	Teks	Halaman
1.	Kerangka berfikir penelitian.....	19
2.	Suspensi sel berupa globular.....	44

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Teks	Halaman
1.	Komposisi stok media Murashige and Skoog.....	54
2.	Analisis Data SPSS.....	55
3.	Tabel Sidik Ragam.....	59
4.	Dokumentasi Penelitian.....	63

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) merupakan salah satu tanaman yang memproduksi minyak atsiri yang disebut sebagai minyak nilam (*patchouli oil*). Minyak atsiri nilam umumnya digunakan dalam farmasi, industri kosmetik dan parfum, aromaterapi, bahan insektisida, dan antiseptik (Wahyudi dan Ermiami, 2022). Minyak nilam juga digunakan sebagai alternatif alkohol yang memiliki daya fiksatif tinggi, dimana kemampuan minyak nilam mengikat minyak esensial lainnya dan tidak mudah menguap (*evaporate*) sehingga wangi parfum dapat bertahan lebih lama (Wardani *et al.*, 2019).

Nilam umumnya diperbanyak dengan cara setek, yaitu dengan cara memotong cabang tanaman nilam yang terlihat sehat dan bebas dari hama serta penyakit, kemudian ditanam di tanah. Budidaya nilam di Indonesia masih terbatas karena beberapa faktor yaitu lahan yang tidak sesuai, penyediaan bibit unggul secara konvensional yang terbatas, serangan hama dan penyakit serta perubahan cuaca. Faktor tersebut mempengaruhi mutu dan rendemen minyak pada nilam sehingga produksi minyak memiliki kecenderungan tidak dapat memenuhi permintaan pasar (Dinas Perkebunan Jawa Timur, 2013).

Penyediaan bibit bermutu melalui kultur jaringan saat ini mulai dikembangkan. Kultur jaringan tanaman adalah metode mengambil bagian tumbuhan (protoplas, sel, kelompok sel, jaringan dan organ) untuk menumbuhkan di media buatan dan lingkungan yang sesuai dalam kondisi steril/aseptik (Mastuti, 2017). Kelebihan kultur jaringan adalah kemampuannya menghasilkan benih yang sehat dan seragam (Amalia dan Hadipoentyanti, 2018). Keberhasilan perbanyakan tanaman dengan

teknik kultur *in vitro* bergantung pada sumber eksplan, ukuran eksplan, umur fisiologis, genotipe eksplan, media yang digunakan, kondisi yang aseptik dan faktor lingkungan (Wardani, 2020).

Metode kultur jaringan merupakan metode perbanyak tanaman yang dapat menghasilkan tanaman baru yang banyak dan unggul serta dalam waktu yang relatif singkat. Media tumbuh buatan yang digunakan dalam metode kultur jaringan didalamnya terdapat nutrisi untuk pertumbuhan eksplan sampai membentuk tanaman baru yang utuh atau plantlet. Selain nutrisi, zat Pengatur Tumbuh juga ditambahkan untuk memacu pertumbuhan dan mengarahkan terbentuknya organogenesis.

Zat pengatur tumbuh tanaman berperan penting dalam mengontrol proses biologi dalam jaringan tanaman (Davies,1995;Gaba,2005). Perannya antara lain mengatur kecepatan pertumbuhan dari masing-masing jaringan dan mengintegrasikan bagian-bagian tersebut guna menghasilkan bentuk yang kita kenal sebagai tanaman. Aktivitas zat pengatur tumbuh didalam pertumbuhan tergantung dari jenis, struktur kimia, konsentrasi, genotipe tanaman serta fase fisiologi tanaman itu sendiri (satyavathi *et al.*,2004).

Penelitian yang dilakukan oleh Musthofa (2018) menyatakan bahwa propagasi secara *in vitro* tanaman nilam dengan konsentrasi 1 mg L^{-1} 2,4-D mampu menumbuhkan kalus nilam varietas sidikalang pada presentase tumbuh sebesar 21% dan berat kalus 0,13 g selama 14 Hari Setelah Tanam (HST). Hasil penelitian Wardani (2020) menemukan bahwa konsentrasi 1 mg L^{-1} 2,4-D + 1 mg L^{-1} BAP mampu menumbuhkan kalus eksplan daun nilam Aceh aksesori situak sebesar 100%.

