

**PENGARUH VARIASI ZAT PENGATUR TUMBUH BAP DAN NAA
TERHADAP PEMBENTUKAN ORGAN, KALUS, DAN SENYAWA
AKTIF PADA DAUN ZODIA (*Evodia suaveolens* Scheff.)**

SKRIPSI



Oleh :

**Rosa Omega Bella Kurniana
19133706A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**PENGARUH VARIASI ZAT PENGATUR TUMBUH BAP DAN NAA
TERHADAP PEMBENTUKAN ORGAN, KALUS, DAN SENYAWA
AKTIF PADA DAUN ZODIA (*Evodia suaveolens* Scheff.)**

SKRIPSI



*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh :

**Rosa Omega Bella Kurniana
19133706A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul

PENGARUH VARIASI ZAT PENGATUR TUMBUH BAP DAN NAA TERHADAP PEMBENTUKAN ORGAN, KALUS, DAN SENYAWA AKTIF PADA DAUN ZODIA (*Evodia suaveolens* Scheff.)

Oleh :

Rosa Omega Bella Kurniana
19133706A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan,

Prof. Dr. R. Octari, SU., MM., MSc., Apt.

Pembimbing,

Dr. Supriyadi, M.Si

Pembimbing Pendamping,

Dra. Kartinah Wiryosoedjoyo, SU

Penguji :

1. D. Andang Arif Wibawa, SP., M.Si
2. Ismi Rahmawati, M.Si., Apt
3. Tri Wijayanti, MPH., Apt
4. Dr. Supriyadi, M.Si

1.
2.
3.
4.

HALAMAN PERSEMBAHAN

Tuhan yang mengawali, Tuhan yang mengakhiri

(Anonim)

Semua akan indah pada waktu-Nya

(Pengkhotbah 3:11)

Kita berusaha, Tuhan membantu

(Antonius Invarien)

Karya ini kupersembahkan untuk

Tuhan Yesus Kristus

Bunda Maria

Keluargaku yang terhebat

(Papah, ibu, mas Andri, mbak Cindy, mbak Rini, dan keluarga besar)

Sahabat-sahabatku

(Fidelis, Chanary, Devi, Devina, Akalili, Diyah, Afra, Sagita, Dewi, Shally,
Bagas, Fransiska, Yulian, Rio, Fafa, Ari, Joly, Seli, Putri)

Teman- temanku

(Teori 1 Universitas Setia Budi angkatan 2013, FST-OA angkatan 2013, Keluarga
Santa Priska, KKN kelompok 6 angkatan 2013, UKM-UKM lain)

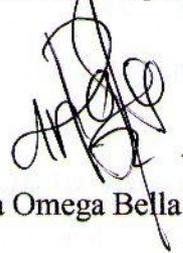
Almamater Universitas Setia Budi

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 5 April 2017



Rosa Omega Bella Kurniana

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan Yesus Kristus dan Bunda Maria yang telah menyertai dalam setiap proses penelitian sehingga penulis dapat dengan baik menyelesaikan skripsi yang berjudul **“PENGARUH VARIASI ZAT PENGATUR TUMBUH BAP DAN NAA TERHADAP PEMBENTUKAN ORGAN, KALUS, DAN SENYAWA AKTIF PADA DAUN ZODIA (*Evodia suaveolens* Scheff.)”** sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar kesarjanaan pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

Penulis menyadari bahwa dalam menyelesaikan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, maka penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Dr. Djoni Tarigan, MBA. Selaku Rektor Universitas Setia Budi Surakarta.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Dr. Supriyadi., M.Si dan Dra. Kartinah Wiryosoedjoyo, SU, selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan dorongan semangat selama penulisan skripsi.
4. D. Andang Arif Wibawa, SP., M.Si, Ismi Rahmawati, M.Si., Apt, dan Tri Wijayanti, MPH., Apt, selaku tim penguji yang telah memberikan masukan demi sempurnanya skripsi ini.
5. Kementrian Riset Dikti bekerjasama dengan Kopertis Wilayah VI yang telah memberikan dana untuk dapat terlaksananya penelitian ini.
6. Bapak dan Ibu dosen serta seluruh staf karyawan Universitas Setia Budi yang memberikan informasi dan bantuan kepada penulis.
7. Bapak Agustinus Sugiman, Ibu Lucia Nyenik, kakak Antonius Ivarien A.A, kakak Regina Cindy C.D, serta seluruh keluarga besar yang selalu mendoakan dan memberi dorongan.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini banyak kekurangan dan masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Penulis berharap

semoga apa yang telah dikemukakan akan berguna baik bagi pembaca pada umumnya, dan secara khusus dapat bermanfaat bagi ilmu kefarmasian.

Surakarta, 5 April 2017

Rosa Omega Bella Kurniana

Surakarta, 5 April 2017

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and lines, positioned above the printed name.

Rosa Omega Bella Kurniana

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Kegunaan penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Tanaman Zodia (<i>Euodia suaveolens</i> Scheff)	
1. Klasifikasi tanaman.....	5
2. Nama lain.....	5
3. Etiologi dan penyebarannya.....	6
4. Morfologi.....	6
5. Khasiat dan sifat.....	6
6. Kandungan bahan aktif.....	7
6.1 Linalool.....	7
6.2 Alpha-pinene.....	8
B. Kultur Jaringan Tumbuhan.....	8
C. Kalus.....	9
D. Media.....	10
E. Zat Pengatur Tumbuh.....	11
F. Sterilisasi.....	13
G. Ekstraksi.....	14
H. Kromatografi Gas.....	15
I. Landasan Teori.....	15

J. Hipotesis.....	17
BAB III METODE PENELITIAN.....	18
A. Populasi dan sampel.....	18
B. Variabel penelitian.....	18
1. Identifikasi variabel utama.....	18
2. Klasifikasi variabel utama.....	18
3. Definisi operasional variabel utama.....	19
C. Bahan dan alat.....	20
1. Bahan.....	20
2. Alat.....	20
2.1 Kultur eksplan, sterilisasi dan media.....	20
2.2 Pelumatan dan deteksi kandungan.....	20
D. Jalannya penelitian.....	21
1. Determinasi tanaman.....	21
2. Penyiapan sampel.....	21
3. Pembuatan media.....	21
3.1 Larutan makronutrien.....	21
3.2 Larutan stok mikronutrien.....	22
3.3 Larutan vitamin	22
3.4 Zat Pengatur Tumbuh.....	23
3.5 Pembuatan media MS dan penambahan ZPT BAP dan NAA.....	23
4. Sterilisasi alat, <i>entkas</i> , dan eksplan.....	24
4.1 Sterilisasi alat dan <i>entkas</i>	24
4.2 Sterilisasi eksplan.....	24
5. Penanaman eksplan dan subkultur kalus.....	24
5.1 Penanaman eksplan.....	24
5.2 Subkultur kalus.....	24
6. Pengamatan.....	25
6.1 Pertumbuhan kalus.....	25
6.2 Pertumbuhan akar.....	25
6.3 Berat segar total.....	25
6.4 Prosentase keberhasilan.....	25
7. Ekstraksi.....	25
8. Analisis kualitatif.....	25
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	27
A. Hasil Determinasi dan Deskripsi tanaman.....	27
1. Hasil Determinasi Tanaman.....	27
2. Hasil Deskripsi Tanaman.....	27
B. Bahan Tanaman yang Diperoleh.....	28
C. Hasil Pembuatan Media.....	28
D. Hasil Sterilisasi Alat, <i>Entkas</i> , dan Eksplan.....	30
E. Hasil Penanaman Eksplan.....	33
F. Pengamatan.....	33

1. Hasil Pertumbuhan Kalus.....	33
1.1 Tekstur dan Warna Kalus yang Diperoleh.....	33
1.2 Prosentase Keberhasilan Pertumbuhan Kalus.....	36
2. Prosentase Keberhasilan Pertumbuhan Akar.....	42
3. Berat Segar Total.....	44
4. Hasil Analisis Kandungan Senyawa.....	46
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	 50
A. Kesimpulan.....	50
B. Saran.....	50
 DAFTAR PUSTAKA.....	 51
LAMPIRAN.....	55

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Tanaman <i>Evodia suaveolens</i> , Scheff.....	5
2. Struktur kimia senyawa Linalool.....	7
3. Struktur kimia senyawa α -pinene.....	8
4. Diagram pengaruh perimbangan auksin dan sitokinin terhadap arah pertumbuhan jaringan tanaman pada kultur jaringan (George & Sherrington, 1984).....	12
5. Skema pembuatan medium MS dan MS setengah kuat volume 1 liter.....	23
6. Skema jalannya penelitian.....	26
7. Foto hasil visualisasi warna kalus.....	34
8. Foto hasil visualisasi tekstur kalus remah.....	34
9. Grafik prosentase keberhasilan pertumbuhan kalus.....	38
10. Foto hasil pertumbuhan kalus tiap variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh	38
11. Foto hasil kalus terkontaminasi pada tiap variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh.....	39
12. Grafik prosentase pertumbuhan akar.....	41
13. Foto hasil pertumbuhan akar pada berbagai variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh.....	42
14. Grafik berat segar rerata kalus dan organ akar.....	44

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Komposisi unsur hara makro media tanam <i>Murashige & Skoog</i> (MS) dan <i>Murashige & Skoog</i> (MS) setengah kuat (George & Sherrington, 1984).....	21
2. Komposisi unsur hara mikro media tanam <i>Murashige & Skoog</i> (MS) dan <i>Murashige & Skoog</i> (MS) setengah kuat (George & Sherrington, 1984).....	22
3. Komposisi vitamin media tanam <i>Murashige & Skoog</i> (MS) dan <i>Murashige & Skoog</i> (MS) setengah kuat (George & Sherrington, 1984).....	22
4. Variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh <i>Benzylaminopurine</i> (BAP) dan <i>Napthalene Acetic Acid</i> (NAA).....	23
5. Pembuatan media <i>Murashige & Skoog</i> (MS) setengah kuat dengan penambahan hormon <i>Benzylaminopurine</i> (BAP) dan <i>Napthalene Acetic Acid</i> (NAA).....	29
6. Bahan sterilisasi eksplan daun Zodia.....	31
7. Hasil visualisasi warna dan tekstur kalus.....	33
8. Prosentase keberhasilan pertumbuhan kalus.....	37
9. Waktu induksi kalus.....	40
10. Prosentase keberhasilan pertumbuhan akar.....	42
11. Perolehan berat segar kalus.....	44
12. Hasil analisis senyawa metabolit sekunder.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Pembuatan Konsentrasi Zat pengatur Tumbuh dan Larutan Sterilisasi.....	54
2. Perhitungan Prosentase Keberhasilan Pertumbuhan Kalus.....	56
3. Perhitungan Prosentase Keberhasilan Pertumbuhan Akar.....	58
4. Determinasi Tanaman.....	60
5. Alat.....	61
6. Hasil Pertumbuhan Kalus dan Akar.....	64
7. Gambar Hasil Ekstraksi.....	71
8. Gambar Hasil Penimbangan Kalus.....	74
9. Hasil Kromatogram.....	78

Daftar singkatan

MS	<i>Murashige & Skoog</i>
ZPT	Zat pengatur tumbuh
BAP	<i>Benzilaminopurin</i>
NAA	<i>Napthalene Acetic Acid</i>
DEET	<i>(N,N-diethyl-meta toluamide)</i>
NaOCl	<i>Sodium Hypochlorite</i>

INTISARI

KURNIANA, R.O.B., 2017, PENGARUH VARIASI ZAT PENGATUR TUMBUH BAP DAN NAA TERHADAP PEMBENTUKAN ORGAN, KALUS, DAN SENYAWA AKTIF PADA DAUN ZODIA (*Evodia suaveolens* Scheff.), SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Tanaman Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff.) mengandung senyawa linalool dan α -pinene yang sangat efektif sebagai *repellent* nyamuk. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh variasi penambahan zat pengatur tumbuh BAP dan NAA pada media *murashige skoog* setengah kuat terhadap pembentukan organ, pertumbuhan kalus, serta senyawa aktif linalool dan α -pinene pada eksplan daun Zodia.

Percobaan ini dilakukan dengan teknik kultur jaringan tanaman. Media *murashige skoog* setengah kuat digunakan sebagai media tumbuh. BAP dan NAA sebagai zat pengatur tumbuh. Penelitian ini menggunakan lima variasi kombinasi BAP: NAA berturut-turut yaitu, 0:2; 0,5:1,5; 1:1; 1,5:0,5; 2:0. Organ dan kalus yang terbentuk selanjutnya di analisis kualitatif menggunakan kromatografi gas. Pelarut yang digunakan adalah *n*-heksana.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan variasi kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan NAA yang berbeda berpengaruh terhadap pembentukan organ akar dan pertumbuhan kalus. Penambahan BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L mempunyai keberhasilan pertumbuhan organ akar yang paling baik yaitu sebesar 88,89%; sedangkan pertumbuhan kalus paling baik pada penambahan BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L yaitu sebesar 73,34%. Penambahan BAP dan NAA pada medium *murashige skoog* setengah kuat dengan waktu induksi delapan minggu tidak berpengaruh terhadap pembentukan senyawa aktif linalool dan α -pinene.

Kata kunci : kultur jaringan tumbuhan, eksplan daun Zodia, media MS setengah kuat, NAA, BAP, kromatografi gas

ABSTRACT

KURNIANA, R.O.B., 2017, THE INFLUENCE OF ADDITIONAL VARIATION BAP AND NAA TOWARD THE ESTABLISHMENT OF ORGAN, CALLUS, AND ACTIVE COMPOUND ON ZODIA LEAF (*Evodia suaveolens* Scheff.), SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Evodia suaveolens Scheff. contain of linalool and α -pinene compound which are very effective to mosquito repellent. This study aim to know the influence of additional growth regulators BAP and NAA at strong half Murashige Skoog medium for organ building, callus growth, and active compound of linalool and α -pinene at *Evodia suaveolens* Scheff. leaf explant.

This experiment was done with plant tissue culture. Strong half Murashige Skoog medium was used as grow medium. BAP and NAA as growth regulators. This research used five- combining variation of BAP : NAA were, 0:2; 0,5:1,5; 1:1; 1,5:0,5; 2:0. Organ and callus thus formed then analyst using gas chromatography. Solvent used *n*-heksana.

The result of this research showed that the different of adding variation combination of growth regulators BAP and NAA against of root organ building and callus growth. Adding BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L had success the best root organ growth was 88,89%, while the best of callus growth at BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L was 73,34%. Adding BAP and NAA at strong half Murashige Skoog medium wiht induce time eight weeks did not influence toward linalool dan α -pinene active compounds degree.

Keywords: plant tissue culture, *Evodia suaveolens* Scheff. leaf eplant, strong half MS medium, NAA, BAP, gas chromatography

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar belakang

Tanaman Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff.) merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang dapat digunakan untuk mengusir nyamuk. Tanaman ini berasal dari Papua (Lestari, 2005 *diacu dalam* Muhamat & Hidayaturrehman, 2014). Masyarakat Papua terbiasa menggosok kulitnya dengan daun Zodia sebelum masuk ke hutan agar terlindung dari serangan serangga, khususnya nyamuk. Hasil analisis yang dilakukan oleh Kardinan (2004) di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), minyak yang disuling dari daun tanaman Zodia terbukti mengandung linalool (46 persen) dan α -pinene (13,26 persen) dimana linalool sudah sangat dikenal sebagai pengusir (repellent) nyamuk (Kardinan, 2004).

Berdasarkan kajian yang dilakukan oleh Towaha dan Indriati (2011) dalam Majalah Semi Populer Tanaman Rempah dan Industri, pada umumnya hampir semua obat anti nyamuk berupa *lotion*, *cream* maupun *spray* yang beredar di Indonesia saat ini berbahan aktif senyawa DEET (*N,N-diethyl-meta toluamide*) yang merupakan bahan kimia sintesis beracun dalam konsentrasi 10-15%. Walaupun cukup efektif dan mempunyai daya *repellent* yang bagus, tetapi obat anti nyamuk jenis tersebut berisiko karena kandungan bahan kimianya bisa berdampak buruk, di antaranya dapat mengakibatkan : (1) keracunan; (2) reaksi hipersensitisasi maupun iritasi pada kulit; (3) polusi lingkungan; dan (4) nyamuk menjadi resisten. American Academy of Pediatrics (2003) menyatakan bahwa konsentrasi DEET sebesar 15% dalam etanol akan terserap ke dalam tubuh rata-rata sebanyak 8,4%, dimana penyerapan tersebut akan dimulai dalam dua jam setelah penggunaan. Senyawa DEET terserap secara sistematis ke dalam tubuh melalui kulit menuju jaringan sirkulasi darah, dimana dari sejumlah DEET yang terserap

hanya sebanyak 10-15% saja yang dapat terbuang melalui urin, sedangkan sisanya tertinggal dalam tubuh sebagai racun.

American Academy of Pediatric (2003) menyatakan bahwa konsentrasi 3% ekstrak daun Zodia sangat efektif sebagai *repellent* nyamuk selama dua jam, hal tersebut setara dengan konsentrasi DEET pada *lotion* maupun *cream* yang mengandung 10% DEET hanya efektif dalam waktu dua jam (Towaha & Indriati, 2011 dalam Majalah Semi Populer Tanaman Rempah dan Industri). Pengujian yang dilakukan oleh Kardinan (2004) terhadap nyamuk demam berdarah (*Aedes aegypti*), yaitu dengan cara menggosokkan daun Zodia ke lengan, lalu lengannya dimasukkan ke kotak yang berisi nyamuk demam berdarah, menunjukkan bahwa daun Zodia mampu menghalau nyamuk selama enam jam dengan daya halau (daya proteksi) sebesar lebih dari 70% (Marlina *et al*, 2009).

Teknik kultur jaringan dapat mengatasi kendala yang disebabkan oleh budidaya generatif dengan cara menyediakan bibit yang mempunyai kualitas seragam, mudah dalam perbanyakannya (Ermayanti *et al*, 2002 diacu dalam Fitriani, 2008) serta unggul secara genetis (Kusumodewi, 2005 diacu dalam Fitriani, 2008). Wiryosoedjoyo & Supriyadi (2014) dalam penelitiannya mengungkapkan bahwa dari ketiga media yaitu *Murashige Skoog* (MS), *Murashige Skoog* setengah kuat (MS setengah kuat) dan medium *New Phalaeonopsis* (NP) dengan penambahan zpt BAP, medium *Murashige Skoog* setengah kuat (MS setengah kuat) memberikan hasil pertumbuhan kalus paling baik. Penelitian ini menggunakan medium kultur jaringan *Murashige & Skoog* setengah kuat (MS setengah kuat) dengan penambahan zpt BAP dan NAA. Penggunaan zat pengatur tumbuh dalam kultur jaringan tanaman sangat penting, yaitu untuk mengontrol organogenesis dan morfogenesis dalam pembentukan dan perkembangan tunas dan akar serta pembentukan kalus. Auksin dan sitokinin adalah dua jenis hormon tanaman yang banyak dipakai dalam propagasi secara *in vitro*. BAP adalah salah satu zpt golongan sitokinin, sedangkan NAA adalah salah satu zpt golongan auksin. NAA dapat merangsang pembentukan akar sedangkan

BAP berperan sebagai perangsang pembelahan sel dalam jaringan yang dibuat eksplan serta merangsang pertumbuhan tunas daun (Wetherel, 1982 *diacu dalam* Fitriani, 2008). Multiplikasi tanaman Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff.) secara *in vitro* diharapkan dapat ditingkatkan dengan penambahan BAP dan NAA pada konsentrasi yang tepat. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi kombinasi zptBAP dan NAA terhadap pertumbuhan kalus dan identifikasi senyawa dalam kalus Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff.). Pengamatan dilakukan terhadap pembentukan kalus, karakteristik kalus (warna dan bau), pembentukan organ, berat segar total, dan pembentukan senyawa aktif.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah organ dan kalus dapat tumbuh dengan baik pada medium MS setengah kuat dengan penambahan kombinasi zpt BAP dan NAA?
2. Kombinasi zpt manakah yang paling baik menghasilkan organ dan kalus?
3. Bagaimana pengaruh penambahan zpt BAP dan NAA terhadap pembentukan senyawa aktif pada organ dan kalus daun Zodia?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui keberhasilan pertumbuhan organ dan kalus pada medium MS setengah kuat dengan penambahan kombinasi zpt BAP dan NAA
2. Mengetahui kombinasi zptBAP dan NAA yang paling baik untuk menghasilkan organ dan kalus
3. Mengetahui pengaruh penambahan zptBAP dan NAA terhadap pembentukan senyawa aktif pada organ dan kalus daun Zodia

D. Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian secara praktis dan teoritis diharapkan dapat diperoleh dari penelitian ini, adalah sebagai berikut :

1. Dapat memberikan informasi tentang keberhasilan pertumbuhan organ dan kalus pada medium MS setengah kuat dengan penambahan kombinasi zptBAP dan NAA
2. Dapat memberikan informasi tentang kombinasi zpt yang paling baik untuk menumbuhkan organ dan kalus
3. Mengetahui pengaruh penambahan zptBAP dan NAA terhadap pembentukan senyawa aktif pada organ dan kalus daun Zodia

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff.)

