

# BAB I. PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Tembesu (*Fagraea fragrans* Roxb.) merupakan salah satu jenis pohon dari famili *Gentianaceae* yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan penyebaran alami yang luas di wilayah Indomalaysia, termasuk di Indonesia seperti di Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, hingga Papua. Secara ekologi, pohon ini berfungsi sebagai tanaman pionir yang mampu tumbuh di lahan kritis (Purmadewi et al., 2018). Manfaat utamanya terletak pada kualitas kayunya yang sangat tahan lama, sehingga sering digunakan untuk konstruksi berat, seperti pembuatan jembatan, tiang elektrik, dan perabotan. Sementara itu kulit, batang, serta daunnya berpotensi sebagai bahan obat-obatan (Purmadewi et al., 2018).

Kayu tembesu walaupun memiliki potensi ekonomi yang besar, ketersediaan kayu tembesu pada masa ini masih sangat bergantung pada hasil tegakan hutan alam. Masalah utama yang dihadapi adalah kurangnya usaha budidaya secara intensif oleh masyarakat, yang menyebabkan tekanan terhadap tegakan alami semakin meningkat. Akibatnya, populasi tembesu di alam terus menunjukkan kecenderungan menurun secara drastis. Jika keadaan ini dibiarkan tanpa adanya langkah pemulihan, keberadaan tembesu sebagai sumber daya genetik dan komoditi kayu berkualitas tinggi terancam akan punah (Purmadewi et al., 2018).

Sebagai upaya perbaikan dan penyelamatan populasi, diperlukan teknik perbanyak bibit yang cepat dan massal untuk menyokong aktivitas penanaman semula. Perbanyak secara konvensional (alami) generatif maupun vegetatif sering kali menghadapi kendala ketersediaan benih yang bermusim dan pertumbuhan yang lambat (Wahyuningsih, 2024). Oleh karena itu, teknik kultur jaringan atau kultur *in vitro* menjadi solusi yang efektif kerana mampu menghasilkan bibit berkualitas dalam jumlah banyak, seragam, bebas penyakit, dan tidak bergantung pada musim (Urfiana et al., 2013; Nurhaerati, 2018).

Salah satu tahap kritikal dalam kultur *in vitro* untuk regenerasi tanaman adalah induksi kalus. Kalus adalah kumpulan sel yang belum terdiferensiasi yang memiliki sifat totipotensi untuk berkembang menjadi tanaman utuh. Keberhasilan pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh penggunaan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang tepat, khususnya formulasi antara auksin dan sitokinin. Auksin seperti 2,4-D berfungsi merangsang pembelahan sel, dan sitokinin seperti BAP berperan dalam morfogenesis tunas (Wahyuningsih, 2024).

Teknik ini memiliki keunggulan dalam hal pemisahan sel-sel kalus yang dapat diarahkan untuk berkembang menjadi embrio stomatik, serta tingkat perkembangan t tinggi. Jenis zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan dalam an adalah auksin dan sitokinin. Umumnya auksin dan sitokinin si kalus dan organogenesis serta meningkatkan produksi metabolit jsih, 2024).

mbuh (ZPT) seperti auksin dan sitokinin banyak digunakan dalam untuk menginisiasi kalus dan meningkatkan proses morfogenesis olit sekunder (Mastuti et al., 2018). Auksin seperti 2,4-D berperan



dalam merangsang pembelahan dan pertumbuhan sel, namun dalam jumlah besar dapat menghambat regenerasi tunas. Sebaliknya, sitokinin seperti BAP dan kinetin berperan penting dalam pembentukan tunas dan pembelahan sel. Oleh karena itu, penambahan konsentrasi yang seimbang dari auksin dan sitokinin sangat penting dalam proses inisiasi kalus (Nursyamsi et al., 2007).

Penelitian oleh Isda dan Afrilla (2023) menunjukkan bahwa penggunaan BAP sebesar 0,5 ppm pada eksplan petiol tembesu mampu menghasilkan kalus dengan persentase tertinggi mencapai 70%. Namun, pada penelitian tersebut hanya menggunakan satu ZPT yaitu BAP sehingga persentase tertinggi yang di dapatkan belum maksimal, oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk menguji formulasi ZPT BAP dan 2,4-D yang paling efektif dalam menginduksi kalus tembesu secara *in vitro* serta mengevaluasi keberhasilan induksi kalus yang dihasilkan. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat mendukung upaya perbanyakan bibit tembesu secara cepat dan massal, khususnya untuk pengembangan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon, Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin.