Kultur jaringan tanaman dilakukan dengan menanam secara aseptik suatu jaringan tanaman dengan memanfaatkan sifat totipotensi sel pada tanaman, sehingga dengan pengaturan nutrisi pada media dapat dihasilkan tanaman sesuai harapan. Penggunaan media Murashige and Skoog (MS) $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D merupakan komposisi media dan zat pengatur tumbuh

yang sesuai, sehingga dapat menginduksi pembentukan kalus maupun pindah tanam kalus (Fiah, *et al.*, 2014).

Keberhasilan dari suatu teknik kultur jaringan bergantung pada penggunaan zat pengatur tumbuh. Kombinasi antara media dasar dan ZPT akan mengoptimalkan pertumbuhan eksplan, ZPT dapat merangsang ataupun menghambat proses fisiologis tanaman. Zat pengatur tumbuh memiliki peran yang penting dalam kultur jaringan karena bila tidak menggunakan ZPT eksplan akan mengalami pertumbuhan yang lambat atau bahkan tidak tumbuh sama sekali. Zat pengatur tumbuh eksogen yang digunakan pada teknik kultur jaringan adalah auksin dan sitokinin. 2,4-dichlorophenoxy acid (2,4-D) merupakan ZPT dari golongan auksin yang sering digunakan pada teknik kultur jaringan tanaman karena bersifat stabil tidak mudah rusak oleh cahaya maupun pemanasan saat sterilisasi (Zulkarnain, 2009). Oleh karena itu, zat perangsang tumbuh 2,4-D digunakan pada tahap 1 induksi kalus tanaman nilam.

Media cair pada kultur suspensi digunakan salah satunya untuk menghasilkan tanaman dalam jumlah yang banyak, selain itu juga digunakan sebagai metode untuk menghasilkan sel serta sebagai sarana untuk melakukan pengamatan pertumbuhan tanaman dalam tingkat sel. Dwimahyani (2007), media cair juga digunakan untuk melihat pengaruhnya pada pertumbuhan kallus sehingga dihasilkan kalus yang ideal sebagai bahan dasar untuk metode kultur suspensi.

Davidonis dan knoor yang membuktikan proliferasi kallus pada media yang berisi yang berisi NAA $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ dan BAP $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ penemuan Tan *et al.* Mendekati penelitian Ruby Sharma dan Sunil Bora mereka menemukan eksplan-eksplan membentuk kallus ketika di kulturkan pada media MS dengan tambahan $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ dan $1,0 \text{ mg L}^{-1}$

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Penggunaan komposisi zat pengatur tumbuh yang sesuai untuk tanaman nilam, pada penelitian tahap 1 menggunakan 2,4-D diharapkan dengan konsentrasi 2,4-D yang tepat proses kultur tanaman nilam percobaan tahap 1 dapat menghasilkan

sel-sel embriogenesis serta memperoleh (*Embryogenic Cell Suspension*) yang homogen hingga dapat dihasilkan kalus embriogenik untuk suspensi sel penambahan zat pengatur tumbuh berupa BAP (6- *Benzyl Amino Purine*) dan NAA digunakan untuk percobaan tahap 2 pada penelitian ini karena dianggap paling efektif untuk mengetahui kualitas sel embriogenik tanaman menggunakan kultur suspensi.

1.2. Rumusan Penelitian

Penggunaan media padat untuk produksi somatik Embriogenesis pada tanaman nilam kurang efisien, sehingga diperlukan media cair dengan komposisi Zat pengatur tumbuh yang tepat untuk dapat menghasilkan somatik embriogenesis pada tanaman nilam, oleh karena itu hormon BAP dan NAA pada media kultur suspensi ditambahkan untuk mengetahui bagaimana pengaruhnya terhadap kalus embriogenik nilam.

1.3. Hipotesis

1.3.1. Percobaan 1 (Induksi Kalus)

1. Salah satu konsentrasi 2,4-D mampu menginduksi kallus embriogenik.
2. Terdapat pengaruh konsentrasi 2,4 D tertentu yang dapat menghasilkan pengkalusan terbaik.