1. Klasifikasi tanaman

Berdasarkan Depkes RI (2003), adapun klasifikasi secara lengkap tanaman Zodia adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Rutaceae
Marga	: Evodia
Jenis	: <i>Evodia suaveolens</i> , Scheff.



Gambar 1 Tanaman *Evodia suaveolens*, Scheff

2. Nama lain

Masyarakat Jayawijaya dan masyarakat Indonesia umumnya, tanaman ini disebut Zodia. Masyarakat Biak Numfor menyebutnya sirih hutan (Maryuni 2008). Nama latin dari tanaman Zodia adalah *Evodia suaveolens*, Scheff.

3. Etiologi dan penyebarannya

Tumbuhan yang masuk dalam golongan *Evodia* terbagi dalam tiga generasi, yaitu *Tetradium*, *Evodia s.s.* dan *Melicope*. Klasifikasi ini didasarkan pada senyawa-senyawa kimia yang diisolasi dari senyawa yang berbeda pula. Tanaman Zodia sangat mudah diperbanyak, yaitu sudah berbunga dan berbiji, maka bijinya akan jatuh dan tumbuh disekitar tanaman (Kardinan, 2004).

4. Morfologi

Morfologi tanaman Zodia adalah berupa perdu, menahun, tumbuh tegak, tinggi mencapai 200 cm, banyak cabang. Batang bulat, pada permukaan tampak tonjolan bekas menempelnya daun, berwarna coklat. Daun tunggal, bertangkai pendek, letak berhadapan. Helai memanjang sampai lanset, ujung runcing, tepi sampai bertoreh, pangkal runcing, pertulangan menyirip, permukaan licin, halus, berwarna hijau muda. Perbungaan majemuk, keluar dari ujung tangkai dan ketiak daun dengan 4 helai mahkota bunga berbentuk bulat telur, diameter 0,3 cm, berwarna hijau. Berbiji kecil, bulat telur, jumlah 1-2, berwarna hitam. Berakar tunggang, berwarna coklat (Depkes RI 2003).

5. Khasiat dan sifat

Daun tanaman Zodia berkhasiat sebagai obat sakit kepala, demam, nyeri perut, luka, dan sakit gigi (Depkes RI 2003). Masyarakat Papua terbiasa menggosok kulitnya dengan daun Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff.) sebelum masuk ke hutan agar terlindung dari serangan serangga, khususnya nyamuk. Pengujian yang dilakukan terhadap nyamuk demam berdarah (*Aedes aegypti*), yaitu dengan cara menggosokkan daun Zodia ke lengan, lalu lengannya dimasukkan ke kotak yang berisi nyamuk demam berdarah (*Aedes aegypti*) dan dibandingkan dengan lengan yang tanpa digosok dengan daun Zodia, menunjukkan bahwa daun Zodia mampu menghalau nyamuk selama enam jam dengan daya halau (daya proteksi) sebesar lebih dari 70 persen (Kadinan 2004). Minyak atsiri daun Zodia yang diisolasi menggunakan metode destilasi uap

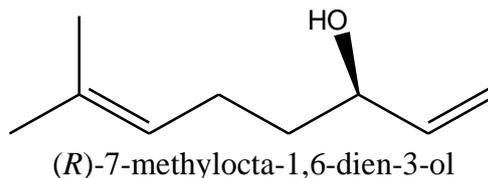
berperan sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Salmonella enteriditis*, dan *Escherchia coli* (Maryuni, 2008).

6. Kandungan bahan aktif

Minyak atsiri daun Zodia diisolasi menggunakan metode destilasi uap dan dianalisis dengan metode GC-MS. Spektra GC-MS menampakkan 26 puncak yang menunjukkan adanya 26 komponen penyusun minyak atsiri. Total presentase komponen penyusun adalah 100% dengan komponen utama adalah evodonedengan kadar 72,32%, diikuti dengan menthofuran sebesar 7,52%, limonene 4,73%, curcumene 4,28%, dan fenenol 1,66%, sedangkan sisanya merupakan komponen-komponen berkadar rendah (Maryuni, 2008). Hasil analisa yang dilakukan Kardinan (2004) di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro) dengan gas kromatografi, minyak yang di suling dari daun tanaman ini terbukti mengandung linalool (46 persen) dan α - pinene (13,26 persen) dimana linalool sudah sangat dikenal sebagai pengusir (repellent) nyamuk (Marlina *et al*, 2009).

6.1 Linalool

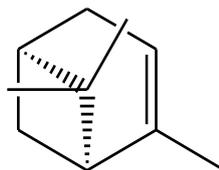
Linalool adalah racun kontak yang meningkatkan aktivitas saraf sensorik pada serangga, lebih besar menyebabkan stimulasi saraf motor yang menyebabkan kejang dan kelumpuhan beberapa serangga , seperti kutu dewasa (Nurdjannah, 2004). Linalool merupakan senyawa alkohol rantai lurus, berbentuk cair, tidak berwarna, beraroma wangi, mempunyai rumus empiris $C_{10}H_{18}O$, dan rumus 7-*dimetil-1,6 octdien-3-ol* dengan titik didih $155^{\circ}C$. Senyawa linalool memiliki nama lain seperti β - *linalool*, *linalyl alkohol*, *linalyl oksida*, *p - linalool*, dan *allo - ocimenol*.



Gambar 2 Struktur kimia Linalool

6.2 α - pinene

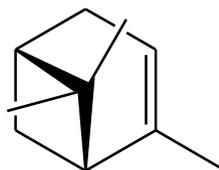
α - pinene merupakan komposisi terbesar yang terdapat dalam minyak atsiri terpenin berkisar 70-95% (Agustina, 2000). α - pinene merupakan senyawa golongan monoterpen yang memiliki ikatan rangkap. Senyawa ini adalah salah satu dari dua isomer dari pinene. Senyawa α - pinene berupa alkena dan berisi cincin empat yang reaktif. Kedua enansiomer dikenal di alam ; (*1S*, *5S*) – atau (-) - α - pinene lebih sering terjadi pada pinus Eropa, sedangkan (*1R*, *5R*) – atau (+) - α - pinene lebih umum di Amerika Utara. α - pinene merupakan senyawa aktif yang bertanggungjawab dalam menghambat aktivitas lokomotor hewan atau manusia dalam mekanisme kerja aromaterapinya (Donahue, 2012).



(*1R,5R*)-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene

(+) α -pinene

(a)



(*1S,5S*)-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene

(-) α -pinene

(b)

Gambar 3 Struktur kimia (+) α -pinene (a) (-) α -pinene (b)

B. Kultur Jaringan Tumbuhan

Kultur jaringan tanaman adalah salah satu pendekatan budidaya pertanian yang sudah berpijak pada konsep ' *how to created* ' yang melengkapi serta memungkinkan pendekatan efektivitas dan produktivitas cara-cara bertanam

tradisional dan konvensional. ' *Culture* ' mengandung arti budidaya sedangkan ' *in vitro* ' mengandung arti di dalam botol, berarti *culture in vitro* merupakan budidaya tanaman di dalam botol (Untung & Fatimah, 2003). Kultur jaringan merupakan salah satu teknik dalam memperbanyak tanaman secara klonal untuk memperbanyak masal. Keuntungan pengadaan bibit melalui kultur jaringan antara lain dapat diperoleh bahan tanaman yang unggul dalam jumlah banyak dan seragam, selain itu dapat diperoleh biakan steril (*motherstock*) sehingga dapat digunakan sebagai bahan untuk memperbanyak selanjutnya (Lestari, 2011).

Setiap sel mempunyai kemampuan untuk tumbuh dan berkembang secara tidak terbatas. Bila sel-sel dipisahkan dan dikulturkan dalam suatu medium yang mendorong pertumbuhan dan perkembangan tanaman, maka sel-sel akan tumbuh secara tidak terbatas dan membentuk individu baru (Nugroho, 2006)

Penerapan kultur jaringan mempunyai beberapa manfaat yaitu memperbanyak klon secara cepat, keragaman genetik, menyediakan bahan tanaman bebas patogen dalam jumlah besar, seleksi tanaman, pemeliharaan tanaman dibawah kondisi lingkungan terkendali, produksi tanaman sepanjang tahun, dan memperbanyak tanaman yang sulit diperbanyak secara vegetatif konvensional (Zukarnain, 2009).

C. Kalus

Kalus merupakan massa sel yang tidak terorganisir yang awalnya merupakan jaringan penutup luka, dimana sel-sel yang pada awalnya dorman terdiferensiasi kembali (dediferensiasi). Dediferensiasi terjadi karena sel-sel tumbuhan (jaringan), yang secara alamiah bersifat autotrof dikondisikan menjadi heterotrof dengan cara memberikan nutrisi yang cukup kompleks di dalam medium kultur, sehingga sel-sel membelah secara tak terkendali membentuk massa sel yang tidak terorganisir (kalus) (Rusdianto, 2012). Karakteristik kalus sendiri tergantung pada komposisi media pengkulturannya, khususnya zat pengatur tumbuh, dan jenis eksplan. Kalus dengan tekstur kompak akan menghasilkan

metabolit sekunder yang lebih banyak dibandingkan kalus dengan tekstur meremah. Metabolit sekunder yang dihasilkan dari kultur kalus biasanya lebih banyak jenisnya, karena seringkali timbul zat-zat alkaloid atau senyawa-senyawa lain yang sangat berguna untuk pengobatan (Hendaryono & Wijayani, 1994).

D. Media

Media merupakan faktor penentu dalam perbanyakan dengan kultur jaringan. Komposisi media yang digunakan tergantung dengan jenis tanaman yang akan diperbanyak. Media yang baik seharusnya menyediakan unsur hara baik makro maupun mikro, sumber vitamin dan asam amino, sumber karbohidrat, zat pengatur tumbuh, senyawa organik sebagai tambahan seperti air kelapa, ekstrak buah dan lain-lain, bahan pematat seperti agar-agar dan gelrite dan juga menyediakan arang aktif untuk kasus tertentu untuk tanaman (Ritonga, 2007). Wiryoedjoyo dan Supriyadi (2014) melakukan penelitian penanaman eksplan daun *Zodia (Evodia suaveolens Scheff.)* pada medium kultur jaringan *Murashige Skoog (MS)*, *Murashige Skoog* setengah kuat (MS setengah kuat) dan medium *New Phalaenopsis (NP)* serta penambahan zat pengatur tumbuh yaitu *Benzilaminopurin (BAP)*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus yang paling baik yaitu pada medium MS setengah kuat. Media MS setengah kuat berarti konsentrasi persenyawaan yang digunakan sebagai setengah konsentrasi media MS. Keunggulan medium MS setengah kuat tampaknya adalah mengandung nutrisi tanaman yang lengkap dalam jumlah cukup, tetapi tidak berlebihan, sehingga dapat memenuhi kebutuhan eksplan untuk tumbuh (Wiryoedjoyo dan Supriyadi, 2014).

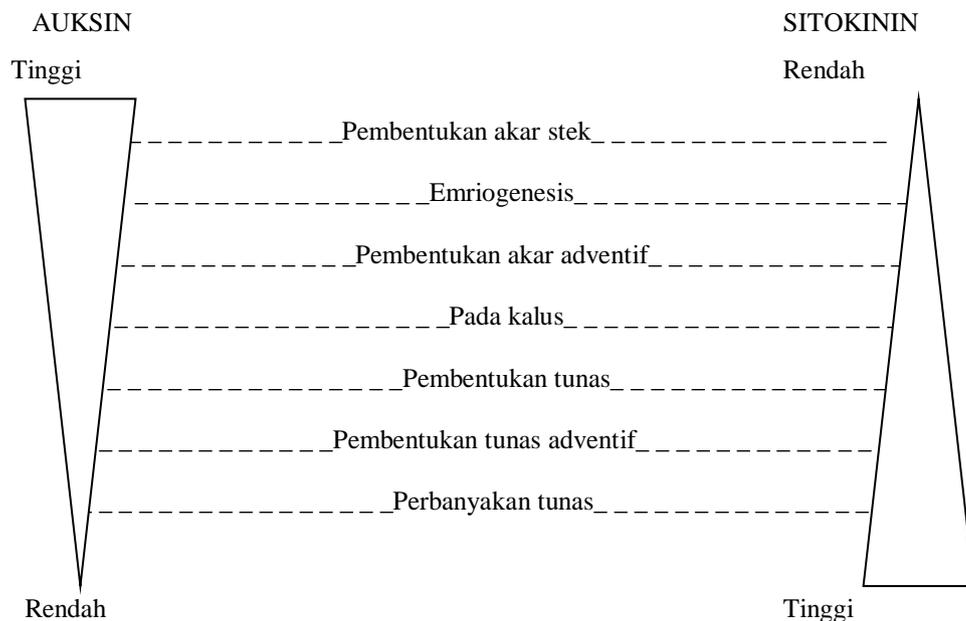
pH merupakan simbol dari derajat keasaman atau kebebasan dari larutan yang ditunjukkan dengan konsentrasi ion hidrogen. pH tertentu diperlukan untuk pertumbuhan jaringan tanaman agar tidak mengganggu fungsi membran sel dan sitoplasma. pH yang diperlukan pada medium kultur biasanya berkisar 5,7-5,8.

Penggunaan pH medium dilakukan untuk menaikkan pH medium (menjadi lebih alkalis) dan *hydrochloric acid* (1M HCl) untuk menurunkan menjadi lebih asam). pH medium harus dipertahankan konstan selama kultur berlangsung karena akan mempengaruhi ketersediaan nutrisi yang dapat diserap oleh sel dan jaringan tanaman untuk pertumbuhannya (Nursetiadi, 2008)

E. Zat Pengatur Tumbuh

Fitohormon adalah senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tanaman tingkat tinggi secara endogen. Senyawa tersebut berperan merangsang dan meningkatkan pertumbuhan serta perkembangan sel, jaringan, dan organ tanaman menuju arah diferensiasi tertentu. Senyawa-senyawa lain yang mewakili karakteristik yang sama dengan hormon tetapi diproduksi secara eksogen, dikenal sebagai zat pengatur tumbuh. Macam-macam zat pengatur tumbuh yaitu auksin, sitokinin, giberelin, asam absisat, dan etilen (Zulkarnain, 2009). Kombinasi media dasar dan zat pengatur tumbuh yang tepat akan meningkatkan aktivitas pembelahan sel dalam proses morfogenesis dan organogenesis. Zat pengatur tumbuh terdiri dari golongan sitokinin dan auksin. Auksin mempunyai peran ganda tergantung pada struktur kimia, konsentrasi, dan jaringan tanaman yang diberi perlakuan. Pada umumnya auksin digunakan untuk menginduksi pembentuk kalus, kultur suspensi, dan akar, yaitu dengan memacu pemanjangan dan pembelahan sel di dalam jaringan kambium (Pierik, 1987 *diacu dalam* Lestari, 2011). Auksin diperlukan dalam konsentrasi yang relatif tinggi untuk memacu pembentukan kalus embriogenik dan struktur embrio somatik. *Napthalene Acetic Acid* (NAA, golongan auksin) adalah senyawa kimia yang memiliki fungsi utama mendorong pemanjangan kuncup yang sedang berkembang. NAA tidak mudah terurai oleh enzim yang dikeluarkan oleh sel dan tahan terhadap pemanasan pada proses sterilisasi (Intan, 2008 *diacu dalam* Teguh, 2015). Sedangkan fungsi dari *Benzilaminopurine* (BAP, golongan sitokinin) adalah mendukung pembentukan kalus (Rahayu *et al*, 2002 *diacu dalam* Ariati, 2012). Penanaman eksplan daun

Zodia pada medium MS setengah kuat dengan penambahan BAP tidak berpengaruh terhadap tingginya kadar linalool dan α -pinene dikarenakan pertumbuhan kalus sangat lambat sehingga kadar yang diperoleh hanya sedikit (Wiryosoedjoyo dan Supriyadi, 2014). Kalus akan tumbuh baik pada komposisi zat pengatur tumbuh yang baik.



Sumber: George & Sherrington, 1984

Gambar 4 Pengaruh perimbangan auksin dan sitokinin terhadap arah pertumbuhan jaringan tanaman pada kultur jaringan

Pada gambar di atas dapat dilihat bahwa adalah kombinasi yang paling baik antara zpt sitokinin (BAP) dan auksin (NAA) dapat menghasilkan pertumbuhan kalus yang optimal. Penambahan NAA sebagai zpt auksin dapat memberikan pertumbuhan organ akar, sedangkan penambahan BAP yang tinggi akan memberikan pertumbuhan organ tunas. Penambahan zat pengatur tumbuh sitokinin (BAP) tanpa penambahan auksin (NAA) akan menghambat pertumbuhan kalus, sedangkan penambahan zat pengatur tumbuh sitokinin (BAP) yang terlalu banyak akan menghambat pertumbuhan organ akar. Penelitian ini menambahkan zat pengatur tumbuh NAA sebagai zat pengatur tumbuh auksin

yang dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh BAP pada medium MS setengah kuat, dengan tujuan agar pembentukan kalus cepat sehingga kadar senyawa aktif linalool dan α -pinene akan tinggi.

F. Sterilisasi

Sterilisasi alat. Sterilisasi dengan panas kering atau udara panas dianjurkan apabila penggunaan uap bertekanan tidak dikehendaki atau bila tidak dapat terjadi kontak antara uap bertekanan dengan benda yang akan disterilkan. Sterilisasi ini berlaku untuk perabotan laboratorium seperti cawan petri, pipet, juga minyak, serbuk, serta beberapa peralatan. Sterilisasi dilakukan di dalam *oven*. Untuk mensterilkan perabotan logam dan perabotan pecah belah dibutuhkan suhu 160°C selama 2 jam (Pelczar & Chan, 1988).

Sterilisasi media tanam. Sterilisasi media yang mengandung bahan kimia tidak mudah rusak dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C dengan tekanan antara 15 – 17,5 psi dengan waktu antara 20 – 25 menit (Suryowinoto, 1988). Autoklaf merupakan ruang uap berdinding rangkap yang diisi dengan uap jenuh bebas udara dan dipertahankan pada suhu serta tekanan yang ditentukan selama periode waktu yang dikehendaki. Mutlak perlu diusahakan agar seluruh udara di dalam ruang autoklaf tergantikan dengan uap jenuh (Pelczar & Chan, 1988).