## 1.2 Landasan Teori

Kultur *in vitro* adalah teknik perbanyakan tanaman secara aseptik yang melibatkan penumbuhan sel, jaringan, atau organ tanaman dalam kondisi steril pada media buatan. Metode ini berperan penting dalam bidang penelitian dasar, aplikasi terapan, serta produksi skala industri. Teknik kultur jaringan memungkinkan pembentukan tanaman baru dari bagian vegetatif tanaman seperti daun, batang, atau akar (Anitasari et al., 2018).

Teknik kultur jaringan adalah cara untuk mengisolasi bagian dari tanaman dan menumbuhkannya dalam kondisi steril, sehingga dapat berkembang biak dan beregenerasi menjadi tanaman baru. Prinsip utamanya adalah memperbanyak tanaman menggunakan bagian vegetatif pada media buatan dalam lingkungan steril. Metode ini efisien dalam menghasilkan bibit tanaman tanpa perlu banyak induk, dengan sifat yang mirip dengan tanaman aslinya, serta waktu pertumbuhan yang singkat dan membutuhkan sedikit ruang, metode ini berguna untuk menghilangkan virus. Studi yang dilakukan oleh Parmessur et al., (2002) menunjukkan bahwa metode kultur kalus secara *in vitro* dapat menghilangkan virus penyebab penyakit garis kuning hingga 100%, sementara kultur meristem apikal dapat mengurangi virus tersebut hingga 64% (Anitasari et al, 2018).

Kultur kalus merupakan teknik kultur jaringan yang menggunakan sekumpulan sel yang tidak terorganisir yang berasal dari berbagai eksplan awal. Kalus diinduksi dari eksplan organ tanaman yang mengalami pelukaan. Ketika organ tanaman mengalami gangguan fisik (pelukaan) maka respon perbaikan diinduksi pada bagian yang



. Respon ini bersama-sama dengan induksi pembelahan sel-sel dekat pelukaan untuk menutup pelukaan. Tetapi jika pelukaan in kultur aseptik pada medium tumbuh tertentu maka respon awal distimulasi dan diinduksi untuk berlanjut secara terus-menerus sogen senyawa-senyawa kimia tertentu yang ditambahkan pada

medium. Hasilnya adalah massa sel yang membelah terus menerus tanpa diferensiasi dan organisasi (Anitasari et al., 2018).

Kultur *in vitro* terbentuk dua macam kalus yaitu kalus yang berpotensi menjadi tanaman utuh melewati tahapan *embryogenesis* disebut kalus embriogenik dan kalus yang memiliki potensi menjadi untuk langsung beregenerasi menjadi tanaman utuh tanpa melewati tahapan *embryogenesis* disebut kalus non embriogenik. Kalus embriogenik membentuk embrio berjumlah banyak pada satu wadah kultur (Nisak, 2016). Media dasar saja tidak mencukupi untuk kultur jaringan, diperlukan penambahan zat pengatur tumbuh atau ekstrak organik guna memengaruhi perkembangan kultur.

Zat pengatur tumbuh eksogen seperti auksin dan sitokinin sangat berpengaruh dalam proses pembentukan kalus. Auksin seperti 2,4-D berperan dalam merangsang pembelahan sel, sedangkan sitokinin seperti BAP berperan dalam pembentukan tunas dan morfogenesis. Interaksi antara auksin dan sitokinin yang seimbang sangat penting untuk keberhasilan kultur *in vitro* (Setiani, 2018).

Penambahan zat pengatur tumbuh eksogen akan mengubah level zat pengatur tumbuh endogen sel. Perimbangan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang sesuai akan sangat besar pengaruhnya untuk menghasilkan planlet. Untuk pertumbuhan dan perkembangan *in vitro* diperlukan komposisi dan atau konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda untuk satu varietas dengan varietas lain dari suatu tanaman. Penentuan taraf konsentrasi juga disesuaikan dengan tipe organ atau eksplan, Setiani, (2018).

Metode kultur jaringan yang dilakukan dengan jalan memacu pembelahan sel secara terus menerus dari bagian tanaman tertentu seperti daun, akar, batang, dan sebagainya dengan menggunakan zat pengatur tumbuh hingga terbentuk massa sel. Massa sel (kalus) tersebut selanjutnya akan beregenerasi melalui organogenesis ataupun embriogenesis hingga menjadi tanaman lengkap (Bustami, 2011). Kalus merupakan suatu kumpulan masa sel yang terbentuk dari sel-sel jaringan yang terus menerus membelah diri. Pembentukan kalus terjadi karena sel dapat berpoliferasi pada bekas-bekas luka irisan bagian tanaman tersebut (Fauziyyah et al., 2015).