1.3.2. Percobaan 2 (Kultur suspensi)

1. Terdapat interaksi antara konsentrasi BAP dan NAA tertentu dan konsentrasi terbaik yang dapat menghasilkan kualitas sel dan kalus hasil suspensi terbaik.

1.3.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji dan menganalisis komposisi Zat pengatur tumbuh berupa BAP dan NAA yang terbaik terhadap kultur suspensi tanaman nilam.

1.3.4 Kegunaan penelitian

Hasil pada penelitian ini didapatkan kualitas kalus hasil suspensi dengan komposisi Zat pengatur tumbuh (BAP dan NAA) yang sesuai pada tanaman nilam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Nilam

Tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) merupakan salah satu tanaman yang memproduksi minyak atsiri yang disebut sebagai minyak nilam (*Patchouli oil*). Minyak atsiri nilam umumnya digunakan dalam farmasi, industri kosmetik dan parfum, aromaterapi, bahan insektisida, dan antiseptik (wahyudi dan Ermiami,2012). Minyak nilam juga digunakan sebagai alternatif alkohol yang memiliki daya fiksatif tinggi, dimana kemampuan minyak nilam mengikat minyak esensial lainnya, dan tidak mudah menguap (*evaporate*) sehingga wangi parfum dapat bertahan lebih lama (Wardani *et al.*,2019).

Tanaman nilam termasuk suku Labiate yang memiliki sekitar 200 genus. Menurut Rukmana (2003) berdasarkan taksonominya, kedudukan tanaman nilam diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : Plantae (tumbuh-tumbuhan)
Divisi : Spermatophyta (tumbuhan berbiji)
Subdivisi : Angiospermae (berbiji tertutup)
kelas : Dicotyledonae (biji berkeping dua)
Ordo : Labiales
Famili : Labiales
Spesies : *Pogostemon cablin* Benth.

2.2 Deskripsi Tanaman

Nilam merupakan tanaman yang mudah tumbuh seperti herba lainnya. Tanaman ini memerlukan suhu yang panas dan lembab. Tanaman nilam tumbuh dan berproduksi dengan baik pada ketinggian sampai 700 m dpl (Nuryani,2006). Sedangkan Mauludi dan Asman (2005) menyebutkan

tanaman nilam dapat tumbuh pada ketinggian 10-1200 m dpl. Lebih lanjut disebutkan nilam dapat tumbuh pada segala jenis tanah, akan tetapi tumbuh lebih baik pada tanah yang gembur dan banyak mengandung humus, bertekstur lempung sampai liat berpasir selain itu nilam juga memerlukan curah hujan yang merata dalam jumlah cukup saat berumur lebih dari 6 bulan, ketinggian tanaman nilam dapat mencapai 60-90 cm dengan radius cabang sekitar 60 cm.

Tanaman nilam berasal dari daerah tropis Asia Tenggara terutama Indonesia, Filipina dan India (Grieve, 2002). Di Indonesia terdapat tiga jenis nilam yaitu *Pogostemon cablin* Benth. (nilam Aceh), *Pogostemon hortensis* Backer. (nilam Jawa) dan *Pogostemon heyneanus* Benth. (nilam kembang). Nilam Aceh berasal dari Filipina, mula-mula ditanam di Jawa pada tahun 1895 dan mulai ditanam di Aceh pada tahun 1909 (Guenther, 1952).

Berdasarkan sifat tumbuhnya, tanaman nilam adalah tanaman tahunan (perennial). Tanaman nilam berupa semak tropis perdu yang tumbuh tegak, memiliki banyak percabangan dan bertingkat-tingkat. Secara alami tanaman nilam dapat mencapai ketinggian antara 0,5-1,0 m. Daun tanaman nilam berbentuk bulat telur sampai bulat panjang (lonjong). Daun nilam memiliki panjang antara 5-11 cm. Berwarna hijau, tipis, tidak kaku dan berbulu pada permukaan bagian atas. Kedudukan daun saling berhadapan, permukaan daun kasar dengan tepi bergerigi, ujung daun tumpul, daun urat daun menonjol keluar. Tanaman nilam jarang berbunga, bunga tumbuh di ujung tangkai, bergerombol dan memiliki karakteristik warna ungu kemerahan. Tangkai bunga memiliki panjang antara 2 – 8 cm dengan diameter 1–1,5 cm. Mahkota bunga berukuran 8 mm (Rukmana, 2003).