Sterilisasi bahan tanaman. Bahan tanaman dari lapangan banyak mengandung debu, kotoran-kotoran dan berbagai kontaminan lainnya. Apabila kontaminan tidak dihilangkan maka dalam media akan segera ditumbuhi bakteri maupun cendawan, sehingga eksplan akan mati. Bahan yang digunakan untuk sterilisasi eksplan bermacam-macam bergantung pada jenis tanamannya, bahan yang akan digunakan, lingkungan tempat tumbuh, musim, umur tanaman, dan kondisi tanaman. Bahan yang telah disterilkan dengan menggunakan bahan kimia tertentu, harus dicuci dengan menggunakan aquadest steril dengan tujuan menghilangkan pengaruh negative dari desinfektan, sehingga sel dapat tumbuh

dan berkembang (Suryowinoto, 1988). Menurut Hendaryono & Wijayani (1994), sterilisasi bahan tanaman atau eksplan dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu secara mekanik dan secara kimia. Sterilisasi secara mekanik digunakan untuk eksplan yang keras, yaitu dengan membakar eksplan tersebut di atas lampu spiritus sebanyak tiga kali. Sterilisasi secara kimia digunakan untuk eksplan yang lunak, yaitu dengan mencuci eksplan menggunakan desinfektan.

Sterilisasi *entkas*. *Entkas* merupakan tempat yang digunakan untuk menanam eksplan ke dalam media. Bahan yang digunakan untuk sterilisasi dapat berupa lampu UV (*ultra violet*), alkohol 70%, maupun formalin (Suryowinoto, 1988).

G. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau sebagian pelarut diuapkan dan sisa endapan atau serbuk diatur untuk ditetapkan standarnya (Ansel, 1981). Ekstraksi yaitu penarikan zat yang diinginkan dari bahan obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan terlarut. Bahan mentah obat berasal dari tumbuh-tumbuhan atau hewan, perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan dan di keringkan karena tiap bahan mentah obat berisi sejumlah unsur yang dapat larut dalam pelarut tertentu. Zat aktif dari tanaman obat secara umum sama tipe sifat kimianya mempunyai sifat kelarutan yang sama pula dan dapat diekstraksi dengan pelarut tunggal atau campuran. Proses ekstraksi mengumpulkan zat aktif dari bahan mentah obat dan mengeluarkannya dari bahan-bahan sampingan yang tidak diperlukan (Ansel, 1989).

Pelarut merupakan suatu zat yang digunakan untuk melarutkan suatu zat lain atau suatu obat dalam preparat larutan. Pemilihan pelarut, didasarkan pada pencapaian ekstrak yang sempurna tetapi juga ekonomis untuk mendapatkan zat

aktif dari bahan obat tumbuhan sambil menjaga agar zat yang tidak aktif terekstraksi seminim mungkin (Ansel, 1989).

H. Kromatografi Gas

Kromatografi gas adalah suatu proses dengan mana suatu campuran menjadi komponen-komponennya oleh fase gas yang bergerak melewati suatu lapisan serapan (sorben) yang stationer. Gas pengemban yang digunakan adalah helium, nitrogen, hidrogen, atau argon; pemilihan gas bergantung pada faktor seperti ketersediaan, kemurnian yang dituntut, konsumsi dan tipe detektor yang digunakan (Bassett *et al*, 1994). Pemilihan fase diam bergantung pada kepolaran cuplikan (Hendayana, 2006). Sistem kromatografi gas memerlukan sistem tertutup sempurna kecuali pada tempat keluarnya gas. Gas pembawa dari tangki bertekanan, mengalir melalui pengatur tekanan yang mengatur kecepatan alir gas. Cuplikan dimasukkan ke dalam suatu kamar pemanas melalui kolom dimana mereka dipisahkan dan kemudian melalui detektor yang mengirim isyarat ke pencatat (Sudjadi, 1988). Analisis kualitatif gas kromatografi dapat dilakukan dengan cara spektrometri atau membandingkan waktu retensi analit dengan waktu retensi standar yang diukur pada kondisi sama. Analisis kuantitatif dilakukan melalui pendekatan tinggi peak atau area peak (Hendayana, 2006).

I. Landasan Teori

Tanaman Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff.) merupakan salah satu tanaman yang dapat digunakan untuk mengusir nyamuk. Tanaman ini berasal dari Papua (Lestari, 2005 *diacu dalam* Muhamat & Hidayaturrahmah, 2014). Hasil analisis yang dilakukan oleh Kardinan (2004) di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), minyak yang disuling dari daun tanaman ini terbukti mengandung linalool (46 persen) dan α - pinene (13,26 persen) dimana linalool sudah sangat dikenal sebagai pengusir (repellent) nyamuk (Marlina *et al*, 2009). Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff.)

mampu menghalau nyamuk selama enam jam dengan daya halau (daya proteksi) sebesar lebih dari 70%.

Kultur jaringan merupakan suatu usaha untuk memperbanyak atau budidaya generatif sehingga dapat dihasilkan tumbuhan baru dari bibit yang diinginkan dalam waktu tertentu. Penambahan zat pengatur tumbuh akan mempercepat pertumbuhan eksplan. Penelitian ini menggunakan eksplan daun Zodia yang masih muda, segar, dan sehat, yang berasal dari daun yang tumbuh di ujung dan nodus pertama dan ke dua dari ujung batang. Media merupakan faktor penentu dalam memperbanyak dengan kultur jaringan. Komposisi media yang digunakan tergantung dengan jenis tanaman yang akan diperbanyak (Ritonga, 2007). Penelitian yang dilakukan oleh Wiryosoedjono dan Supriyadi (2014) menunjukkan bahwa kalus dapat tumbuh baik pada media MS setengah kuat, sedangkan penambahan zat pengatur tumbuh golongan sitokinin yaitu BAP tidak berpengaruh terhadap kadar senyawa aktif linalool dan α -pinene. Penambahan NAA sebagai zpt golongan auksin sangatlah penting bagi pembentukan kalus. George dan Sherrington (1984) mengungkapkan bahwa penambahan zat pengatur tumbuh sitokinin (BAP) tanpa penambahan auksin (NAA) akan menghambat pertumbuhan kalus, sedangkan penambahan zat pengatur tumbuh sitokinin (BAP) yang terlalu banyak akan menghambat pertumbuhan organ akar. Kombinasi yang paling baik antara zat pengatur tumbuh sitokinin (BAP) dan auksin (NAA) akan menghasilkan pertumbuhan kalus yang paling baik. Penelitian ini membuat berbagai variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh untuk mendapatkan organ dan kalus dengan pertumbuhan terbaik.

Kalus yang sudah tumbuh diambil, ditimbang, lalu diekstraksi menggunakan pelarut *n*-heksana dan dianalisis menggunakan kromatografi gas. Ekstraksi yaitu penarikan zat yang diinginkan dari bahan obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan terlarut. Pelarut merupakan suatu zat yang digunakan untuk melarutkan suatu zat lain atau suatu obat dalam preparat larutan (Ansel, 1989). Pelarut yang sesuai untuk melarutkan

minyak adalah butanol, n-heksana, etyl asetat, CCl_4 , dan kloroform (Alfian & Susanti, 2012).

Kromatografi gas adalah suatu proses dengan mana suatu campuran menjadi komponen-komponennya oleh fase gas yang bergerak melewati suatu lapisan serapan (sorben) yang stationer (Bassett *et al*, 1994). Pemilihan fase diam bergantung pada kepolaran cuplikan sedangkan pemilihan fase gerak bergantung pada jenis detektor yang digunakan (Hendayana, 2006).

Pertumbuhan organ dan kalus diharapkan dapat optimal dengan adanya penambahan zat pengatur tumbuh BAP dan NAA yang paling baik, sehingga dengan adanya pertumbuhan yang optimal diharapkan pembentukan senyawa aktif linalool dan α -pinene juga dapat optimal.

J. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori, dapat disusun suatu hipotesis dalam penelitian ini bahwa :

Pertama, organ dan kalus daun Zodia dapat tumbuh baik dalam media MS setengah kuat dengan penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan NAA

Kedua, Kombinasi zat pengatur tumbuh BAP dan NAA dengan konsentrasi tertentu menghasilkan organ dan kalus yang terbaik.

Ketiga, penambahan zat pengatur tumbuh BAP dan NAA berpengaruh terhadap pembentukan senyawa aktif pada organ dan kalus daun Zodia

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff.) yang berasal dari Pakem, Yogyakarta.

Eksplan yang digunakan adalah daun Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff.) yang sehat serta bebas hama dan penyakit. Eksplan berasal dari daun yang tumbuh di ujung pertama dan ke dua dari ujung batang.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama adalah media tumbuh dan zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk membentuk kalus dari eksplan daun Zodia (*Evodia suaveolens* Scheff.) yaitu MS setengah kuat sebagai media serta BAP dan NAA sebagai zat pengatur tumbuh.

Variabel utama kedua adalah pembentukan kalus dan pembentukan organ sertapembentukan senyawa aktif linalool dan α -pinene dalam kalus daun Zodia.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terdahulu dapat diidentifikasi ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud di dalam penelitian ini adalah vairabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung, sedangkan perngertian variabel tergantung di dalam penelitian ini adalah variabel yang hasilnya tergantung pada variabel bebas. Variabel kendali dalam penelitin ini adalah variabel yang harus dikendalikan karena mempengaruhi juga pada hasil variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi zat pengatur tumbuh BAP dan NAA.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah media tanam, gula, teknik kultur jaringan, jenis eksplan yang digunakan, umur eksplan, dan pH media.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pembentukan organ, pembentukan kalus, serta pembentukan senyawa aktif linalool dan α -pinene dalam kalus dan organ yang terbentuk.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun Zodia adalah daun dari tanaman Zodia muda yang terletak pada daun pertama atau kedua dari ujung tanaman yang diambil dari daerah Pakem, Yogyakarta.

Kedua, media tumbuh adalah media yang digunakan untuk media pertumbuhan kalus yaitu media MS setengah kuat. Media MS setengah kuat adalah media konsentrasi persenyawaan yang digunakan sebagai setengah konsentrasi media MS.

Ketiga, zat pengatur tumbuh adalah zat organik bukan nutrisi yang dalam konsentrasi kecil digunakan untuk membantu hormon endogen untuk mempengaruhi pertumbuhan organ dan kalus, yaitu zat pengatur tumbuh BAP dan NAA.

Keempat, BAP adalah zat pengatur tumbuh eksogen golongan sitokinin yang dapat menumbuhkan organ tunas dan kalus, yang ditambahkan dalam konsentrasi kecil.

Kelima, NAA adalah zat pengatur tumbuh eksogen golongan auksin yang dapat menumbuhkan organ akar dan kalus, yang ditambahkan dalam konsentrasi kecil.

Keenam, eksplan daun Zodia adalah bagian daun yang diambil dari posisi pertama dan kedua dari ujung tanaman daun Zodia.

Ketujuh, kalus adalah jaringan-jaringan yang muncul dari eksplan daun berwarna putih atau hijau muda.

Kedelapan, pertumbuhan kalus adalah kalus yang tumbuh dari eksplan yang telah diinduksi dengan waktu tertentu yang telah ditentukan, mulai dari awal kalus muncul sampai kalus dipanen.

Kesembilan, pertumbuhan organ adalah organ yang tumbuh dari eksplan yang telah diinduksi dengan waktu tertentu yang telah ditentukan, mulai dari awal organ muncul sampai organ dipanen.

Kesepuluh, senyawa aktif linalool dan α -pinene adalah beberapa komponen minyak atsiri yang terdapat pada daun Zodia yang diambil dengan cara mengekstraksi kalus dengan pelarut *n*-heksana.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Daun segar diperoleh dari tanaman Zodia yang berasal dari Pakem, Yogyakarta. Bahan untuk kultur jaringan tanaman yang digunakan antara lain medium MS setengah kuat, zat pengatur tumbuh *Naphtalena Acetic Acid* (NAA) dan *Benzilaminopurin* (BAP), metanol, alkohol pekat, alkohol 96 %, alkohol 70%, larutan NaOCl 2,5%, detergen, aquadest, tablet formalin. Bahan penyari yang digunakan adalah *n* – heksana.

2. Alat

2.1. Kultur eksplan, sterilisasi alat dan media. Kultur eksplan, sterilisasi alat dan media yaitu *entkas*, autoklaf, skalpel disposable, punser, alat gelas (batang pengaduk, cawan petri, gelas ukur, beaker glass, botol aquadest, botol kultur), gunting, kertas aluminium foil, label, rak-rak botol dan timbangan analitik.

2.2. Pelumatan (daun, kalus, dan penyarian) dan deteksi kandungan. Pelumatan daun dan kalus dan penyarian yang digunakan yaitu mortir dan stamfer, sendok tanduk, beaker glass, kertas saring, corong kaca, dan botol gelap tempat hasil ekstraksi, dan kromatografi gas.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel *Zodia* (*Euodia saoveolens* Scheff.) yaitu dengan cara mencocokkan dengan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman *Zodia* (*Euodia saoveolens* Scheff.) terhadap pustaka yang dibuktikan di laboratorium morfologi dan sistematika tumbuhan di Universitas Setia Budi, Surakarta.

2. Penyiapan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun dari tanaman *Zodia* (*Euodia saoveolens* Scheff). Daun *Zodia* diambil secara keseluruhan di daerah Pakem, Yogyakarta. Eksplan berasal dari daun sehat dan bebas dari hama penyakit, yang tumbuh di ujung kedua dan ketiga dari ujung batang.

3. Pembuatan media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah MS setengah kuat. Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat media MS setengah kuat meliputi makronutrien, mikronutrien, sumber besi, vitamin, glukosa, hormon BAP dan NAA diambil dari larutan stok.

3.1 Larutan makronutrien. Bahan dipilih dan ditimbang berdasarkan tabel yang telah disediakan. Semua bahan dilarutkan dalam 200 ml aquadest pada beaker glass kemudian diaduk sampai semua bahan larut. Sebanyak 10 ml larutan stok makronutrien dibutuhkan untuk membuat 1 L larutan dalam media MS.

Tabel 1 Komposisi unsur hara makro medium MS

Unsur hara makro	MS (mG/L)	MS setengah kuat (mG/L)
KNO ₃	1900	950
NH ₄ NO ₃	1650	825
CaCl. 2H ₂ O	440	220
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	85

Sumber: George & Sherrington (1984)

3.2 Larutan mikronutrien. Bahan dipilih dan ditimbang berdasarkan tabel yang telah disediakan. Semua bahan dilarutkan dalam 500 ml aquadest pada beaker glass kemudian diaduk sampai semua bahan larut. Sebanyak 5 ml larutan stok mikronutrien dibutuhkan untuk membuat 1 L larutan dalam media MS.

Tabel 2 Komposisi unsur hara mikro medium MS

Unsur hara mikro	MS (mg/L)	MS setengah kuat (mg/L)
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3	11,15
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6	4,3
H ₃ BO ₃	6,2	3,1
KI	0,83	0,415
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025	0,0125
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,25	0,125
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025	0,0125
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8	13,9
NaEDTA. 2H ₂ O	37,3	18,65

Sumber: George & Sherrington (1984)

3.3 Vitamin. Bahan dipilih dan ditimbang berdasarkan tabel yang telah disediakan. Semua bahan dilarutkan dalam 200 ml aquadest pada beaker glass kemudian diaduk sampai semua bahan terlarut. Sebanyak 4 ml larutan stok dibutuhkan untuk membuat 1 L medium MS.

Tabel 3 Komposisi vitamin medium MS (mg/L)

Vitamin	Myo- inositol	Thiamin- HCl	Nicotinic Acid	Piridoksin HCl	Glisin
MS	100	0,1	0,5	0,5	2
MS setengah kuat	50	0,05	0,25	0,25	1

Sumber: George & Sherrington, 1984

Sukrosa	Agar-agar
30 gram	8 gram

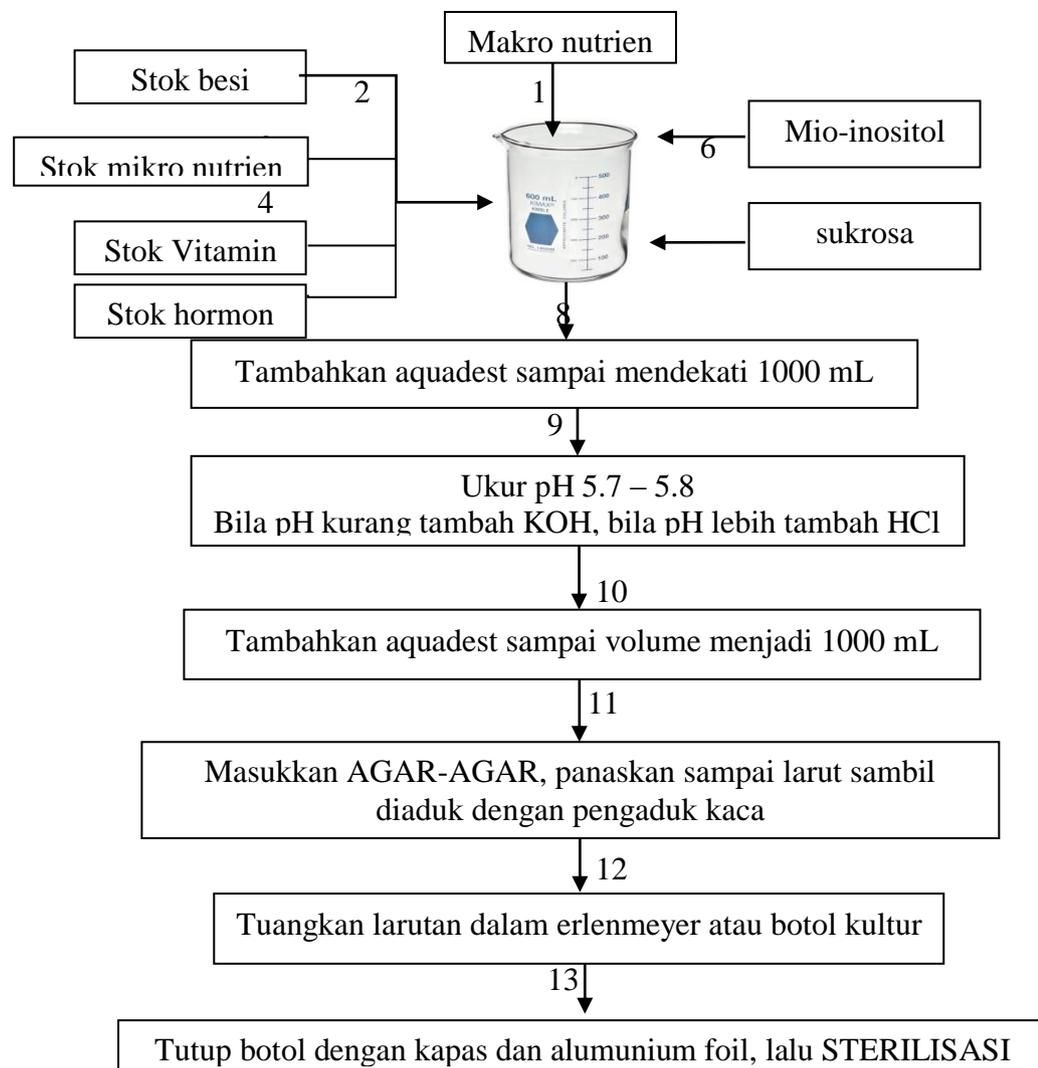
Sumber: George & Sherrington, 1984

3.4 Zat Pengatur Tumbuh. Konsentrasi BAP dan NAA yang digunakan yaitu masing-masing 0 ppm; 0,5 ppm; 1 ppm; 1,5 ppm; dan 2 ppm. Variasi yang digunakan adalah sebagai berikut :

Tabel 4 Variasi konsentrasi zpt BAP/NAA (mG/L)

BAP (mG/L)	0	0,5	1	1,5	2
NAA (mG/L)	2	1,5	1	0,5	0

3.5 Pembuatan media MS setengah kuat dan penambahan ZPT BAP dan NAA



Gambar 5 Skema pembuatan medium MS dan MS setengah kuat volume 1 liter

4. Sterilisasi Alat, *Entkas*, dan Eksplan

4.1 Sterilisasi alat dan *entkas*. Peralatan meliputi botol, *scalpel*, *petridisc* dan gunting dicuci, dibilas dengan air mengalir, dan dikeringkan. Semua alat tersebut disterilisasi dengan *oven* pada suhu 160 °C selama 2 jam. Selanjutnya sterilisasi *entkas* dengan menggunakan formalin dan disemprot dengan alkohol 70% terlebih dahulu.