Isda dan Uलयani (2023), menyatakan bahwa Kalus biasa terbentuk oleh karena adanya pelukaan. Pada eksplan hidup yang belum berhasil menginduksi kalus, diduga karena rendahnya jumlah auksin endogen yang terdapat pada eksplan sehingga diperlukan penambahan auksin eksogen untuk memacu pembentukan kalus. Hal ini sejalan dengan Rasud dan Bustaman (2020) rendahnya auksin pada eksplan menyebabkan rendahkan persentase terbentuknya kalus. Berdasarkan penelitian Sari et al. (2014) penggunaan BAP yang dikombinasikan dengan 2,4-D mampu memacu pembentukan kalus eksplan daun *Carica pubescens* hingga 100%.



## BAB II. METODE PENELITIAN

### 2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Oktober 2025 di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin Makassar, Sulawesi Selatan.

### 2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan *laminar air flow cabinet* (LAFC), *autoclave*, oven, *hot plate & magnetic stirrer*, *alat kultur*, alat diseksi (pinset, gunting, gagang, pisau scalpel), timbangan analitik, pH meter, alat gelas standar (gelas piala, gelas ukur dan botol kultur), mikropipet, lampu bunsen, korek api, cawan petri, wadah, *log book*, *microwave*, *hand spray*, ATK (Alat Tulis Kerja) dan alat dokumentasi.

### 2.3 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan berasal dari planlet tanaman tembesu yang diambil dari bibit koleksi BPTH Wilayah II Makassar. Bibit tersebut berasal dari Taman Nasional Bulusaraung Bantimurung. Adapun media dasar yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Murashige And Skoog* (MS) dan terdapat modifikasinya seperti larutan mikro, stok makro, stok Fe, stok vitamin, *myo-inositol*, glukosa yang dipadatkan dengan agar-agar pematid. Bahan lain yang digunakan yaitu zat pengatur tumbuh (ZPT) berupa *Benzyl Amino Purine* (BAP) dan *2,4 diklorofenoksiasetat*. Bahan sterilisasi yang digunakan yaitu alkohol 70%, aquades steril. Bahan tambahan yang digunakan adalah tissue, wrapping, sarung tangan, masker, kain hitam, milimeter block, kertas saring, label, plastic wrapping dan aluminium foil.

### 2.4 Prosedur Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, dimulai dari sterilisasi alat dan bahan, dilanjutkan dengan pembuatan media kultur, sterilisasi eksplan sebelum penanaman, penanaman eksplan ke dalam botol kultur berisi media, dan diakhiri dengan tahap pengamatan serta pengumpulan data.

#### 2.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh alat dan bahan yang akan digunakan dalam kultur jaringan harus bersih dan steril. Alat-alat dicuci dan dikeringkan terlebih dahulu, kemudian disterilkan pada suhu 121 °C dengan tekanan 117 kPa selama 20 menit (dalam aquades), atau menggunakan oven pada suhu 150 °C selama 20 menit. Pinset, gagang, dan scalpel yang telah dibungkus kertas).



#### Media

Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

Kultur dilakukan setelah semua larutan stok siap. Media yang digunakan adalah *Murashige and Skoog* (MS). Campurkan aquades steril ( $\frac{1}{3}$  dari volume

gelas piala 1000 ml) dengan gula, larutan makro, mikro,  $\text{FeSO}_4$ , vitamin, dan myo-inositol sesuai konsentrasi. Tambahkan aquades hingga 1000 ml, lalu masukkan ZPT berupa BAP dan 2,4-D sesuai perlakuan. Panaskan larutan media hingga mendidih menggunakan microwave, tuang ke dalam botol kultur, tutup rapat, dan sterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121\text{ }^\circ\text{C}$  selama 15 menit.

### 2.4.3 Pembuatan Media

Sterilisasi untuk penanaman dimulai dengan menyemprot Laminar Air Flow Cabinet (L AFC) menggunakan alkohol 70%. Semua alat yang akan digunakan, termasuk botol kultur, lampu bunsen, plastik wrapping, cawan petri, kertas saring, tabung reaksi berisi alkohol, korek api, dan alat diseksi (pinset, spatula, pisau, scalpel, dan gunting) juga disemprot alkohol sebelum dimasukkan ke dalam L AFC. L AFC dan lampu UV dinyalakan selama 20 menit untuk sterilisasi, lalu UV dimatikan dan kipas L AFC dinyalakan. Setelah itu, eksplan dimasukkan. Lampu bunsen dinyalakan, dan alat diseksi disterilkan dengan cara dicelupkan ke dalam alkohol, kemudian dibakar dan didiamkan sejenak sebelum digunakan.