Tanaman nilam mempunyai batang berkayu dengan diameter 10 – 20 mm relatif hampir berbentuk segi empat. Sebagian besar daun yang melekat pada ranting hampir selalu berpasangan satu sama lain. Jumlah cabang yang banyak dan bertingkat mengelilingi batang sekitar 3 – 5 cabang per tingkat. Tanaman ini memiliki umur tumbuh yang cukup panjang yaitu sekitar tiga tahun, panen perdana dapat dilakukan pada bulan ke 6 –

7 dan seterusnya setiap 2 – 3 bulan tergantung pemeliharaan dan pola tanam, kemudian dapat diremajakan kembali dari hasil tanaman.

2.3. Kandungan dan manfaat Nilam

Daun nilam memiliki kandungan minyak atsiri, flavonoida, saponin, tanin, glikosida, terpenoid dan steroid (Bunrathep dkk.,2006). Daun kering tanaman ini disuling untuk mendapatkan minyak nilam (*Patchouli oil*) yang banyak digunakan diberbagai kegiatan industri. Fungsi utama minyak nilam sebagai bahan baku pengikat (fiksatif) dari komponen kandungan utamanya yaitu patchouli alcohol dan sebagai bahan eteritis untuk parfum agar aroma keharumannya bertahan lebih lama. Selain itu minyak nilam digunakan sebagai bahan campuran produk kosmetika (diantaranya untuk pembuatan sabun, pasta gigi, sampo, lotion dan deodorant). Kebutuhan industri makanan diantaranya pembuatan obat anti radang, anti fungi, anti serangga, afrodisiak, anti inflamasi, anti depresi, anti flogistik serta dekongestan. Kebutuhan aroma terapi serta berbagai kebutuhan industri lainnya. Aroma minyak nilam sangat kaya, terkesan rasa manis, hangat dan menyengat. Aroma tetap terasa manis sampai seluruh minyak menguap (Dhalimi, 1998).

2.4. Kultur Jaringan

Kultur jaringan tanaman merupakan teknik menumbuh-kembangkan bagian tanaman, baik berupa sel, jaringan atau organ dalam kondisi aseptik secara *in vitro*. Teknik ini dicirikan oleh kondisi kultur yang aseptik, penggunaan media kultur buatan dengan nutrisi lengkap dan Zat Pengatur Tumbuh, serta kondisi ruang kultur yang suhu dan pencahayaannya terkontrol (Yusnita, 2003).

Aplikasi teknik kultur jaringan bertujuan untuk eliminasi suatu penyakit atau produksi bibit bebas penyakit, kelestarian plasma nutfah, memperoleh varietas unggul dan produksi senyawa metabolit sekunder. Oleh karena itu, teknik kultur jaringan sangat penting diterapkan dalam

perbanyak tanaman baik untuk tanaman pertanian maupun tanaman perkebunan (Basri, 2016).

Selain untuk perbanyak, kultur in vitro telah digunakan untuk menghasilkan bibit vanili yang bebas penyakit. Penggunaan kultivar vanili yang tahan penyakit busuk batang dengan hasil tinggi diharapkan merupakan alternatif pengendalian penyakit yang penting. Planlet vanili yang tahan terhadap infeksi penyakit busuk batang telah diinisiasi dan diseleksi secara in vitro dalam medium MS (Nurchayani, 2013).