4.2 Sterilisasi eksplan. Daun Zodia dicuci dengan detergen untuk menghilangkan kotoran dan debu yang menempel. Daun Zodia dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu dituangkan larutan NaOCl 5% ke dalam erlenmeyer steril berisi eksplan sambil digojog perlahan selama 10-15 menit. Bila eksplan mengalami perubahan warna (warna menjadi hilang atau berubah menjadi warna coklat) maka sterilisasi dihentikan. Larutan NaOCl 5% yang telah dipakai dituang ke dalam botol kosong yang telah disiapkan. Eksplan dibilas dengan aquadest steril. Dituangkan larutan NaOCl 2,5% ke dalam erlenmeyer yang berisi eksplan sambil digojog perlahan 10-15 menit. Eksplan dibilas menggunakan aquadest steril. Dituangkan alkohol 70% sambil digojog perlahan 1-2 menit. Eksplan dicuci dengan aquadest steril sebanyak 3x, lalu eksplan ditiriskan.

5. Penanaman Eksplan dan Subkultur Kalus

5.1 Penanaman eksplan. Penanaman eksplan dilakukan dalam *entkas* dengankondisi aseptik. Eksplan yang telah disiapkan untuk ditanam dipotong-potongdengan menggunakan *scalpel* di dalam cawan petri dengan ukuranpanjang ± 1 cm. Potongan eksplan dimasukkan ke dalam botol media MS setengah kuat yang berisi zat pengatur tumbuh dengan berbagai variasi konsentrasi BAP dan NAA yang sesuai dengan rancangan percobaan.Botol media kemudian ditutup kembali, botol-botol tersebut diletakkan dalam rakkultur yang diterangi lampu *day light* dan diinkubasi pada suhu $\pm 20^{\circ}\text{C}$.

5.2 Subkultur kalus. Kalus yang sudah tumbuh perlu dilakukan subkultur untuk mencegah kalus kehabisan cadangan makanan dan juga untuk memperbanyak kalus yang akan dihasilkan. Perbanyak dengan cara dipotong

dan dipindah pada medium dengan jenis dan kadar zpt yang sama. Proses subkultur dilakukan secara aseptis di dalam ruang *entkas*, kemudian diinkubasi kembali.

6. Pengamatan

Pengamatan pertumbuhan eksplan dilakukan tiap 7 hari, tolok ukur pertumbuhan adalah terbentuknya kalus atau akar.

6.1 Pertumbuhan Kalus. Pertumbuhan ditandai dengan munculnya jaringan berwarna kehijauan pada permukaan eksplan.

6.2 Pertumbuhan Akar. Pertumbuhan akar diamati dengan adanya tonjolan berwarna putih pada bagian bawah eksplan.

6.3 Berat Segar Total. Berat segar total dinyatakan dalam satuan gram (g). Pengukuran berat segar total dilakukan pada akhir pengamatan.

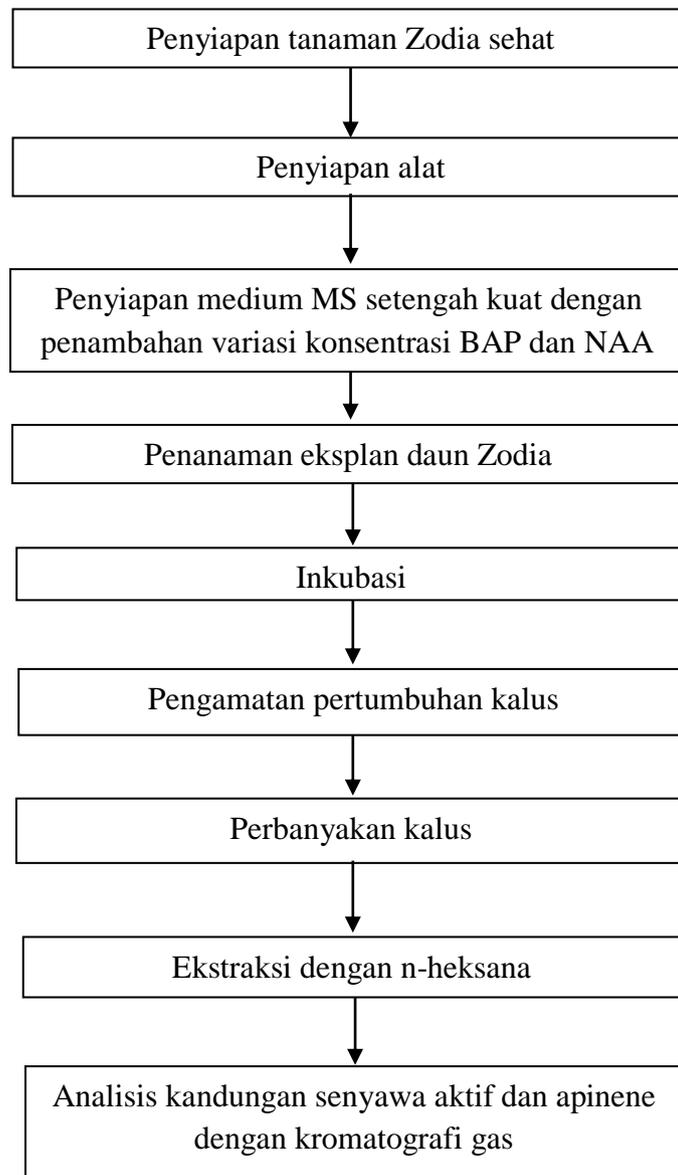
6.4 Prosentase keberhasilan. Penentuan prosentase keberhasilan dilakukan dengan menghitung jumlah eksplan yang berhasil tumbuh membentuk kalus dibagi dengan jumlah seluruh eksplan yang ditanam dikalikan 100%.

7. Ekstraksi

Daun Zodia yang tidak diberi perlakuan serta kalus daun Zodia, masing-masing ditimbang, kemudian dihaluskan dan disari dengan pelarut n-heksana sebanyak 3 ml lalu disaring menggunakan kertas saring kemudian dibilas lalu dimasukkan ke dalam labu takar, ditambah pelarut sampai 5 mL.

8. Analisis kualitatif

Analisis kualitatif dilakukan dengan menginjeksikan filtrat ekstrak daun Zodia kalus pada kolom kromatografi gas dan mendeteksi senyawa yang terdapat dalam kalus daun Zodia. Komponen yang terpisah menuju detektor dan menghasilkan sinyal listrik yang besarnya proporsional dengan komponen tersebut. Sinyal tersebut lalu diperkuat oleh *amplifier* dan selanjutnya oleh pencatat (*recorder*) dituliskan sebagai kromatogram berupa puncak (*peak*). Dari puncak ini bisa diketahui senyawa yang terkandung dalam kalus daun Zodia (Yazid, 2005).



Gambar 6 Skema jalannya penelitian

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Determinasi dan Deskripsi Tanaman

1. Hasil Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan kebenaran bahwa tanaman yang digunakan untuk penelitian adalah *Euodia suaveolens* Scheff. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta menggunakan buku acuan Backer C.A. & Brink R.C.B (1965). Hasil determinasi diperoleh :

1b – 2b – 3b – 4b – 12b – 13b – 14b – 17b – 18b – 19b – 20b – 21b – 22b – 23b – 24b – 25b – 26b – 27a – 28b – 29b – 30b – 31a – 32a – 33a – 34a – 35a – 36d – 37b - 38b – 39b – 41b – 42b – 44b – 45b – 46e – 50b – 51b – 53b – 54b – 56b – 57b – 58b – 59d – 72b – 73b – 74a – 137a – 138c – 139b – 140c – 185a. familia 133. Rutaceae. 1b -2b – 5a – 6a. 2. Euodia. 1a – 2a – 3a – 4b – 6a – 7b. ***Euodia suaveolens* Scheff.**

Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang diperoleh benar-benar tanaman Zodia yang akan digunakan untuk penelitian.

2. Hasil Deskripsi Tanaman

Zodia memiliki habitus perdu menahun, tumbuh tegak, tinggi dapat mencapai 2 meter. Batang dari tanaman Zodia berbentuk bulat, berwarna coklat, pada permukaan tampak tonjolan bekas menempelnya daun. Daun dari tanaman Zodia adalah tunggal, berhadapan, bentuk memanjang sampai lanset, ujung runcing, pangkal runcing, panjang 7 – 12 cm, lebar 0,5 – 1 cm, tulang daun menyirip, permukaan licin, berwarna hijau muda kekuningan, dan memiliki bau “wangi” spesifik. Bunga dari tanaman Zodia merupakan majemuk malai, muncul di ujung bayang dan ketiak daun, terdiri dari sepala 4, petala 4, mula – mula berwarna putih kekuningan, kemudian berubah menjadi berwarna hijau, dan terdiri dari benangsari 4. Buah dari tanaman Zodia berbentuk bulat telur, waktu

muda hijau, setelah masak berwarna coklat, biji kecil, umumnya tiap buah terdapat 1 biji. Akar dari tanaman Zodia merupakan akar tunggang berwarna coklat.

B. Bahan Tanaman yang Diperoleh

Daun Zodia telah diambil secara keseluruhan di daerah Pakem, Yogyakarta. Eksplan berasal dari daun sehat dan bebas dari hama penyakit, yang tumbuh di ujung pertama dan ke dua dari ujung batang. Daun yang diambil yang masih muda dan segar, agar diperoleh hasil tanaman kultur dengan baik dan optimal. Pierik (1997) menyatakan bahwa jaringan-jaringan yang muda dan lunak pada umumnya lebih mudah berproliferasi daripada jaringan berkayu atau yang sudah tua, karena jaringan-jaringan muda terdapat jaringan meristem yang masih aktif membelah (Zulkarnain, 2009). Jaringan muda biasanya memiliki kapasitas regeneratif yang tinggi, sehingga digunakan sebagai bahan penelitian ini.

C. Hasil Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS setengah kuat (*Murashige Skoog*). *Murashige Skoog* adalah media yang umum dan sering digunakan untuk kultur jaringan karena dapat digunakan untuk berbagai jenis tanaman dan konsentrasi garam-garam mineral di dalam medium ini. Media MS setengah kuat adalah konsentrasi persenyawaan yang digunakan sebagai setengah konsentrasi media MS. Media yang diperoleh adalah media yang padat. Konsentrasi media MS setengah kuat memiliki konsentrasi yang rendah.

Keberhasilan menumbuhkan kalus juga dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi yang cocok sehingga dapat memenuhi kebutuhan untuk pertumbuhan sel tanaman yang dikultur (Hendaryono dan Wijayani 1994).

Zat pengatur tumbuh (zpt) adalah senyawa organik bukan nutrisi yang dalam konsentrasi rendah mampu mendorong, menghambat, atau secara kualitatif mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Keberadaan hormon dan zat

pengatur tumbuh dalam kegiatan kultur jaringan adalah mutlak, karena kegiatan kultur jaringan umumnya menggunakan bahan tanam yang tidak lazim (sel, jaringan, organ) dan budidayanya adalah budidaya terkendali. (Untung & Fatimah, 2004). Penggunaan zat pengatur tumbuh di dalam kultur jaringan tergantung pada arah pertumbuhan jaringan tanaman yang diinginkan. Sitokinin digunakan untuk pembentukan tunas, sedangkan untuk pembentukan akar atau pembentukan kalus digunakan auksin. Winata (1987) mengungkapkan bahwa dalam proses pembentukan organ seperti tunas atau akar ada interaksi antara zat pengatur tumbuh eksogen yang ditambahkan ke dalam media dengan zat pengatur tumbuh endogen yang diproduksi oleh jaringan tanaman. Penambahan auksin atau sitokinin ke dalam media kultur dapat meningkatkan konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen di dalam sel, sehingga menjadi “faktor pemicu” dalam proses tumbuh dan perkembangan jaringan. Pembentukan tunas dapat dilakukan dengan memanipulasi dosis auksin dan sitokinin eksogen (Poonsapaya *et al.*, 1989 dalam Lestari, 2011).

Tabel 5 Pembuatan media MS setengah kuat dengan penambahan hormon BAP dan NAA

Konsentrasi BAP dalam media MS (mG/L)	0	0,5	1	1,5	2
Konsentrasi NAA dalam media MS (mG/L)	2	1,5	1	0,5	0
Volume total media MS (mL)	100	100	100	100	100
Volume media MS tiap botol (mL)	±10	±10	±10	±10	±10
Jumlah botol	10	10	10	10	10

Konsentrasi ZPT BAP atau NAA dibuat dengan cara menimbang 10 mg BAP atau NAA ditambahkan KOH 10% digojog hingga tepat larut. Aquadestilata ditambahkan sampai 100 ml sehingga dalam 1 ml mengandung 0,1 mG/L ZPT BAP atau NAA. Konsentrasi 1 mG/L didapatkan dengan cara memipet 1 ml

larutan tersebut, lalu ditambahkan pada media yang sudah dibuat. Konsentrasi yang lain dilakukan dengan cara yang sama yaitu untuk konsentrasi 0 mG/L dipipet 0 ml, konsentrasi 0,5 mG/L dipipet 0,5 ml, konsentrasi 1,5 mG/L dipipet 1,5 ml, dan konsentrasi 2 mG/L dipipet 2 ml. pH larutan harus berkisar antara 5,7-5,8 dikarenakan pH menentukan kelarutan ketersediaan ion-ion, mineral, dan juga sifat gel (George & Sherrington, 1984). Media jika pH terlalu asam atau basa maka beberapa garam dalam media akan mengendap sehingga nutrisi yang dibutuhkan eksplan tidak terpenuhi dan pertumbuhan tidak optimal. Media yang diperoleh dalam penelitian ini berbentuk setengah padat karena pH disesuaikan dengan persyaratan. Unsur-unsur yang terdapat di dalam media dapat terlarut sempurna.

Sterilisasi media tanam yang mengandung bahan kimia tidak mudah rusak dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan antara 15 – 17,5 psi dengan waktu antara 20 – 25 menit (Suryowinoto, 1988). Hasil dari sterilisasi media tanam adalah steril. Kontaminasi tidak terlihat pada keseluruhan media setelah dilakukan sterilisasi.

D. Hasil Sterilisasi Alat, *Entkas*, dan Eksplan

Zulkarnain (2009) mengungkapkan bahwa beberapa sumber kontaminasi mikroorganisme pada sistem kultur jaringan dapat disebabkan oleh medium sebagai akibat proses sterilisasi yang tidak sempurna, lingkungan kerja dan pelaksanaan penanaman yang kurang hati-hati dan kurang teliti, secara internal (kontaminan terbawa di dalam jaringan), secara eksternal (kontaminan berada di permukaan eksplan) akibat prosedur sterilisasi yang kurang sempurna, dan dari serangga atau hewan kecil yang berhasil masuk ke dalam botol kultur setelah diletakkan di dalam ruang kultur.

Pelczar & Chan (1988) mengungkapkan bahwa sterilisasi dengan panas kering atau udara panas dianjurkan apabila penggunaan uap bertekanan tidak dikehendaki atau bila tidak dapat terjadi kontak antara uap bertekanan dengan benda yang akan disterilkan. Sterilisasi ini berlaku untuk perabotan laboratorium

seperti cawan petri, pipet, juga minyak, serbuk, serta beberapa peralatan. Semua alat tersebut disterilisasi dengan *oven* pada suhu 160 °C selama 2 jam. Hasil dari sterilisasi alat adalah steril. Sterilisasi dengan suhu tinggi digunakan karena protein bakteri dan jamur akan terdenaturasi pada suhu tinggi sehingga bakteri dan jamur akan mati.

Entkas adalah bentuk lama dari alat penabur. *Entkas* memiliki kelemahan diantaranya, kadang – kadang dindingnya bocor sehingga keadaan di dalamnya sudah tidak steril lagi. *Entkas* disterilkan dengan menggunakan formalin tablet selama 24 jam yang terlebih dahulu disemprot dengan alkohol 70%. Tablet formalin diletakkan pada cawan petri terbuka. Formalin akan menguap dan menyebabkan koagulasi protein sehingga dapat membunuh organisme di dalam *entkas*.

Bahan tanaman dari lapangan banyak mengandung debu, kotoran-kotoran dan berbagai kontaminan lainnya. Eksplan yang diperoleh dari bahan merupakan sumber kontaminan paling potensial. Sterilisasi eksplan merupakan suatu proses untuk mematikan mikroorganisme yang terdapat pada suatu eksplan dan di dalam suatu eksplan. Larutan yang dapat digunakan untuk sterilisasi permukaan eksplan ada macam - macam, tetapi konsentrasi dan waktu sterilisasi harus diperhatikan agar diperoleh hasil sterilisasi optimal. Kondisi yang steril dapat mendukung keberhasilan dalam kultur jaringan.

Tabel 6 Sterilisasi eksplan daun Zodia

Larutan Sterilisasi	Kadar (%)	Waktu (menit)
NaOCl	2,5	10 – 15
NaOCl	1,25	10 – 15
Alkohol	70	1 – 2

Sterilisasi eksplan dilakukan secara kimiawi karena pada dasarnya sterilisasi kimiawi digunakan untuk eksplan yang lunak seperti daun, tangkai daun, dan anther. Apabila kontaminan tidak dihilangkan maka dalam media yang

banyak mengandung karbohidrat, vitamin dan berbagai mineral akan segera ditumbuhi bakteri maupun cendawan. Eksplan yang terkontaminasi jamur atau mikroorganisme lain akan sulit bertumbuh karena nutrisi yang ada dalam media akan terserap oleh mikroorganisme yang pertumbuhannya jauh lebih cepat dibandingkan kalus. Eksplan yang telah ditanam akan tertutupi oleh kontaminan, sehingga eksplan akan mati. Lunak atau kerasnya eksplan berpengaruh pada konsentrasi larutan desinfektan yang digunakan atau pada lamanya waktu yang digunakan untuk mencuci.

Detergen merupakan bahan awal yang digunakan untuk menghilangkan eksplan dari debu dan kotoran yang menempel, namun pemakaian detergen saja belum dapat mensterilkan eksplan. Senyawa NaOCl merupakan bahan pensteril permukaan jaringan tanaman yang bertujuan untuk sterilisasi jaringan tanaman. Pemberian NaOCl terhadap sterilisasi sangat berpengaruh karena terdiri dari Natrium Hipoklorit yang mana mampu membersihkan mikroorganisme yang terkait bahan tanam, menghilangkan partikel-partikel tanah dan debu (Santoso, 2003). Alkohol digunakan sebagai antibakteri.