### 2.4.4 Persiapan Eksplan

Sumber eksplan yang digunakan adalah eksplan yang berasal dari planlet tanaman tembesu yang sehat, tidak terkontaminasi atau terinfeksi hama dan penyakit tanaman. Menyemprotkan alkohol 70% diluar botol planlet yang akan di induksi ke botol kultur media yang baru.

### 2.4.5 Penanaman Eksplan

Penanaman dilakukan dalam L AFC dengan planlet tanaman dimasukkan kedalam cawan petri yang berisi kertas saring menggunakan pinset, dan bagian daun tanaman dipotong menggunakan pisau *scalpel*. Menanam eksplan planlet dalam botol kultur yang didekatkan dengan lampu bunsen menggunakan pinset. Menutup rapat botol kultur dan merekatkannya dengan *plastic wrapping* yang telah ditanami planlet. Kemudian memberikan tanda pada botol-botol yang telah ditanami dengan mencantumkan tanggal penanaman, nama media serta jenis peralihan yang telah diberikan. Setelah itu menyusun botol kultur ke rak kultur yang dalam gelap atau tanpa cahaya.

## 2.5 Rancangan Penelitian



akan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor, yaitu atur Tumbuh (ZPT), yang terdiri atas 10 perlakuan. Setiap perlakuan juga total ada 30 unit percobaan. Rancangan penelitian yang akan dit pada **Tabel 1**. (Wahyuningsih, 2024).

Perlakuan dengan Berbagai Konsentrasi ZPT pada Induksi Kalus

Tembesu (*Fagreae frafrans* Roxb.) secara *In Vitro*

Perlakuan	Jenis Media
IK0	Tanpa 2,4-D dan BAP
IK1	MS + 3 ppm 2,4-D + BAP 0,5 ppm
IK2	MS + 3,5 ppm 2,4-D + BAP 0,5 ppm
IK3	MS + 4 ppm 2,4-D + BAP 0,5 ppm
IK4	MS + 3 ppm 2,4-D + BAP 0,75 ppm
IK5	MS + 3,5 ppm 2,4-D + BAP 0,75 ppm
IK6	MS + 4 ppm 2,4-D + BAP 0,75 ppm
IK7	MS + 3 ppm 2,4-D + BAP 1 ppm
IK8	MS + 3,5 ppm 2,4-D + BAP 1 ppm
IK9	MS + 4 ppm 2,4-D + BAP 1 ppm

## 2.6 Variabel Pengamatan

Pengamatan dilakukan secara rutin setelah penanaman selama 30 hari. Variabel yang diamati meliputi:

- Waktu tumbuh kalus (hari setelah tanam/HST), pengamatan yang ditandai adanya pembengkakan atau munculnya jaringan putih kehijauan pada permukaan eksplan pada setiap perlakuan.
- Warna kalus, pengamatan dilakukan setiap 1 x seminggu dengan mengamati secara visual dan akhir pengamatan dilakukan menggunakan buku *Muncell color plant*.
- Persentase eksplan hidup dan eksplan mati, pengamatan dilakukan pada akhir pengamatan 4 Minggu Setelah Tanam (MST) menurut Hasmawati (2019) persentase eksplan hidup dan mati dihitung dengan menggunakan rumus berikut:
  - Presentase Eksplan Hidup

$$\text{Eksplan Hidup (\%)} = \sum \frac{\text{Jenis hidup}}{\text{jumlah Eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$

- Presentase *Eksplan Mati*

$$\text{Eksplan mati (\%)} = \sum \frac{\text{Jumlah Eksplan mati}}{\text{jumlah Eksplan yang ditanam}} \times 100\%$$



pengamatan tekstur kalus dilakukan di akhir pengamatan (4 MST) untuk mengetahui apakah kalus termasuk remah (*friable*), kompak (*non friable*), dan

pengukuran berat kalus dilakukan pada akhir (4 MST) dengan

menggunakan neraca analitik.

## 2.7 Analisis Data

Data parameter hasil waktu tumbuh kalus dan berat kalus yang di analisis menggunakan *Microsoft Excel*, Transformasi Data, dan program SPSS dalam analisis ragam (ANOVA/*Analysis of variance*), jika hasilnya signifikan maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil).