Teknik kultur jaringan memiliki prospek yang lebih baik dari pada metode perbanyak tanaman secara vegetatif konvensional dikarenakan keuntungan-keuntungan seperti berikut ini :

1. Jutaan klon dapat dihasilkan dalam waktu setahun hanya dari sejumlah kecil jaringan awal. Dengan metode vegetatif konvensional dibutuhkan waktu bertahun-tahun untuk menghasilkan tanaman dalam jumlah yang sama dan jumlah bahan awal yang diperlukan pun lebih besar.
2. Teknik kultur jaringan menawarkan suatu alternatif bagi spesies-spesies yang resisten terhadap sistem perbanyak vegetatif konvensional dengan melakukan manipulasi terhadap faktor-faktor lingkungan, termasuk penggunaan zat pengatur tumbuh.
3. Kemungkinan untuk mempercepat pertukaran bahan tanaman di tingkat Internasional. Apabila di tangani secara hati-hati, status aseptik dari bahan tanaman mengurangi kemungkinan bagi introduksi atau pun penyebaran penyakit tanaman.
4. Teknik kultur jaringan tidak tergantung pada musim. Stok tanaman dapat segera diperbanyak pada sembarang waktu setelah pengiriman ataupun penyimpanan karena semua proses dilakukan dibawah kondisi lingkungan yang terkendali di laboratorium ataupun rumah kaca (Zulkarnain, 2009).

2.5. Kultur Suspensi Sel

Pembiakan tanaman yang dilakukan secara vegetatif menggunakan teknologi kultur jaringan tidak lepas dari beberapa bahan yang dikembangkan. Kultur suspensi merupakan salah satu metode pengembangbiakan bahan tanam dan merupakan suatu sistem yang lebih detail untuk dapat mempelajari mekanisme perkembangbiakan tanaman dalam skala sel. Sel-sel embriogenik sebagai bahan suspensi yang digunakan sebagai sumber protoplas untuk dapat difusikan sehingga berpotensi menjadi embrio somatik. Penggunaan kultur suspensi tanaman dapat meningkatkan produksi tanaman karena lebih berpotensi menjadi tanaman baru dan perkembangan sel tanaman yang dapat tumbuh pada media diharapkan dapat tumbuh menjadi tanaman baru sehingga prinsip kultur jaringan yaitu memanfaatkan totipotensi sel dapat dioptimalkan dengan mengembangbiakkan sel-sel embriogenik tanaman (Sumaryono dan Riyadi, 2005).

Keberhasilan kultur suspensi sangat dipengaruhi oleh perlakuan yang diberikan serta beberapa faktor lain seperti sub kultur pada bahan tanamnya. Subkultur kalus bertujuan untuk tetap menyediakan nutrisi bagi kalus, selain itu subkultur kalus juga meningkatkan bobot biomasnya. Subkultur pada kultur suspensi pada beberapa kali pengulangan memiliki hasil yang baik pada kallus yang dikembangkan, akan tetapi hal ini juga dapat berdampak buruk ketika subkultur dilakukan secara berulang-ulang. Sumaryono dan Riyadi (2005), subkultur dilakukan dengan memperhatikan perkembangan sel yang tumbuh pada media cair dan berdasarkan hasil penelitian subkultur optimal dilakukan setelah 14 hari dan pengulangan subkultur dilakukan sebanyak 2 kali yang paling efektif.

Pada sisi lain, kalus yang remah dilaporkan sebagai sumber eksplan yang ideal untuk kultur suspensi sel dari berbagai spesies tanaman, karena dapat hancur dengan bebas (Cai and Kang 2014, Mujib *et al*,2014,Dwi Vedi *et al*, 2016).

2.6. Kultur Suspensi Sel Tanaman nilam

Kultur suspensi sel adalah pemeliharaan sel tunggal maupun gabungan beberapa sel, dalam medium cair dan lingkungan buatan yang steril. Kultur suspensi sel terdiri atas populasi sel dengan laju pertumbuhan yang cepat karena seluruh permukaan sel dapat kontak langsung dengan medium nutrisi. Hal ini menyebabkan metabolisme sel lebih tinggi jika dibandingkan dengan kultur kallus (Aziz *et al.*,2006).