Lamanya penggojokan dengan menggunakan NaOCl berkadar tinggi menyebabkan nekrosis. Bila menggunakan larutan desinfektan dengan konsentrasi yang tinggi berarti waktu harus lebih singkat dibandingkan dengan menggunakan larutan desinfektan konsentrasi rendah. Penggunaan konsentrasi desinfektan yang terlalu rendah dan waktu yang tidak sesuai dengan eksplan yang dipakai akan menyebabkan mikroorganisme tidak dapat mati. Sterilisasi dengan alkohol harus dihentikan bila eksplan mengalami perubahan warna (warna hijau menjadi hilang atau berubah menjadi warna coklat) karena menyebabkan eksplan kering dan sukar tumbuh.

E. Hasil Penanaman Eksplan

Inokulasi merupakan kegiatan penanaman eksplan ke dalam botol kultur. Penanaman eksplan dilakukan dalam *entkas* dengan kondisi steril. Eksplan yang dipotong-potong dengan menggunakan *scalpel* steril di dalam cawan petri dengan ukuran panjang ± 1 cm. Eksplan harus dilukai agar memperbanyak kemungkinan tumbuh kalus. Potongan eksplan dimasukkan ke dalam botol media MS setengah kuat yang berisi zat pengatur tumbuh dengan berbagai variasi konsentrasi BAP dan NAA yang sesuai dengan rancangan percobaan. Eksplan ditanam pada media dengan cara diletakkan di atas media sampai menyentuh media, hal ini bertujuan agar hormon zat pengatur tumbuh dapat diserap oleh eksplan sehingga dapat menyebabkan pertumbuhan kalus. Botol media kemudian ditutup kembali, botol-botol tersebut diletakkan dalam rak kultur yang diterangi lampu *day light* dan diinkubasi pada suhu $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Inkubasi merupakan tahapan kegiatan kultur yang bertujuan untuk menumbuhkan eksplan yang telah ditanam dalam botol. Penanaman eksplan harus dilakukan se-aseptis mungkin.

F. Pengamatan

1. Hasil Pertumbuhan Kalus

1.1 Tekstur dan Warna Kalus yang Diperoleh

Tabel 7 Visualisasi Kalus

Konsentrasi	Tekstur Kalus		Warna Kalus	
	Awal	Akhir	Awal	Akhir
B0N2	Remah	Remah	Putih, hijau muda	Putih kecoklatan, coklat
B0,5N1,5	Remah	Remah	Putih, hijau muda	Putih kecoklatan, coklat
B1N1	Remah	Remah	Putih, hijau muda	Kuning kecoklatan
B1,5N0,5	Remah	Remah	Putih, hijau muda	Kuning kecoklatan, putihkehijauan, coklat
B2N0	Remah	Remah	Putih, hijau muda	Putih, kuning kecoklatan, coklat

Keterangan :

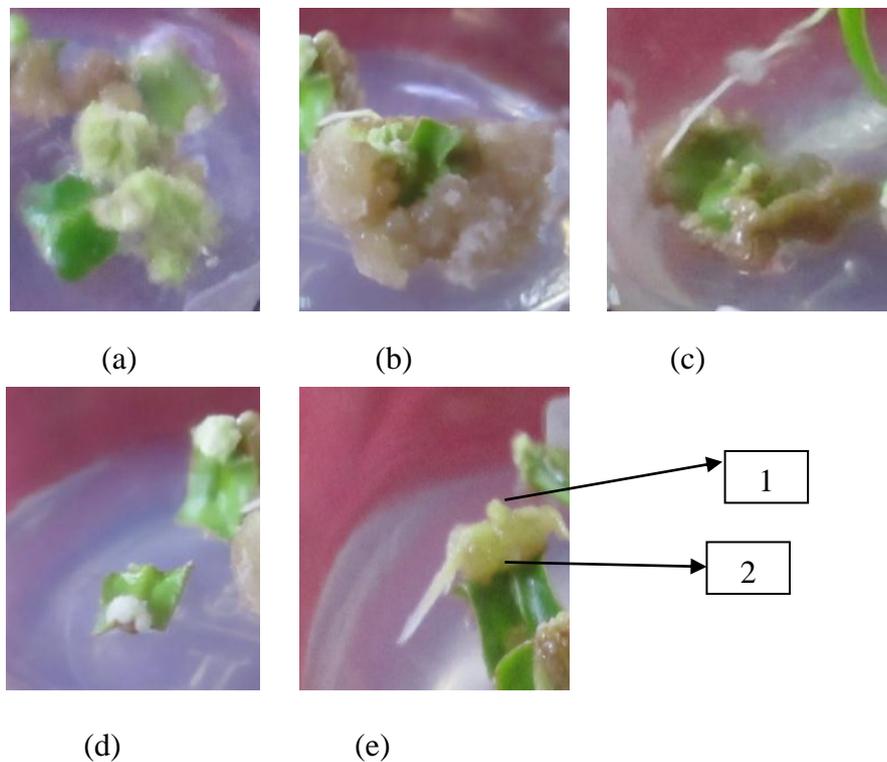
B0N2 = BAP 0 mG/L : NAA 2 mG/L

B1,5N0,5 = BAP 1,5 mG/L : NAA 0,5 mG/L

B0,5N1,5 = BAP 0,5 mG/L : NAA 1,5 mG/L

B2N0 = BAP 2 mG/L : NAA 0 mG/L

B1N1 = BAP 1 mG/L : NAA 1 mG/L



Gambar 7 Visualisasi warna kalus putih kehijauan (a) putih kecoklatan (b) coklat (c) putih (d) kuning kecoklatan (e); kalus (1) eksplan (2)



Gambar 8 Visualisasi kalus remah

Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* berupawarna dan tekstur kalus menggambarkan penampilan *visual* kalus sehingga dapat diketahui kalus yang masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Jaringan

kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda. Kualitas kalus yang baik sebagai penghasil senyawa metabolit sekunder yaitu mempunyai ciri-ciri warna dan tekstur yang sesuai dengan metabolit sekunder yang diinginkan.

Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai pertumbuhan suatu kalus. Kalus yang baik untuk digunakan sebagai bahan penghasil metabolit sekunder yaitu memiliki tekstur kompak (*non friable*). Tekstur kalus yang kompak dianggap baik karena dapat mengakumulasi metabolit sekunder lebih banyak. Pemberian zpt dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder, hal ini disebabkan zpt yang ditambahkan dapat menyebabkan perubahan fisiologi dan biokimia tumbuhan melalui pengaturan kerja enzim. Zpt berperan dalam pengikatan membran protein yang berpotensi untuk aktivitas enzim. Hasil pengikatan ini mengaktifkan enzim tersebut dan mengubah substrat menjadi beberapa produk baru. Produk baru yang terbentuk ini menyebabkan pembentukan metabolit sekunder (Indah & Ermavitalini, 2013). Kalus yang kompak mempunyai susunan sel yang rapat, padat sehingga sulit untuk dipisah-pisahkan dan mempunyai vakuola yang lebih besar dalam sel-selnya serta mempunyai dinding polisakarida yang lebih besar, dengan vakuola yang besar ini memungkinkan kalus dapat menyimpan air di dalam sel, sehingga kandungan air dari kalus lebih tinggi dan berat basah biasanya akan naik.

Terbentuknya kalus yang bertekstur remah dipacu oleh adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan yang telah tumbuh membentuk kalus tersebut (Widyawati, 2010). Kalus yang remah mempunyai susunan sel yang longgar sehingga mudah dipisah-pisahkan dan sel-selnya bersifat meristematik serta aktif membelah (Street, 1993 dalam Widyawati, 2010).

Perlakuan terhadap eksplan pada penelitian ini memberikan kalus yang remah. Tekstur kalus yang tidak terlalu kompak ini disebabkan karena waktu induksi kalus kurang lama, sehingga hal ini akan berdampak pada produksi metabolit sekunder.

Warna kalus kecoklatan terdapat pada hampir semua perlakuan yang terbentuk kalus. Warna kecoklatan pada kalus (*browning*) ini akibat adanya metabolisme senyawa fenol bersifat berlebihan, yang sering terangsang akibat proses sterilisasi eksplan (Yustina, 2004 dalam Andaryani, 2010). Kalus yang menghasilkan warna kecoklatan dan putih kecoklatan juga dapat disebabkan karena kalus tidak sesegera mungkin dilakukan subkultur sehingga nutrisi yang diserap oleh eksplan menurun kemudian kalus mengalami pencoklatan (*browning*) (Hutami, 2008 dalam Aziz, 2014). Peristiwa pencoklatan tersebut sesungguhnya merupakan suatu peristiwa alamiah dan proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik seperti pengupasan, dan pemotongan. Tidak adanya kalus, diduga disebabkan oleh hilangnya polarisasi yang tentunya jika masih ada akan dapat mendorong lebih banyak dibentuknya klorofil. Gejala pencoklatan merupakan tanda-tanda terjadinya kemunduran fisiologis eksplan. Kalus yang berwarna putih atau putih kecoklatan, berarti ada proses dekomposisi klorofil (Santoso & Nursandi, 2003). Konsentrasi BAP 2 mg/L NAA 0 mg/L dan BAP 1,5 mg/L NAA 0,5 mg/L menunjukkan warna kalus putih, putih kekuningan dan putih kehijauan. Menurut Wattimena (2008), warna kalus yang masih memberikan warna kekuningan menunjukkan bahwa kalus masih aktif membelah atau berdiferensiasi sehingga pada fase akhir eksponensial masih dimungkinkan terjadinya aktivitas produksi metabolit sekunder. Di lihat dari warna kalus yang diperoleh, dapat diduga bahwa metabolit primer belum terbentuk sempurna di dalam kalus.

1.2 Prosentase Keberhasilan Pertumbuhan Kalus

Kalus dapat tumbuh bila pada media tersedia zat pengatur tumbuh. Tidak adanya zat pengatur tumbuh akan menyebabkan kalus atau organ tertentu tidak dapat tumbuh. Peranan sitokinin dan auksin sangat nyata dalam pengaturan pembelahan sel, pemanjangan sel, diferensiasi sel, dan pembentukan organ. George dan Sherrington (1984) mengungkapkan bahwa, apabila ketersediaan sitokinin di dalam media kultur sangat terbatas maka pembelahan sel pada

jaringan yang dikulturkan akan terhambat (lihat gambar 4) . Smith (1992) mengungkapkan bahwa konsentrasi auksin yang rendah akan meningkatkan pembentukan akar adventif, sedangkan auksin konsentrasi tinggi akan merangsang pembentukan kalus dan menekan morfogenesis (Zulkarnain, 2009).

Prosentase keberhasilan eksplan membentuk kalus dilakukan dengan menghitung perbandingan jumlah eksplan yang telah berhasil tumbuh membentuk kalus terhadap jumlah seluruh eksplan yang ditanam dikalikan 100%. Prosentase kontaminasi kalus dilakukan dengan menghitung perbandingan jumlah eksplan yang terkontaminasi terhadap jumlah seluruh eksplan yang ditanam dikalikan 100%.

Tabel 8 Prosentase keberhasilan pertumbuhan kalus

Ulangan	Keterangan	Konsentrasi BAP : NAA (mG/L)				
		B0N2	B0,5N1,5	B1N1	B1,5N0,5	B2N0
1	Jumlah tanam	10	10	10	10	10
	Jumlah tumbuh	6	5	5	4	3
	Jumlah kontaminan	4	5	5	6	7
	Prosentase keberhasilan (%)	60%	50%	50%	40%	30%
2	Jumlah tanam	10	10	10	10	10
	Jumlah tumbuh	6	8	5	6	4
	Jumlah kontaminan	4	2	5	4	6
	Prosentase Keberhasilan (%)	60%	80%	50%	60%	40%
3	Jumlah tanam	10	10	10	10	10
	Jumlah tumbuh	9	9	8	9	8
	Jumlah kontaminan	1	1	2	1	2
	Prosentase keberhasilan (%)	90%	90%	80%	90%	80%

Keterangan :

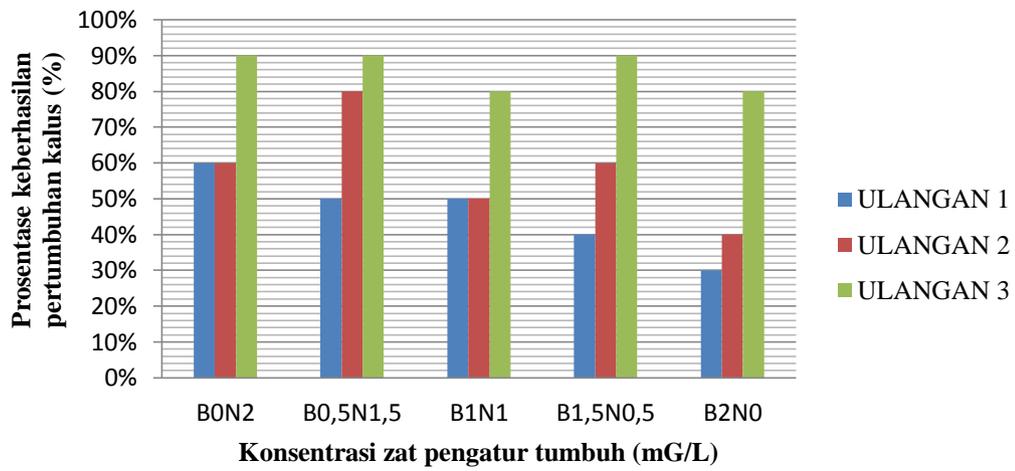
B0N2 = BAP 0 mG/L : NAA 2 mG/L

B0,5N1,5 = BAP 0,5 mG/L : NAA 1,5 mG/L

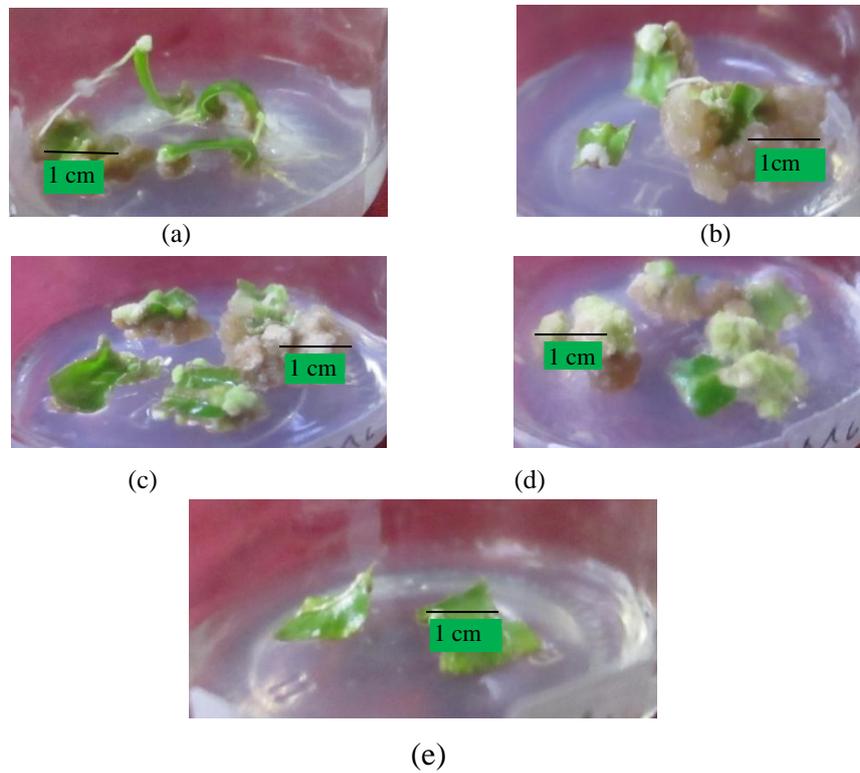
B1N1 = BAP 1 mG/L : NAA 1 mG/L

B1,5N0,5 = BAP 1,5 mG/L : NAA 0,5 mG/L

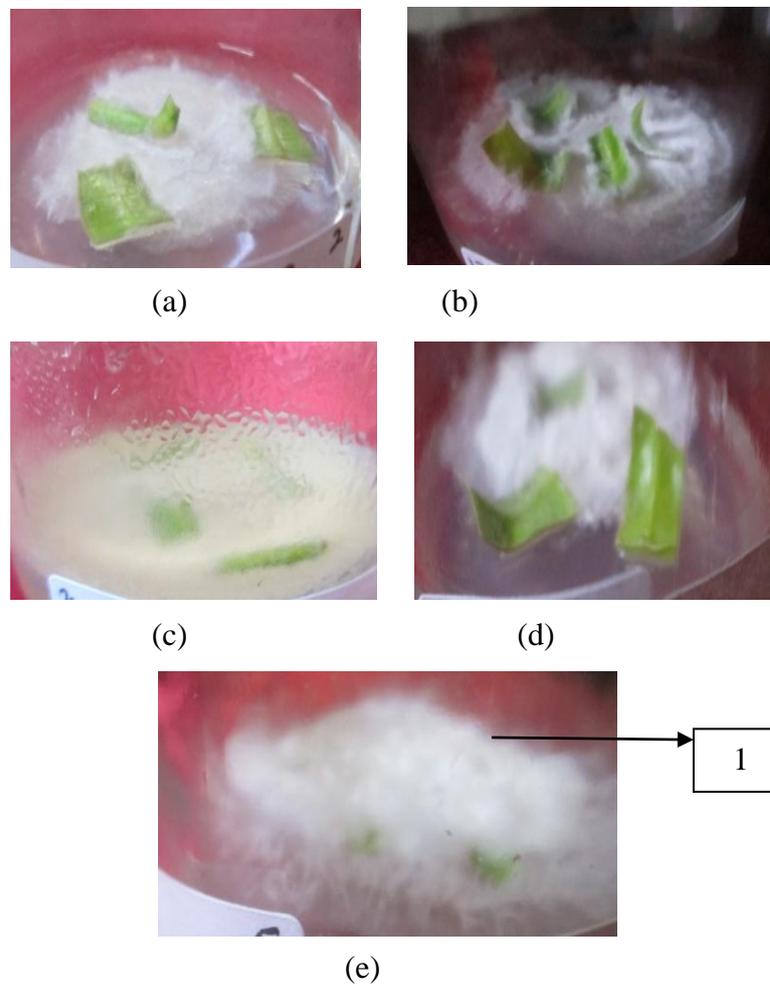
B2N0 = BAP 2 mG/L : NAA 0 mG/L



Gambar 9 Grafik prosentase keberhasilan perumbuhan kalus



Gambar 10 Hasil pertumbuhan kalus tiap konsentrasi zpt BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L (a) BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L (b) BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L (c) BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L (d) BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L (e)



Gambar 11 Kalus terkontaminasi pada tiap konsentrasi zpt BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L (a) BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L (b) BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L (c) BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L (d) BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L (e); kontaminan (1)

Tabel 9 Waktu Induksi Kalus

Konsentrasi BAP : NAA (mG/L)	Rata-rata waktu kalus (hari setelah tanam)
0 : 2	7
0,5 : 1,5	7
1 : 1	9
1,5 : 0,5	11
2 : 0	15

Tabel 8 menerangkan bahwa total prosentase pertumbuhan pada ulangan 1, ulangan 2, dan ulangan 3 pada konsentrasi BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L memberikan prosentase pertumbuhan paling sedikit. Adanya sitokinin tanpa auksin dapat menyebabkan tidak adanya pertumbuhan kalus. Kandungan zat pengatur tumbuh endogen juga berpengaruh terhadap hasil pertumbuhan, oleh karena itu pada BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L masih terdapat pertumbuhan kalus. Pertumbuhan kalus tersebut diduga disebabkan karena pada eksplan masih terdapat zat pengatur tumbuh endogen yaitu auksin. Rata-rata prosentase keberhasilan yang dimiliki oleh BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L adalah sebesar 70%; BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L sebesar 73,34%; BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L sebesar 60%; BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L sebesar 63,34%; BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L sebesar 50%. Konsentrasi BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L dan BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L memberikan hasil pertumbuhan paling tinggi, sedangkan pada BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L dan BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L juga masih terdapat pertumbuhan meskipun konsentrasi zpt auksin sedikit. Hal ini membuktikan bahwa zpt auksin mempercepat pembelahan sel, sekalipun hanya sedikit konsentrasi yang ditambahkan dan juga membuktikan ungkapan George dan Sherrington (1984) bahwa adanya penambahan sitokinin tanpa auksin akan menghambat pertumbuhan kalus.