Metode kultur suspensi sel dapat digunakan sebagai sarana untuk produksi metabolit sekunder. Hal ini dapat terjadi karena setiap sel tumbuhan yang diisolasi dari tumbuhan induknya mempunyai potensi genetik dan fisiologi yang sama dengan induknya atau yang dikenal dengan nama sifat totipotensi . sifat ini menyebabkan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman induk dapat pula dihasilkan pada sel yang dikultur secara *in vitro*. Potensi kultur sel untuk memproduksi metabolit telah dibuktikan pertama kali oleh perusahaan farmasi Amerika Pfizer Inc pada tahun 1956. Sedangkan potensi kultur sel untuk memproduksi senyawa bermanfaat terutama untuk obat-obatan, telah dimulai pada akhir tahun 1960. Metode suspensi sel (*cell suspension*) melalui beberapa tahapan dari induksi kalus (*Callus Induction*), Inisiasi suspensi sel (*Initiation of Cell Suspension*), pemeliharaan suspensi sel (*Maintenance of Cell Suspension*) dan Regenerasi Tanaman (Strosse, *et al.*,2008).

2.7. Somatik Embriogenesis

Perkembangbiakan tanaman melalui kultur jaringan didapatkan dari berbagai jaringan maupun sel tanaman yang memiliki potensi besar untuk dapat dikembangkan kemampuan beberapa sel tanaman untuk menghasilkan tanaman baru dengan pembentukan embrio tanpa adanya pertemuan gamet jantan dan betina tanaman didapatkan melalui somatik embriogenesis. Sukamadjaja dan mulyana (2011) pengembangan organ-organ somatik dapat berasal dari bagian tanaman dan memiliki ciri tanpa pembuahan sel, melainkan melalui pengkalusan yang bersifat bipolar

sehingga mampu meregenerasi menjadi tanaman utuh somatik embriogenesis membentuk kalus untuk kemudian melewati tahap-tahap perkembangan tanaman pada umumnya yaitu deferensiasi hingga terbentuk tunas dan pendewasaan.

Menurut Zavattieri, *et al*; (2010) beberapa tahapan somatik Embriogenesis terjadi pada tahap induksi maupun proliferasi dengan penambahan zat penstimulus yang tepat sel somatik akan merespon sehingga terekspresi pembentukan dan perkembangan preembrio untuk selanjutnya diikuti tahap perkembangan kalus mulai dari globular, skutelar, koleoptilar dan kotiledon.

Perbanyakan *in vitro* dapat dilakukan melalui pembentukan tunas lateral dan melalui embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik merupakan salah satu teknik yang akhir-akhir ini menjadi alternatif untuk perbanyakan tanaman. Melalui teknik ini, embrio somatik dapat dihasilkan secara langsung dan secara tidak langsung tanpa melalui fusi gamet. Embrio somatik yang terbentuk secara tidak langsung terjadi melalui fase antara yaitu dengan membentuk kalus dan kembali menjadi meristematik dari sel yang terdiferensiasi (Santos dan Paz, 2016).

Pada embriogenesis somatik langsung, embrio somatik terbentuk langsung dari eksplan yang ditumbuhkan tanpa didahului dengan pembentukan kalus, sedangkan pada embriogenesis somatik tidak langsung, pembentukan embrio somatik diawali dengan terbentuknya kalus yang selanjutnya mengalami beberapa tahanan perkembangan (Quiroz-figueroa *et al*, 2002). Menurut Quiroz-figueroa *et al* (2006), teknik embriogenesis somatik memegang peranan penting dalam propagasi klon Selanjutnya Smertenko dan Bozhkov (2014) melaporkan bahwa embrio somatik berasal dari satu sel tunggal atau sekelompok sel dengan morfologi dan latar belakang genetik yang sama pada respon terhadap rangsangan lingkungan yang dihasilkan oleh jaringan disekitarnya pada media kultur.

2.8. Kalus Embriogenik

Kalus embrioegenik yang dapat berkembang secara bertahap merupakan komponen yang penting pada tahap embriogenesis somatik tidak langsung. Kalus merupakan massa sel yang tidak terorganisasi dan tidak terdiferensiasi sedangkan kalus embriogenik merupakan kalus yang dapat berkembang membentuk embrio somatik. Pada konsentrasi tinggi, 2,4-D akan merangsang kalus dan pertumbuhan eksplan embrio dan kotiledon pada tanaman mindi (Kaviani,2014).

Kalus embriogenik merupakan kalus yang berpotensi berkembang membentuk embrio somatik. Terbentuknya kalus embriogenik dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain media dan zat pengatur tumbuh. Menurut Oetami (2015) terbentuknya kalus embriogenik merupakan tanda keberhasilan induksi kalus dalam embriogenesis somatik tidak langsung(pembentukan embrio somatik melalui fase kalus. Kalus embriogenik sangat dipengaruhi oleh interaksi antara perlakuan auksin dan posisi eksplan. Kalus embriogenik sering dicirikan dengan warna kalus yang terbentuk (Rusdianto & Indrianto,2012).

2.9. Zat Perangsang Tumbuh

Zat Pengatur Tumbuh (plant growth regulator) adalah senyawa organik bukan nutrisi yang dalam konsentrasi rendah (Dewi, 2008). Dua golongan zat pengatur tumbuh yang sangat penting adalah sitokinin dan auksin. Zat pengatur tumbuh ini mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur. Selain auksin dan sitokinin, giberelin dan persenyawaan lain juga dapat di tambahkan dalam media tanam kultur jaringan, auksin dan sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang di butuhkan dalam media kultur jaringan dan di berikan dalam konsentrasi yang sesuai dengan pertumbuhan yang diinginkan (Hidayat,2007).

Penggunaan zat pengatur tumbuh dalam kultur jaringan tanaman juga sangat penting, yaitu untuk mengontrol organogenesis dan morfogenesis dalam pembentukan dan perkembangan tunas dan akar

serta pembentukan kalus. Ada dua golongan zat pengatur tumbuh tanaman yang sering digunakan dalam kultur jaringan, yaitu sitokinin dan auksin. Beberapa ZPT sintetik yang merupakan golongan sitokinin antara lain BA (benzil adenin), kinetin (*furfuril amino purin*), BAP (*Benzil Amino Purin*), dan zeatin. ZPT golongan auksin antara lain IAA (*Indole Acetic Acid*), NAA (*Naphtalene Acetic Acid*), dan IBA (*Indole Butiric Acid*).

Penggunaan zat pengatur tumbuh didalam kultur jaringan tergantung pada arah pertumbuhan jaringan tanaman yang diinginkan. Untuk pembentukan tunas pada umumnya digunakan sitokinin sedangkan untuk pembentukan akar atau pembentukan kalus digunakan auksin. Namun, sering pula digunakan keduanya tergantung pada perbandingan atau ratio sitokinin terhadap auksin dan sebaliknya. Adanya salah satu zat pengatur tumbuh tertentu dapat meningkatkan daya aktivitas zat pengatur tumbuh lainnya. Jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tepat untuk masing-masing tanaman tidak sama karena tergantung pada genotipe serta kondisi fisiologi jaringan tanaman (Lestari, 2011).