Keadaan dari daun yang diambil dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus, daun yang diambil terlalu tua maka proses pembelahan lambat (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Hartman *et al* (1990) menyatakan bahwa jaringan-jaringan yang sedang aktif tumbuh pada awal masa pertumbuhan biasanya merupakan bahan eksplan yang paling baik. Jaringan yang kurang aktif sering menginginkan modifikasi jenis dan takaran zat pengatur tumbuh selama pengkulturan. Sejalan dengan semakin tuanya organ tanaman eksplan yang diambil, proses pembelahan dan regenerasi sel cenderung untuk menurun (Zulkarnain, 2009).

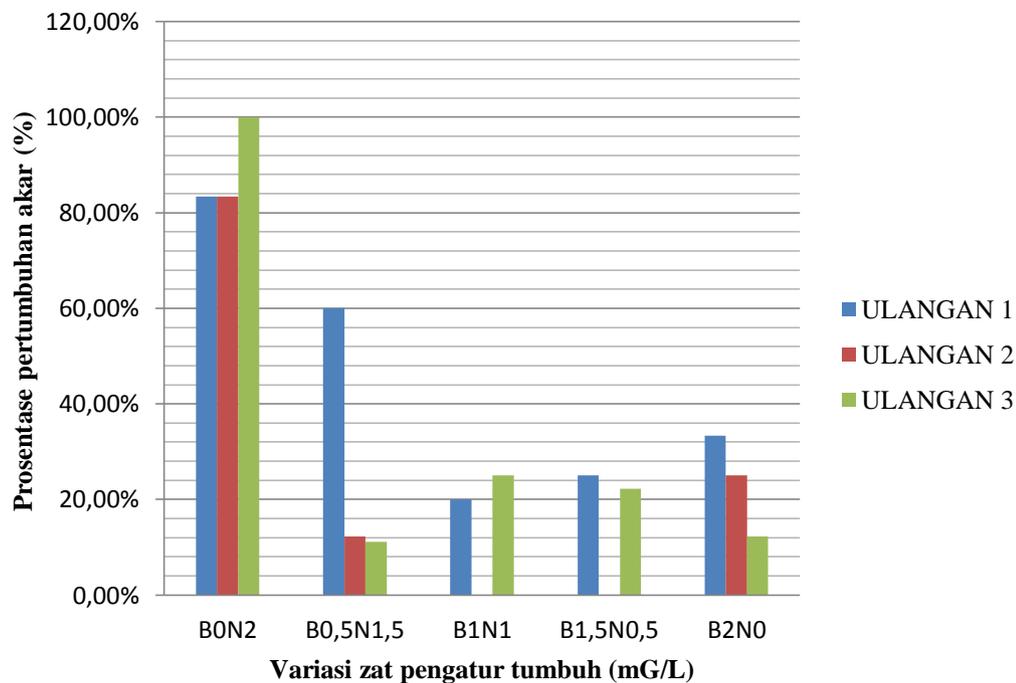
Keberhasilan dalam penanaman juga dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti yang dikemukakan oleh Zulkarnain (2009) adalah sebagai berikut : lingkungan

kerja dan pelaksanaan penanaman yang kurang hati-hati dan kurang teliti, eksplan, secara internal (kontaminan terbawa di dalam jaringan), secara eksternal (kontaminan berada di permukaan eksplan) akibat prosedur sterilisasi yang kurang sempurna, dan serangga atau hewan kecil yang berhasil masuk ke dalam botol kultur setelah diletakkan di dalam ruang kultur ataupun ruang stok.

2. Prosentase Keberhasilan Pertumbuhan Akar

Tabel 10 Prosentase keberhasilan pertumbuhan akar

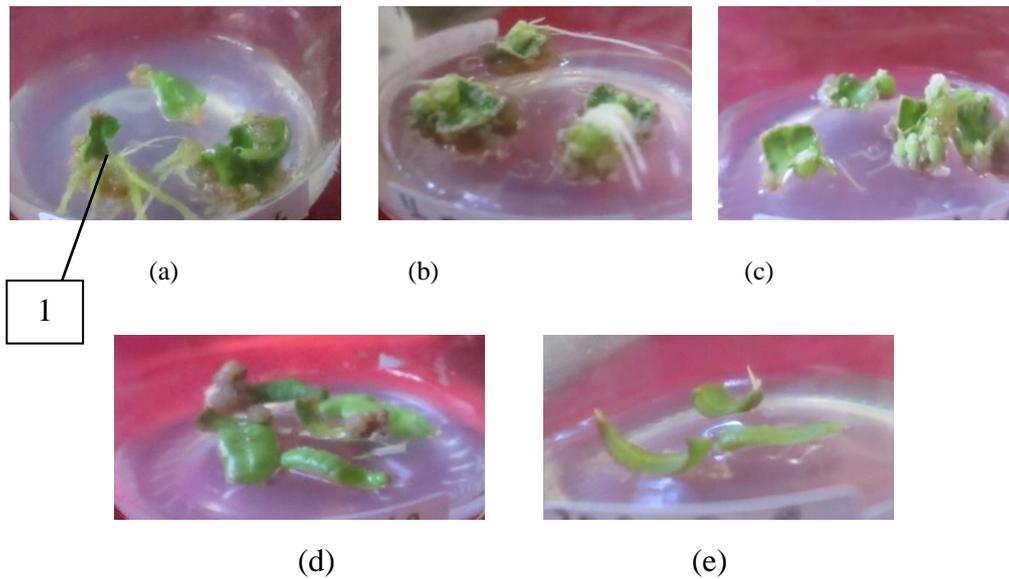
Ulangan	Keterangan	Konsentrasi BAP : NAA (mG/L)				
		B0N2	B0,5N1,5	B1N1	B1,5N0,5	B2N0
1	Jumlah kalus tumbuh	6	5	5	4	3
	Jumlah kalus tumbuh akar	5	3	1	1	1
	Pertumbuhan akar (%)	83,34	60	20	25	33,34
2	Jumlah kalus tumbuh	6	8	5	6	4
	Jumlah kalus tumbuh akar	5	1	0	0	1
	Pertumbuhan akar (%)	83,34	12,25	0,00	0,00	25
3	Jumlah kalus tumbuh	9	9	8	9	8
	Jumlah kalus tumbuh akar	9	1	2	2	1
	Pertumbuhan akar (%)	100	11,12	25	22,23	12,25



Gambar12 Grafik prosentase pertumbuhan akar

Keterangan :

B0N2 = BAP 0 mG/L : NAA 2 mG/L
 B0,5N1,5 = BAP 0,5 mG/L : NAA 1,5 mG/L
 B1N1 = BAP 1 mG/L : NAA 1 mG/L
 B1,5N0,5 = BAP 1,5 mG/L : NAA 0,5 mG/L
 B2N0 = BAP 2 mG/L : NAA 0 mG/L



Gambar 13 Hasil pertumbuhan akar pada berbagai variasi konsentrasi zpt BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L (a) BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L (b) BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L (c) BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L (d) BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L (e) ; akar (1)

Organogenesis adalah suatu proses dimana pucuk dan/atau akar adventif berkembang dari dalam massa sel-sel kalus (Zulkarnain, 2009). Akar merupakan organ vegetatif utama yang memasok air, mineral dan bahan bahan yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Gardner *et al.*,1991 dalam Fitriani,2008). Akar memungkinkan tanaman akan lebih mudah menyerap unsur-unsur yang terdapat dalam media.

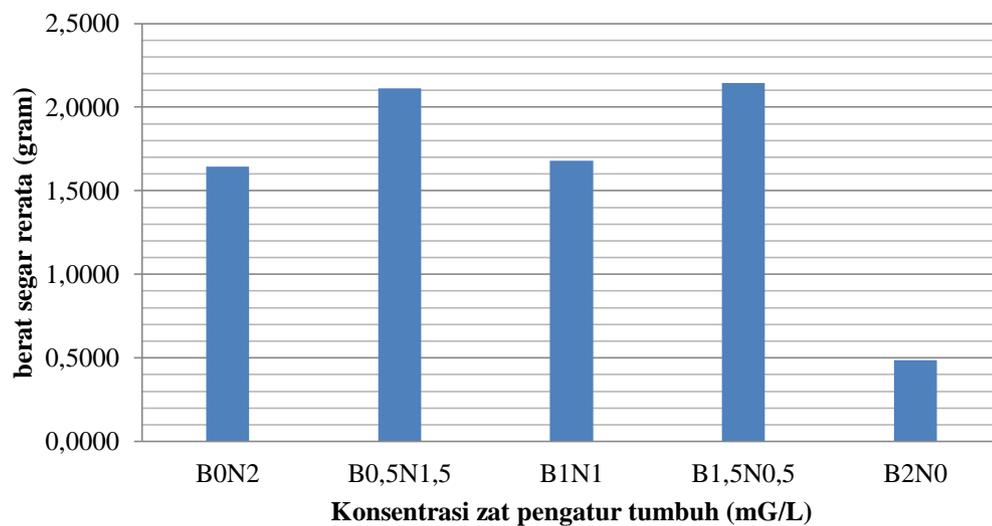
Tabel 10 menunjukkan pertumbuhan akar pada konsentrasi BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L memberikan pertumbuhan yang paling baik dengan rerata prosentase keberhasilan pertumbuhan sebesar 88,89%. BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L sebesar 27,79%; BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L sebesar 15%; BAP 1,5 mG/L NAA

0,5 mG/L sebesar 15,74%; dan BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L sebesar 23,53%. Akar pada BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L dan BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L memang tumbuh bahkan memiliki prosentase lebih besar, namun akar pada dua konsentrasi ini sangat pendek dan hampir tidak terlihat. Akar yang terbentuk secara visual berwarna putih dan putih kekuningan. Telah diungkapkan oleh George dan Sherrington (1984) dalam gambarnya (lihat gambar 4), bahwa penambahan auksin yang tinggi akan membentuk akar, sedangkan sitokinin biasanya tidak digunakan untuk tahap pengakaran pada mikropropagasi karena aktivitasnya dapat menghambat pembentukan akar, menghalangi pertumbuhan akar, dan menghambat pengaruh auksin terhadap inisiasi akar pada kultur jaringan. Akar yang tumbuh pada BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L hanya sedikit meskipun konsentrasi auksin lebih tinggi, hal ini disebabkan karena adanya sitokinin dalam media menyebabkan penghambatan terbentuknya akar. Sitokinin merupakan ZPT yang bertujuan untuk menumbuhkan tunas. Dapat dilihat pada gambar 9 bahwa semakin menurunnya konsentrasi zpt auksin yang ditambahkan, semakin sedikit dan semakin pendek juga akar yang tumbuh. Konsentrasi BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L masih dapat menumbuhkan akar pada beberapa media karena diduga pada eksplan masih terdapat hormon endogen auksin. Kondisi nutrisi ZPT yang optimal akan lebih menghasilkan banyak kalus.

3. Berat Segar Total

Tabel 11 Perolehan berat segar kalus

Ulangan	Berat kalus segar pada konsentrasi ke- (gram)				
	B0N2	B0,5N1,5	B1N1	B1,5N0,5	B2N0
U1	2,5023	4,3267	3,7936	2,7940	0,2954
U2	2,3240	0,4457	0,1615	1,1664	0,7174
U3	0,1066	1,5594	1,0803	2,4678	0,4430
Rerata	1,6443±1,3	2,1106±1,9	1,6784±1,8	2,1427±0,8	0,4853±0,2



Gambar14 Grafik berat segar rerata kalus dan organ akar

Keterangan :

B0N2 = BAP 0 mG/L : NAA 2 mG/L

B0,5N1,5 = BAP 0,5 mG/L : NAA 1,5 mG/L

B1N1 = BAP 1 mG/L : NAA 1 mG/L

B1,5N0,5 = BAP 1,5 mG/L : NAA 0,5 mG/L

B2N0 = BAP 2 mG/L : NAA 0 mG/L

Berdasarkan hasil penelitian dapat dilihat bahwa pemberian zpt BAP dan NAA berpengaruh terhadap induksi kalus daun Zodia. Wetherell (1982) menyatakan bahwa untuk dapat terjadi pembelahan sel dan pertumbuhan kalus yang baik secara *in vitro*, tidak ada formula zat pengatur tumbuh satupun yang terbaik dalam setiap penggunaannya. Arah perkembangan kultur ditentukan oleh interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diproduksi oleh sel tanaman secara endogen, sebab di dalam eksplan itu sendiri sebenarnya sudah ada zat pengatur tumbuh endogen, tapi dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* zat pengatur tumbuh eksogen masih ditambahkan. Kalus tumbuh lambat pada penambahan kinetin dan sitokinin saja (tanpa penambahan auksin). Pertumbuhan kalus masih dapat terbentuk dikarenakan dalam eksplan daun masih terdapat hormon auksin endogen (Fitriani, 2006). Hal ini mendukung

hasil penelitian ini bahwa konsentrasi BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L dan BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L memberikan hasil yang terbesar, berturut-turut yaitu 2,1106 gram dan 2,1427 gram. Konsentrasi BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L sebesar 1,6643 gram, BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L sebesar 1,678 gram, dan BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L juga masih memberikan hasil berat yaitu sebesar 0,4853 gram. Standart deviasi BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L, BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L, dan BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L terlalu tinggi yaitu lebih dari 1 artinya sebaran data hasil penelitian ditolak. Hanya BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L dan BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L yang memiliki standart deviasi kurang dari 1 artinya sebaran data diterima. Konsentrasi BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L masih mampu memberikan hasil berat dikarenakan hormon auksin endogen masih terdapat pada eksplan daun sehingga kalus dan organ masih dapat tumbuh walaupun hanya sedikit.

4. Hasil Analisis Kandungan Senyawa

Daun Zodia yang tidak diberi perlakuan dan kalus beserta organ yang terbentuk, masing-masing ditimbang. Kalus (beserta organ bila terbentuk) dihaluskan dan disari dengan pelarut n-heksana sebanyak 3 ml lalu disaring menggunakan kertas saring kemudian dibilas lalu dimasukkan ke dalam labu takar, ditambah pelarut sampai 5 mL. Perlu diketahui bahwa pemilihan pelarut dan metode sangat mempengaruhi hasil dari ekstraksi. Pemilihan pelarut harus sesuai dengan sifat kepolaran suatu senyawa yang akan diambil.

Kromatografi gas adalah suatu proses dengan mana suatu campuran menjadi komponen-komponennya oleh fase gas yang bergerak melewati suatu lapisan serapan (sorben) yang stationer. Analisis kualitatif dan kuantitatif dilakukan dengan menginjeksikan filtrat ekstrak daun Zodia kalus pada kolom kromatografi gas. Fase gerak yang digunakan berupa gas nitrogen. Nitrogen lebih banyak digunakan karena harganya murah, inert, aman dan mudah didapat. Pemilihan fase diam bergantung pada kepolaran cuplikan. Cuplikan yang di analisis adalah minyak atsiri, dimana minyak atsiri memiliki sifat non polar.

Prinsip utama dalam pemisahan kromatografi gas adalah perbedaan laju migrasi masing-masing komponen dalam melalui kolom (waktu retensi / tR).

Metabolit sekunder adalah golongan senyawa yang terkandung dalam tubuh mikroorganisme, flora dan fauna yang terbentuk melalui proses metabolisme sekunder. Secara umum bahwa proses produksi senyawa metabolit sekunder dengan kultur jaringan pada prinsipnya melalui 6 tahapan penting. Salah satu prinsip tersebut adalah optimasi terhadap pertumbuhan kalus. Persyaratan minimal untuk dapat menumbuhkan kalus secara optimal adalah media yang sesuai, ketepatan konsentrasi dan kombinasi zat pengatur tumbuh yang diberikan pada media. Bila pembentukan kalus untuk tujuan mendapatkan produk metabolit sekunder, maka upaya-upaya optimasi pertumbuhan kalus harus diimbangi dengan induksi metabolit sekundernya (Santoso dan Nursandi, 2003).

Tabel 12 Hasil analisis senyawa metabolit sekunder

No.	Nama sampel / keterangan	Waktu retensi (menit)
1	Standar α -pinene	3,614
2	Standar linalool	16,768
3	Pembanding A	1. 2,920 2. 3,156 3. 3,308
5	Pembanding B	1. 2,922 2. 3,156 3. 3,306
6	Sampel N B0,5 II	1. 3,155 2. 3,301

Keterangan :

Pembanding A = ekstrak daun Zodia muda

Pembanding B = ekstrak daun Zodia tua

Sampel N B0,5 II = media kultur dengan penambahan zat pengatur tumbuh
BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L

Analisis senyawa dilakukan terhadap kalus dan organ yang terbentuk pada setiap variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh. Tabel 12 menunjukkan waktu retensi dan luas area yang terbentuk oleh peak masing-masing standart dan sampel. Standart linalool memiliki waktu retensi pada 16,768 menit, sedangkan standart α -pinene memiliki waktu retensi pada 3,614 menit. Daun Zodia muda dijadikan sebagai pembanding perolehan senyawa metabolit sekunder. Daun Zodia muda menunjukkan 3 *peak*. *Peak* pertama memiliki waktu retensi yaitu 2,920 menit. *Peak* kedua memiliki waktu retensi pada 3,156 menit. *Peak* ketiga memiliki waktu retensi pada 3,308 menit. Pembanding daun Zodia tua menunjukkan 3 *peak*. *Peak* pertama memiliki waktu retensi pada 2,922 menit. *Peak* kedua memiliki waktu retensi sebesar 3,156 menit. *Peak* ketiga memiliki waktu retensi pada 3,306 menit. Sampel BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L ulangan kedua (N B0,5 II) memiliki 2 *peak*. *Peak* pertama memiliki waktu retensi pada 3,155 menit. *Peak* kedua memiliki waktu retensi pada 3,301 menit. Dilihat dari waktu retensinya, sampel N B0,5 II dan pembanding (daun muda dan daun tua) sama sekali tidak memiliki kesamaan dengan waktu retensi dari standart linalool, sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel dan pembanding tidak mengandung senyawa linalool. Waktu retensi dari sampel N B0,5 II dan pembanding (daun muda dan daun tua) hanya mendekati waktu retensi dari standart α -pinene, namun hal ini dapat memberikan kemungkinan bahwa pada sampel mengandung senyawa α -pinene.