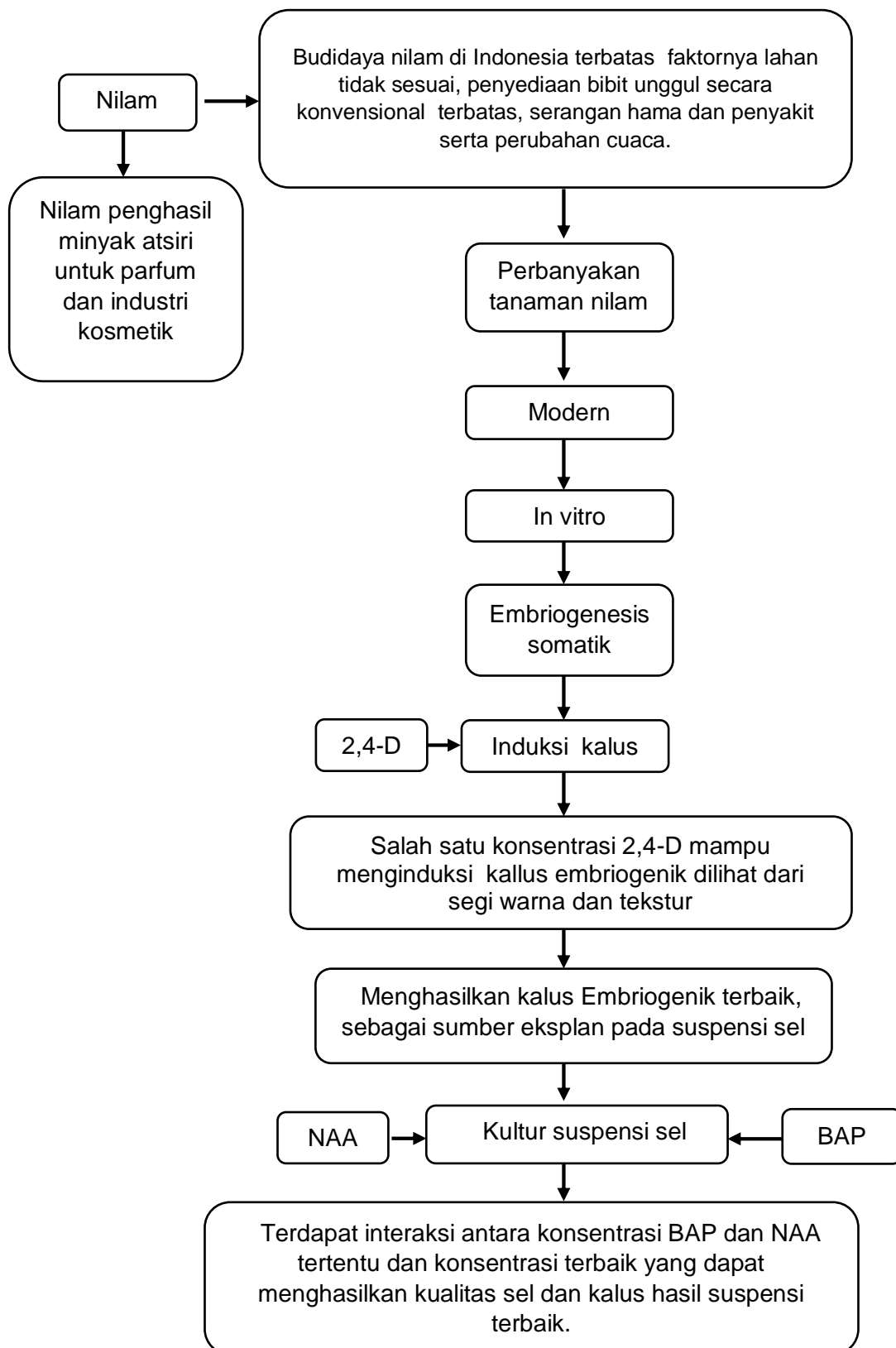
2.10. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman Nilam

Kultur jaringan tanaman dilakukan dengan menanam secara aseptik suatu jaringan tanaman dengan memanfaatkan sifat totipotensi sel pada tanaman, sehingga dengan pengaturan nutrisi pada media dapat dihasilkan tanaman sesuai harapan. Penggunaan media *Murashige and Skoog* (MS) 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D merupakan komposisi media dan zat pengatur tumbuh yang sesuai, sehingga dapat menginduksi pembentukan kalus maupun pindah tanam kalus (Fiah, 2014).

Penelitian yang dilakukan oleh Musthofa (2018) menyatakan bahwa propagasi secara *in vitro* tanaman nilam dengan konsentrasi 1 mg L⁻¹ 2,4-D mampu menumbuhkan kalus nilam varietas sidikalang pada presentase tumbuh sebesar 21% dan berat kalus 0,13 g selama 14 hari setelah tanam (HST). Hasil penelitian Wardani (2020) menemukan bahwa

konsentrasi 1 mg L^{-1} 2,4-D + 1 mg L^{-1} BAP mampu menumbuhkan kalus eksplan daun nilam Aceh aksesituak sebesar 100%.

Keberhasilan embriogenesis somatik dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain zat pengatur tumbuh yang digunakan. 2,4-D merupakan salah satu hormon tumbuh dari kelompok auksin yang banyak digunakan dalam induksi kalus dan kalus embriogenik. Pancaningtyas, (2015) melaporkan bahwa keseimbangan konsentrasi auksin dan sitokinin yang ada dalam jaringan merangsang terbentuknya kalus embriogenik.



Gambar 1. Kerangka berpikir dan bagan penelitian