Penelitian ini mampu menumbuhkan kalus dan organ akar karena menggunakan konsentrasi yang optimal, namun metabolit sekunder tidak terbentuk. Pemanenan dalam waktu yang kurang tepat menyebabkan metabolit sekunder belum terbentuk secara optimal. Kegagalan dalam perolehan metabolit sekunder dapat disebabkan karena beberapa hal. Santoso dan Nursandi (2003) mengungkapkan bahwa biosintesis metabolit sekunder masih merupakan tantangan yang sulit, apalagi untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder dari kultur jaringan harus lebih besar dibandingkan produksi senyawa sekunder yang

diekstrak dari tanaman di alam. Beberapa faktor yang mempengaruhi produksi metabolit sekunder melalui kultur jaringan yaitu : ekspresi sintesis senyawa metabolit sekunder, asal eksplan, dan hal-hal yang mempengaruhi kultur jaringan seperti komposisi media, jenis kultur, macam dan konsentrasi zat tumbuh, dan lingkungan kultur. Selain itu, waktu induksi kalus juga berpengaruh pada produksi metabolit sekunder. Kegagalan dalam perolehan metabolit sekunder diduga karena kalus daun zodia masih aktif tumbuh dan membutuhkan metabolit primer sehingga metabolit sekunder belum terbentuk.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengamatan dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa

Pertama, organ dan kalus berhasil tumbuh dengan baik pada medium MS setengah kuat dengan penambahan kombinasi zptBAP dan NAA

Kedua, kombinasi zptBAP 0 mG/L NAA 2 mG/L merupakan kombinasi yang paling baik untuk menghasilkan organ akar yaitu sebesar 88,89%; sedangkan BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L merupakan kombinasi zpt yang paling baik untuk menghasilkan kalus, yaitu sebesar 73,34%

Ketiga, penambahan zpt BAP dan NAA pada medium MS (*Murashige Skoog*) setengah kuat dengan waktu induksi delapan minggu tidak berpengaruh terhadap pembentukan senyawa aktif linalool dan α -pinene

B. Saran

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan membandingkan pertumbuhan kalus yang ditanam pada media MS (*Murashige Skoog*) setengah kuat dengan penambahan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan waktu subkultur dan waktu pemanenan yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- [Depkes RI]. 2003. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Jilid VI. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Alfian, B. dan Susanti R. 2012. *Analisis Senyawa Fenolik*. Semarang: Universitas Diponegoro Press. Hlm. 43-65.
- Ansel H C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Edisi IV. Jakarta: Universitas Indonesia. Hlm 605-607
- Ariati SN, Waeniati, Muslimin, Suwastika IN. 2012. Induksi Kalus Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) pada Media MS dengan Penambahan 2,4-D, BAP dan Air Kelapa. *Jurnal Natural Science* Vol 1 (1) : 74-84.
- Aziz, M. M., Ratnasari, E., Rahayu, Y.S. 2014. Induksi Kalus Umbi Iles-Iles (*Amorphophallus muelleri*) dengan kombinasi Konsentrasi 2,4-D dan BAP secara *in vitro*. *Jurnal Lentera Bio* Vol.3 No.2 : 109-114
- Bassett, J *et al.* 1994. *Vogel: Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. Diterjemahkan oleh A. Handayana P., L. Setiono. Edisi IV. Jakarta: EGC. Hlm 243
- Fitriani, H. 2008. Kajian konsentrasi bap dan naa terhadap multiplikasi tanaman *artemisia annua* L. secara *in vitro* [Skripsi]. Surakarta: Jurusan Pertanian, FMIPA, Universitas Sebelas Maret.
- Fitrianti, A. 2006. Efektivitas Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Kinetin pada Medium MS dalam Induksi Kalus Sambilotto dengan Eksplan PotonganDaun [Skripsi]. Semarang: Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universtas Negeri Semarang.
- George, E. F. and Sherrington, P.D. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exergetice Ltd: England.
- Gomes, K. A. And A.A. Gomez. 1995. *ProsedurStatistik Untuk Penelitian Pertanian. Edisi Kedua*. Jakarta; UI-PRESS

- Handayani PA, Nurcahyanti H. 2015. Ekstraksi Minyak Atsiri Daun Zodia (*Evodia Suaveolens*) dengan Metode Maserasi dan Destilasi Air. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan* 4 (1) : 1-7
- Hendaryono S, Wijayani A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan: Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman Secara Vegetatif-Modern*. Yogyakarta: Kanisius. Hlm 71-75, 90.
- Hendayana, Sumar. 2006. *Kimia Pemisahan*. Cetakan Pertama. Bandung: PT Remaja Rosdakarya. Hlm 64-65
- Indah P.N, D. Ermavitalini. 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophylluminophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *JURNAL SAINS DAN SENI POMITS* Vol. 2, No.1, (2013) 2337-3520.
- Kardinan A. 2004. *Zodia (Evodia suaveolens) Tanaman Pengusir Nyamuk*. Balitro : Tabloid Sinar Tani.
- Lestari EG. 2011. Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyak Tanaman melalui Kultur Jaringan. *Jurnal Agrobiogen* 7 (1) : 63-68.
- Luhi A.I.B, 2013. Efek Tonikum Kombinasi Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthoriza* Roxb.) dan Ekstrak Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga* L.) Terhadap Mencit Putih (*Mus musculus*) Jantan [Skripsi]. Surakarta: Jurusan Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Marlina L, Saleh A, Lumintang RWE. 2009. Perbandingan Eektivitas Media Cetak (Folder dan Poster-Kalender) dan Penyajian Tanaman Zodia terhadap Peningkatan Pengetahuan Masyarakat. *Jurnal Komunikasi Pembangunan* Vol. 07 No. 2.
- Maryuni, Agnes Eri. 2008. *Isolasi dan Identifikasi Antibakteri Minyak Atsiri Daun Zodia (Evodia sp.)*. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Muhamat, Hidayaturrahmah. 2014. Penampakan Morphologi Kulit Marmut Terhadap Pemberian Minyak Atsiri Tanaman Zodia Secara Rutin. *Biospecies* Vol. 7 No. 2 : 47-52

- Nursetiadi E. 2008. Kajian Macam Media dan Konsentrasi BAP Terhadap Multiplikasi Tanaman Manggis (*Gracinia Mangostana* L.) secara *in vitro*. Surakarta: Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI-Press.
- Ritonga A.W, 2007. *Pembuatan Media Kultur Jaringan Tanaman*. Laporan Praktikum Dasar-Dasar Bioteknologi Tanaman. Bogor: Institut Pertanian
- Rusdianto, Indrianto A. 2012. Induksi Kalus Embriogenik pada Wortel (*Daucus carota* L.) menggunakan 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Jurnal Bionature* Vol. 13 No. 2 : 136-140.
- S. Andaryani, “Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) secara In Vitro,” Skripsi, Universitas Sebelas Maret, Surakarta (2010).
- S.F. Syahid and N.K. Natalini. 2007. Induksi dan Regenerasi Kalus Keladi Tikus (*Typonium flagelliforme*. Lodd.) secara In Vitro,” *Jurnal Littri*, Vol. 13 (2007) 142-146.
- Santoso U, Nursandi F. 2003. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: UMM Press. Hlm 90, 97, 128, 129, 160, 161, 168, 169.
- Street, H.E. 1993. *Plant Tissue and Cell Culture*. University of California Press. Los Angeles.
- Sudjadi. 1988. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta : Kanisius. Hlm 153.
- Suryowinoto M. 1988. Petunjuk Laboratorium Pemuliaan secara *in vitro* PAU UGM. Yogyakarta.
- Towaha, Indriarti. 2011. Potensi Daun Zodia dalam Industri Obat Anti Nyamuk. *Majalah Semi Populer TREE* Vol. 02 No. 7. Hlm 26.
- Utari, Teguh Windy. 2015. Pertumbuhan Protokrom Anggrek *Paraphalaenopsis Laycockii* dengan Kombinasi BAP dan NAA pada Kultur In Vitro [Skripsi]. Malang: Jurusan Biologi, FSAINSTEK, Universitas Islam Nasional Maulana Malik Ibrahim.
- Wetherell, D.F. 1982. Pengantar Propagasi Tanaman secara *in vitro* Seri Kultur.

- Widyawati, G. 2010. *Pengaruh Variasi Konsentrasi BAP dan NAA terhadap Induksi dan Pertumbuhan Kalus Jarak Pagar (Jatropha curcas L.)*. Tesis Program Pasca Sarjana UNS. Surakarta.
- Wiryoedjoyo K, Supriyadi. 2014. *Induksi Kalus Daun Zodia pada Beberapa Media Tumbuh untuk Produksi Senyawa Anti-Nyamuk*. Usulan Penelitian Hibah Bersaing. Universitas Setia Budi Surakarta.
- Wiryoedjoyo K, Supriyadi. 2016. *Variasi Pertumbuhan Kalus Daun Zodia pada Beberapa Media Tumbuh untuk Produksi Senyawa Anti Nyamuk*. Jurnal Penelitian Hibah Bersaing. Universitas Setia Budi Surakarta.
- Yusnita. 2004. *Kultur Jaringan. Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Cetakan Ketiga. Agro Media Pustaka. Jakarta.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Jakarta : Bumi Aksara.

Lampiran 1. Pembuatan Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh dan Larutan Sterilisasi

1. Pembuatan Larutan stok BAP dan atau NAA (untuk 1kali ulangan)

Ditimbang 10 mg BAP dan atau NAA ditambahkan KOH 10% digojog hingga tepat larut. Aquadestilata ditambahkan sampai 100 ml sehingga dalam 1 ml mengandung 0,1 mG/L zpt BAP dan atau NAA. Dari larutan stok dibuat seri konsentrasi 0;0,5;1;1,5; dan 2 mG/Lsebanyak 100 ml dengan perhitungan sebagai berikut :

Konsentrasi 0 mG/L

$$N_1(\text{mG/L}) \cdot V_1(\text{mL}) = N_2(\text{mG/L}) \cdot V_2(\text{mL})$$

$$1 \cdot V_1 = 0 \cdot 100$$

$$= 0 \text{ mL}$$

Konsentrasi 0,5 mG/L

$$N_1(\text{mG/L}) \cdot V_1(\text{mL}) = N_2(\text{mG/L}) \cdot V_2(\text{mL})$$

$$1 \cdot V_1 = 0,5 \cdot 1$$

$$= 0,5 \text{ mL}$$

Konsentrasi 1 mG/L

$$N_1(\text{mG/L}) \cdot V_1(\text{mL}) = N_2(\text{mG/L}) \cdot V_2(\text{mL})$$

$$1 \cdot V_1 = 1 \cdot 1$$

$$= 1 \text{ mL}$$

Konsentrasi 1,5 mG/L

$$N_1(\text{mG/L}) \cdot V_1(\text{mL}) = N_2(\text{mG/L}) \cdot V_2(\text{mL})$$

$$1 \cdot V_1 = 1,5 \cdot 100$$

$$= 0 \text{ mL}$$

Konsentrasi 2 mG/L

$$N_1(\text{mG/L}) \cdot V_1(\text{mL}) = N_2(\text{mG/L}) \cdot V_2(\text{mL})$$

$$1 \cdot V_1 = 2 \cdot 1$$

$$= 2 \text{ mL}$$

2. Pembuatan Larutan NaOCL 2,5%

Diambil 2,5 mL NaOCL lalu dilarutkan sampai 100 mL dengan aquadstilata.

3. Pembuatan larutan NaOCL 2,5%

Diambil 1,25 mL NaOCL lalu dilarutkan sampai 100 mL dengan aquadstilata.

Lampiran 2. Perhitungan Prosentase Keberhasilan Pertumbuhan Kalus

$$Y = \frac{b}{a} \times 100\%$$

Keterangan :

Y = Prosentase keberhasilan

b = Jumlah eksplan yang berhasil tumbuh membentuk kalus

a = Jumlah seluruh eksplan yang ditanam

Konsentrasi B0N2

Ulangan 1

$$Y = \frac{6}{10} \times 100\%$$

Y = 60%

Ulangan 2

$$Y = \frac{6}{10} \times 100\%$$

Y = 60%

Ulangan 3

$$Y = \frac{9}{10} \times 100\%$$

Y = 90%

Konsentrasi B0,5N1,5

Ulangan 1

$$Y = \frac{5}{10} \times 100\%$$

Y = 50%

Ulangan 2

$$Y = \frac{8}{10} \times 100\%$$

Y = 80%

Ulangan 3

$$Y = \frac{9}{10} \times 100\%$$

Y = 90%

Konsentrasi B1N1

Ulangan 1

$$Y = \frac{5}{10} \times 100\%$$

Y = 50%

Ulangan 2

$$Y = \frac{5}{10} \times 100\%$$

Y = 50%

Ulangan 3

$$Y = \frac{8}{10} \times 100\%$$

Y = 80%

Konsentrasi B1,5N0,5

Ulangan 1

$$Y = \frac{4}{10} \times 100\%$$

Y = 40%

Ulangan 2

$$Y = \frac{6}{10} \times 100\%$$

Y = 60%

Ulangan 3

$$Y = \frac{9}{10} \times 100\%$$

Y = 90%

Konsentrasi B2N0**Ulangan 1**

$$Y = \frac{3}{10} \times 100\%$$

$$Y = 30\%$$

Ulangan 2

$$Y = \frac{4}{10} \times 100\%$$

$$Y = 40\%$$

Ulangan 3

$$Y = \frac{8}{10} \times 100\%$$

$$Y = 80\%$$

Lampiran 3. Perhitungan Prosentase Keberhasilan Pertumbuhan Organ

Akar

$$Y = \frac{c}{b} \times 100\%$$

Keterangan :

Y = Prosentase keberhasilan

c = Jumlah eksplan yang berhasil tumbuh membentuk organ akar

b = Jumlah eksplan yang berhasil tumbuh membentuk kalus

Konsentrasi B0N2

Ulangan 1

$$Y = \frac{5}{6} \times 100\%$$

$$Y = 83,34\%$$

Ulangan 2

$$Y = \frac{5}{6} \times 100\%$$

$$Y = 83,34\%$$

Ulangan 3

$$Y = \frac{9}{9} \times 100\%$$

$$Y = 100\%$$

Konsentrasi B0,5N1,5

Ulangan 1

$$Y = \frac{3}{5} \times 100\%$$

$$Y = 60\%$$

Ulangan 2

$$Y = \frac{1}{8} \times 100\%$$

$$Y = 12,25\%$$

Ulangan 3

$$Y = \frac{1}{9} \times 100\%$$

$$Y = 11,12\%$$

Konsentrasi B1N1

Ulangan 1

$$Y = \frac{1}{5} \times 100\%$$

$$Y = 20\%$$

Ulangan 2

$$Y = \frac{0}{5} \times 100\%$$

$$Y = 0,00\%$$

Ulangan 3

$$Y = \frac{2}{8} \times 100\%$$

$$Y = 25\%$$

Konsentrasi B1,5N0,5

Ulangan 1

$$Y = \frac{1}{4} \times 100\%$$

$$Y = 25\%$$

Ulangan 2

$$Y = \frac{0}{6} \times 100\%$$

$$Y = 0,00\%$$

Ulangan 3

$$Y = \frac{2}{9} \times 100\%$$

$$Y = 22,23\%$$

Konsentrasi B2N0**Ulangan 1**

$$Y = \frac{1}{3} \times 100\%$$

$$Y = 33,34\%$$

Ulangan 2

$$Y = \frac{1}{4} \times 100\%$$

$$Y = 25\%$$

Ulangan 3

$$Y = \frac{1}{8} \times 100\%$$

$$Y = 12,25\%$$

Lampiran 4. Determinasi Tanaman



No : 169/DET/UPT-LAB/23/III/2017
Hal : Surat Keterangan Determinasi Tumbuhan

Menyatakan bahwa :

Nama : Rosa Omega
NEM : 19133706 A
Fakultas : Farmasi Universitas Setia Budi

Telah mendeterminasikan tumbuhan : **Zodia (*Euodia suaveolens* Scheff.)**

Determinasi berdasarkan **Becker : Flora of Java.**

1b - 2b - 3b - 4b - 12b - 13b - 14b - 17b - 18b - 19b - 20b - 21b - 22b - 23b - 24b - 25b -
26b - 27a - 28b - 29b - 30b - 31a - 32a - 33a - 34a - 35a - 36d - 37b - 38b - 39b - 41b - 42b -
44b - 45b - 46c - 50b - 51b - 53b - 54b - 56b - 57b - 58b - 59d - 72b - 73b - 74a - 75b -
76a - 77a - 78b - 103c - 104b - 106b - 107a - 108b - 109b - 134a - 135b - 136b - 137a -
138c - 139b - 140c - 185a. familia 133. Rutaceae. 1b - 2b - 5a - 6a. 2. *Euodia*. 1a - 2a - 3a -
4b - 6a - 7b. *Euodia suaveolens* Scheff.

Deskripsi :

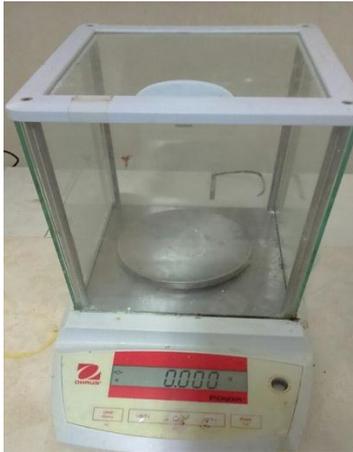
Habitus : Perdu menahun, tumbuh tegak, tinggi dapat mencapai 2 meter.
Batang : Bulat, berwarna coklat, pada permukaan tampak tonjolan bekas menempelnya daun.
Daun : Tunggal, berhadapan, bentuk memanjang sampai lanset, ujung runcing, pangkal runcing, panjang 11,2 - 17,8 cm, lebar 1,1 - 2,1 cm, tulang daun menyirip, permukaan licin, berwarna hijau muda kekuningan, bau "wangi" spesifik.
Bunga : Majemuk malai, muncul di ujung batang dan ketiak daun, sepala 4, petala 4, mula-mula berwarna putih kekuningan, kemudian berubah menjadi berwarna hijau, benang sari 4.
Buah : Bentuk bulat telur, waktu muda hijau, setelah masak berwarna coklat, biji kecil, umamnya tiap buah terdapat 1 biji.
Akar : Tunggang, berwarna coklat.
Pustaka : Becker C.A. & Brink R.C.B. (1965). *Flora of Java* (Spermatophytes only). N.V.P. Noordhoff - Groningen - The Netherlands

Surakarta, 23 Maret 2017

UPT determinasi

Dra. Kartinah Wirjosenojo, SU.

Lampiran 5. Alat**Gambar 15 Gelas ukur****Gambar 16 Autoklaf****Gambar 17 Batang pengaduk****Gambar 18 Gelas Beaker****Gambar 19 Mortir dan Stamfer****Gambar 20 Cawan porselin**



Gambar 21 Timbangan analitik



Gambar 22 Corong



Gambar 23 Wadah aquadest



Gambar 24 Botol kultur



Gambar 25 Erlenmeyer



Gambar 26 Labu ukur



Gambar 27 Sendok tanduk



Gambar 28 Cawan petri, pinset, skalpel



Gambar 29 Entkas

Lampiran 6. Gambar pertumbuhan kalus dan akar



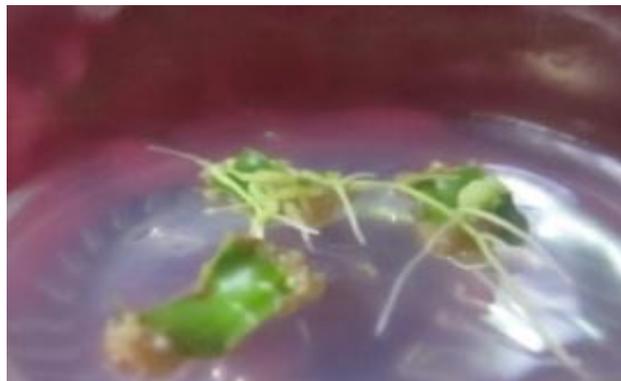
Gambar 30 Hasil penanaman eksplan



Gambar 31 Inkubasi eksplan pada media tumbuh



Gambar 32 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L pada ulangan 1



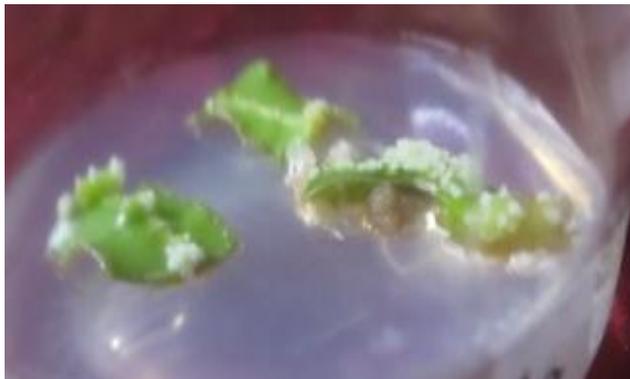
Gambar 33 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L pada ulangan 2



Gambar 34 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L pada ulangan 3



Gambar 35 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L pada ulangan 1



Gambar 36 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L pada ulangan 2



Gambar 37 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L pada ulangan 3



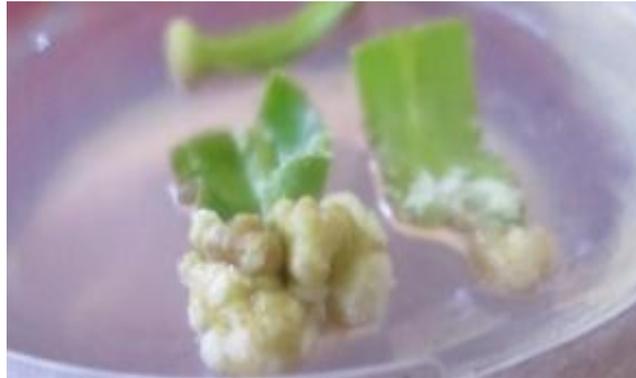
Gambar 38 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L pada ulangan 1



Gambar 39 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L pada ulangan 2



Gambar 40 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L pada ulangan 3



Gambar 41 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L pada ulangan 1



Gambar 42 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L pada ulangan 2



Gambar 43 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L pada ulangan 3



Gambar 44 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L pada ulangan 1



Gambar 45 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L pada ulangan 2



Gambar 46 Kalus dan akar pada media MS setengah kuat dengan zpt BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L pada ulangan 3.



Gambar 47 kontaminasi eksplan secara internal



Gambar 48 *Browning* pada eksplan



Gambar 49 kontaminasi oleh bakteri udara

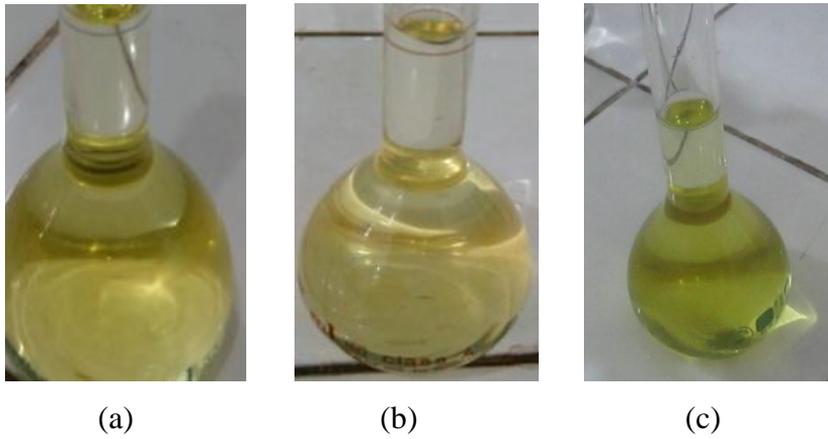
Lampiran 7. Gambar hasil ekstraksi



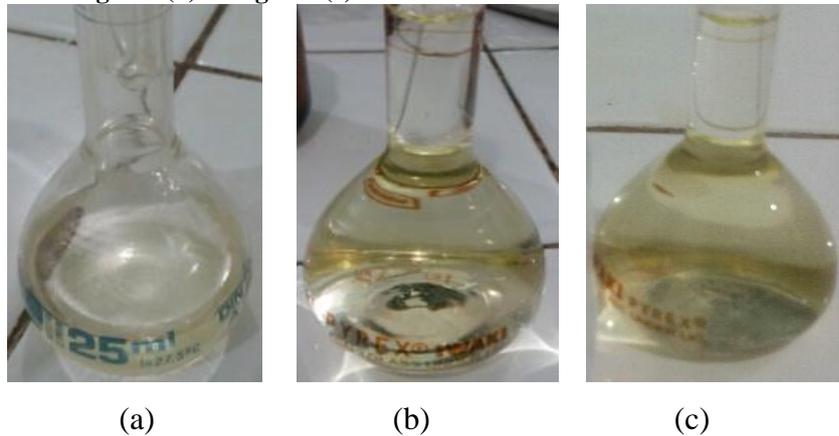
Gambar 50 hasil ekstraksi daun Zodia tua



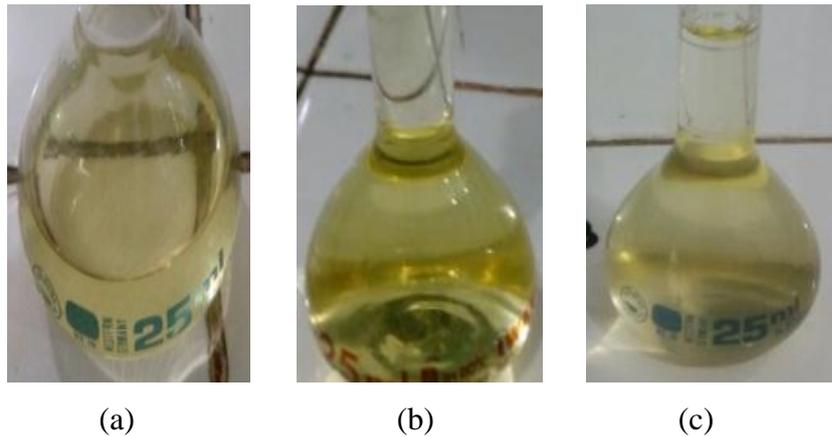
Gambar 51 hasil ekstraksi daun Zodia muda



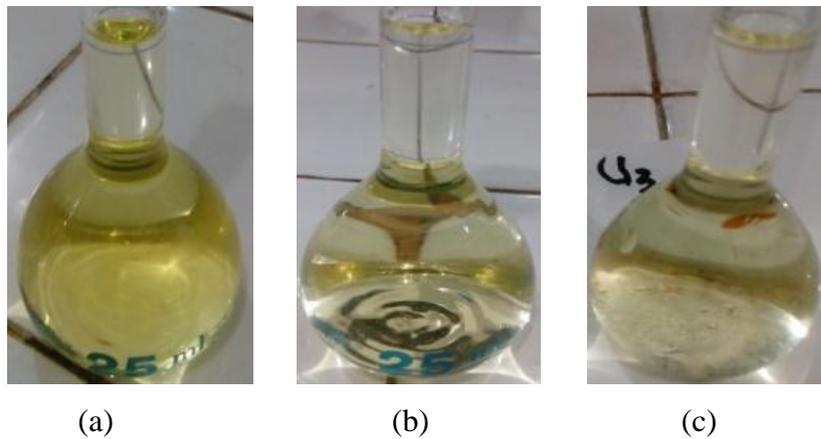
Gambar 52 hasil ekstraksi kalus dan akar pada BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L ulangan 1 (a) ulangan 2 (b) ulangan 3 (c)



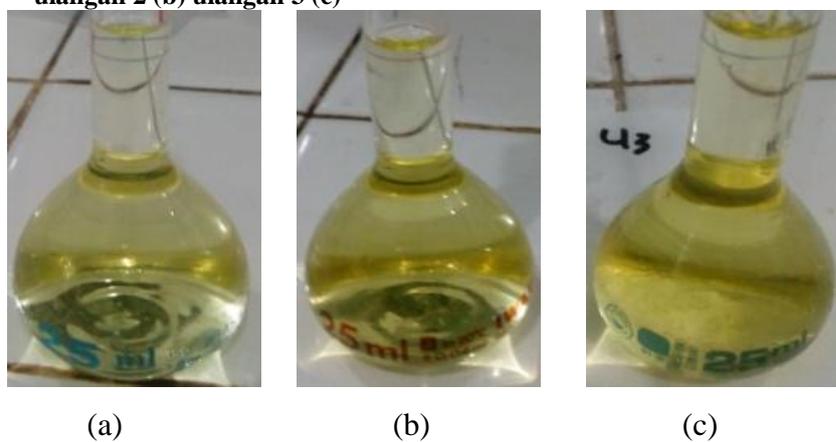
Gambar 53 hasil ekstraksi kalus dan akar pada BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L ulangan 1 (a) ulangan 2 (b) ulangan 3 (c)



Gambar 54 hasil ekstraksi kalus dan akar pada BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L ulangan 1 (a)
ulangan 2 (b) ulangan 3 (c)



Gambar 55 hasil ekstraksi kalus dan akar pada BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L ulangan 1 (a)
ulangan 2 (b) ulangan 3 (c)



Gambar 56 hasil ekstraksi kalus dan akar pada BAP 2 mG/L NAA 0 mG/L ulangan 1 (a)
ulangan 2 (b) ulangan 3 (c)

Lampiran 8. Gambar hasil penimbangan kalus dan akar



Gambar 57 Hasil penimbangan daun Zodia muda



Gambar 58 Hasil penimbangan daun Zodia tua



(a)



(b)



(c)

Gambar 59 hasil penimbangan kalus dan akar pada BAP 0 mG/L NAA 2 mG/L ulangan 1 (a) ulangan 2 (b) ulangan 3 (c)



(a)



(b)



(c)

Gambar 60 hasil penimbangan kalus dan akar pada BAP 0,5 mG/L NAA 1,5 mG/L ulangan 1 (a) ulangan 2 (b) ulangan 3 (c)



(a)



(b)



(c)

Gambar 61 Hasil penimbangan kalus dan akar pada BAP 1 mG/L NAA 1 mG/L ulangan 1 (a) ulangan 2 (b) ulangan 3 (c)



(a)



(b)



(c)

Gambar 62 Hasil penimbangan kalus dan akar pada BAP 1,5 mG/L NAA 0,5 mG/L ulangan 1 (a) ulangan 2 (b) ulangan 3 (c)



(a)



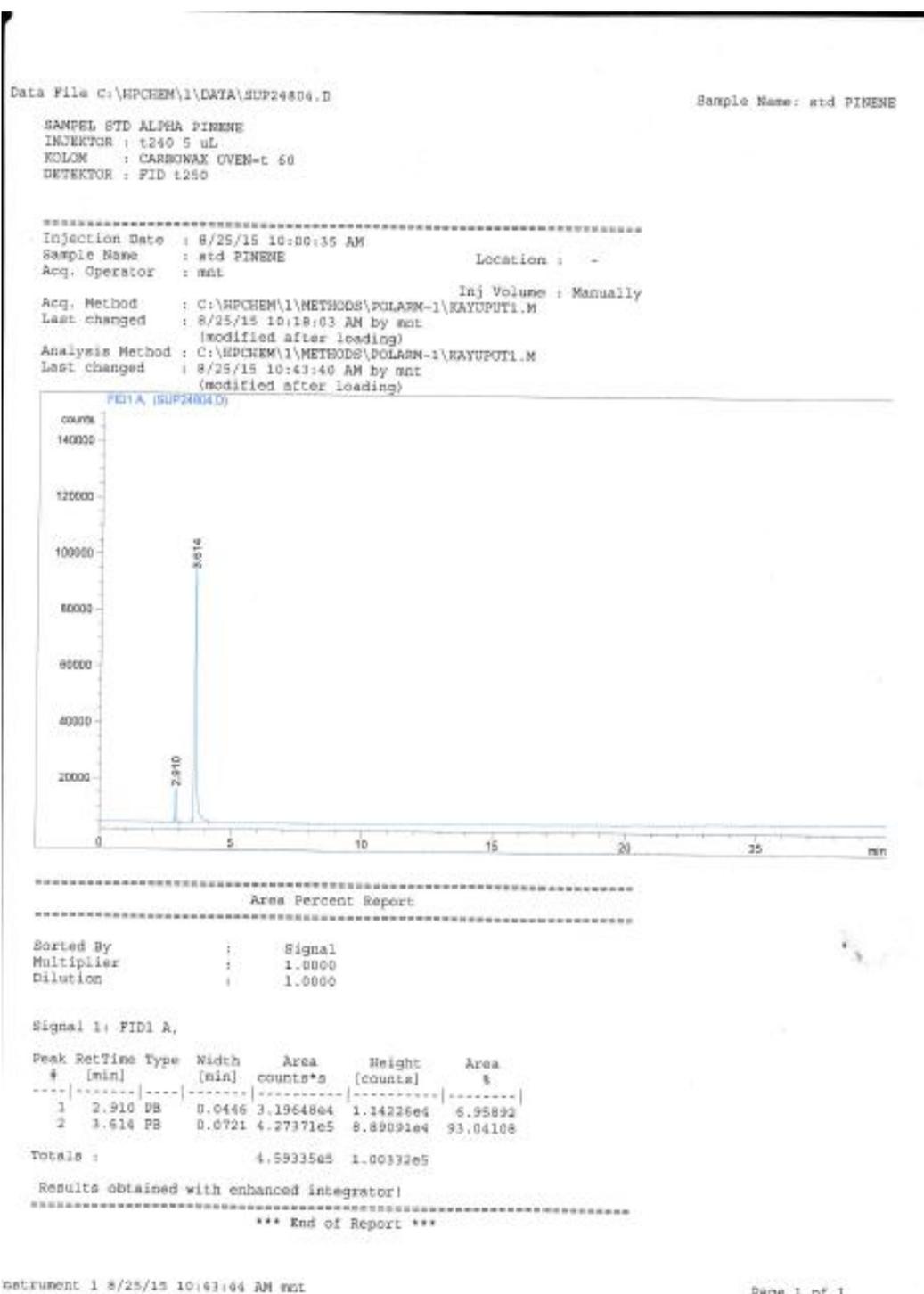
(b)



(c)

Gambar 63 Hasil pimbangan kalus dan akar pada BAP 2 mg/L NAA 0 mg/L ulangan 1 (a) ulangan 2 (b) ulangan 3 (c)

Lampiran 9. Hasil Kromatogram



Gambar 64 Kromatogram Standar α -pinene

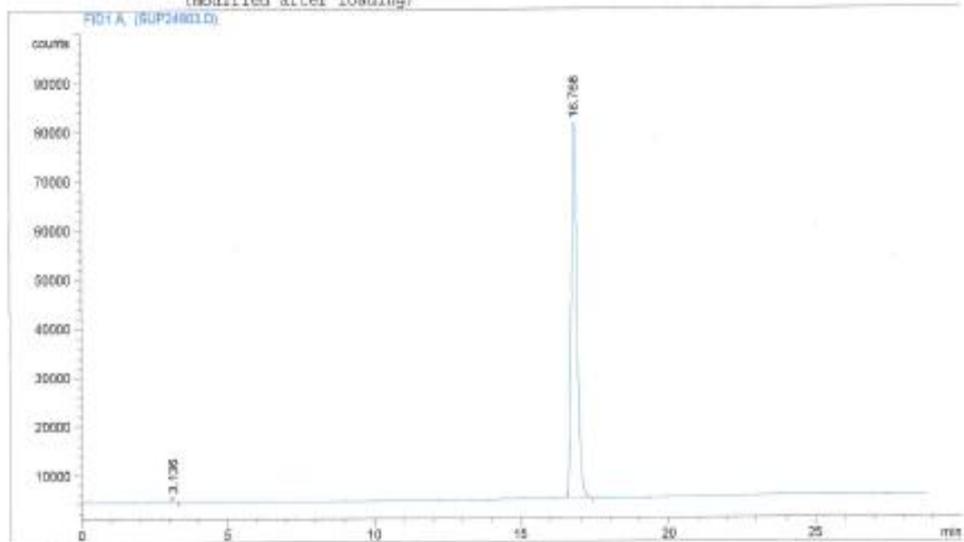
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SUP24803.D

Sample Name: std LINALOOL

SAMPLE STD LINALOOL
 INJEKTOR : t240 5 uL
 KOLOM : CARBONAK OVEN-t 60
 DETEKTOR : FID t250

```

=====
Injection Date : 8/25/15 9:28:55 AM
Sample Name : std LINALOOL Location : -
Acq. Operator : nnt Inj Volume : Manually
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\POLARM-1\KAYUPUTI.M
Last changed : 8/25/15 9:54:14 AM by nnt
(modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\POLARM-1\KAYUPUTI.M
Last changed : 8/25/15 9:56:54 AM by nnt
(modified after loading)
  
```



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
  
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	3.136	SB	0.0688	4067.99243	899.33624	0.38814
2	16.768	SB	0.2072	1.04401e6	7.65274e4	99.61186

```
Totals :                      1.04808e6  7.74267e4
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
  
```

Instrument 1 8/25/15 9:56:58 AM nnt

Page 1 of 1

Gambar 65 Kromatogram standar Linalool

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SUP24806.D

Sample Name: LIN-PIN-7-345

SAMPLE LINALOOL PINENE 7-345
 INJECTOR : 1240 2 uL
 KOLON : CARBOMAX OVEN: 60
 DETECTOR : FID 1250

=====
 Injection Date : 8/25/15 11:26:06 AM
 Sample Name : LIN-PIN-7-345 Location : -
 Acq. Operator : mnt Inj Volume : Manually
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\POLARM-1\KAYUPUTI.M
 Last changed : 8/25/15 11:20:41 AM by mnt
 (modified after loading)



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [counts*s]	Height [counts]	Area %
1	2.922	DB	0.0443	1158.18774	418.03739	0.03984
2	3.156	BV	0.0632	2.31834e6	5.73020e5	79.35351
3	3.306	VB	0.0751	6.02037e5	1.18917e5	20.60685

Totals : 2.82154e6 6.92355e5

Results obtained with enhanced integrator!

=====
 *** End of Report ***

Gambar 66 Kromatogram pembanding daun tua

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\SUP24805.D

Sample Name: D-MUDA

SAMPEL D MUDA
 INJECTOR : t240 5 uL
 COLUMN : CARBOMAX OVEN: 60
 DETECTOR : FID L250

```

=====
Injection Date : 8/25/15 10:46:50 AM
Sample Name : D-MUDA
Acq. Operator : nnt
Location :
Inj Volume : Manually
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\POLARM-1\KAYUPOT1.M
Last changed : 8/25/15 10:43:40 AM by nnt
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\POLARM-1\KAYUPOT1.M
Last changed : 8/25/15 11:20:41 AM by nnt
                (modified after loading)
=====
  
```



```

=====
Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [counts*s]	Height [counts]	Area %
1	2.920	DV	0.0390	1.99646e4	7510.38037	0.60027
2	3.156	VV	0.0637	2.58303e6	6.31424e5	77.66178
3	3.308	VB	0.0702	7.22918e8	1.44796e5	21.73595

```
Totals :                3.32591e6  7.63730e5
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***
  
```

Instrument 1 8/25/15 11:20:44 AM nnt

Page 1 of 1

Gambar 67 Kromatogram pembanding daun muda

ata File C:\HPCHEM\1\DATA\SUP24810.D

Sample Name: NB0,5 II

SAMPEL N B0,5 II
 INJEKTOR : t240 2 ul
 SOLUSI : CARBOMAX OVEN-t 60
 DETEKTOR : FID t250

=====
 Injection Date : 8/25/15 3:24:34 PM
 Sample Name : NB0,5 II Location : -
 Acq. Operator : nnt Inj Volume : Manually
 Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\POLARM-1\KAYUSUTI.M
 Last changed : 8/25/15 3:20:59 PM by nnt
 (modified after loading)



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: PID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [counts*s]	Height [count/s]	Area %
1	3.155	BV	0.0620	7.73799e5	1.96244e5	77.34228
2	3.301	VB	0.0746	2.26688e5	4.50993e4	22.55772

Totals : 1.00049e6 2.41343e5

Results obtained with enhanced integrator!

=====
 *** End of Report ***

natrunent 1 8/25/15 3:54:53 PM nnt

Page 1 of 1

Gambar 68 Kromatogram BAP 0,5 mg/L NAA 1,5 mg/L ulangan II

