

PERBANYAKAN TANAMAN
GEMBILI (*Dioscorea esculenta*
L.) AKSESI ASAL PAPUA BARAT
MELALUI INDUKSI KALUS
SECARA IN-VITRO SEBAGAI
SUMBER BAHAN PANGAN
ALTERNATIF

by Fifit Yuniardi

Submission date: 15-Nov-2023 02:29PM (UTC+0700)

Submission ID: 2228826474

File name: 5.FullteksThesis_Fifit_Yuniardi_207021005.pdf (2.23M)

Word count: 13960

Character count: 84804

**PERBANYAKAN TANAMAN GEMBILI (*Dioscorea esculenta* L.)
AKSESI ASAL PAPUA BARAT MELALUI INDUKSI KALUS
SECARA *IN-VITRO* SEBAGAI SUMBER BAHAN PANGAN
ALTERNATIF**

Oleh

**FIFIT YUNIARDI
207021005**



**PROGRAM PASCASARJANA
POLITEKNIK NEGERI LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

**PERBANYAKAN TANAMAN GEMBILI (*Dioscorea esculenta* L.)
AKSESI ASAL PAPUA BARAT MELALUI INDUKSI KALUS
SECARA *IN-VITRO* SEBAGAI SUMBER BAHAN PANGAN
ALTERNATIF**

Oleh

**FIFIT YUNIARDI
207021005**

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Sebutan
Magister Terapan Pertanian (M.Tr.P)
pada Program Studi Ketahanan Pangan
Program Pascasarjana Politeknik Negeri Lampung



**PROGRAM PASCASARJANA
POLITEKNIK NEGERI LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Tesis : Perbanyak Tanaman Gembili (*Dioscorea esculenta* L.) Akses Asal Papua Barat Melalui Induksi Kalus Secara *In-Vitro* Sebagai Sumber Bahan Pangan Alternatif

Nama Mahasiswa : Fifit Yuniardi¹

Nomor Pokok Mahasiswa : 207021005

Program Studi : Ketahanan Pangan

Menyetujui

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Ratna Dewi, M.P
NIP.196610141992022001

Anung Wahyudi, S.P., M.Sc., Ph.D
NIP.198109112012121001

Ketua Program Pascasarjana
Politeknik Negeri Lampung

Dr. Irmayani Noer, S.P., M.Si
NIP.19700121994022001

Tanggal Ujian : 11 Oktober 2023

**PERBANYAKAN TANAMAN GEMBILI (*Dioscorea esculenta* L.)
AKSESI ASAL PAPUA BARAT MELALUI INDUKSI KALUS
SECARA *IN-VITRO* SEBAGAI SUMBER BAHAN PANGAN
ALTERNATIF**

Oleh

FIFIT YUNIARDI

RINGKASAN

Diversifikasi pangan umbi-umbian diharapkan dapat membantu ketahanan pangan dan meningkatkan kesehatan masyarakat. Gembili adalah tumbuhan yang mengandung karbohidrat yaitu glukomanan dengan serat yang tinggi yang akan menjaga rasa kenyang. Kandungan glukomanan dapat menyatu dengan protein yang dapat mengurangi kolesterol didalam tubuh manusia. Kelangkaan benih gembili menyebabkan keberadaan tanaman gembili sangat jarang ditemui di masyarakat. Di wilayah Papua Barat, masyarakat setempat masih mengandalkan ketersediaan umbi gembili di hutan secara konvensional, hal ini di khawatirkan akan mengancam populasi tanaman gembili. Teknologi Kultur *in-vitro* sangat diperlukan dalam memperbanyak benih gembili secara cepat dan tanpa mengenal musim, dengan menanam kalus maka perbanyak tanaman tidak memerlukan eksplan yang banyak untuk menghasilkan benih dalam jumlah banyak. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Politeknik Negeri Lampung, dari bulan Mei sampai Juli 2022. Metode penelitian yang dilakukan adalah pemakaian zat pengatur tumbuh 2,4 D, BAP, serta kombinasi keduanya dengan asal sumber eksplan ruas (nodus) dan daun. Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan 16 kombinasi perlakuan, Masing - masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Pengamatan dilakukan terhadap peubah kualitatif (warna daun muda, bentuk daun, bentuk puncak daun dan jarak antar lobus, warna kalus dalam botol, tekstur dan warna kalus) dan kuantitatif (kecepatan tumbuh kalus, diameter kalus dan berat kalus). Data pengamatan kuantitatif dianalisis dengan menggunakan sidik ragam (ANOVA) dan uji lanjut BNT pada taraf kepercayaan 95%. Hasil dari peubah penelitian yang telah dilakukan bahwasanya komposisi media 2,4-D 2 ml.l⁻¹ dan 1 ml.l⁻¹ tanpa penambahan BAP menghasilkan nilai perlakuan terbaik bila dibandingkan media dengan perlakuan kombinasi 2,4-D + BAP. Komposisi media dengan penambahan 2,4-D 2 ml.l⁻¹ menghasilkan rata-rata hari tumbuh 2 tunas 8.00, namun dalam pertumbuhan kalus media kultur dengan penambahan 2,4-D 1 ml.l⁻¹ menghasilkan nilai yang terbaik yaitu 1.73 cm untuk diameter kalus dan nilai 0.22 untuk berat kalus. sedangkan regenerasi kalus hanya terjadi pada sumber eksplan ruas batang tanaman saja, sedangkan untuk sumber eksplan dari daun penambahan 2,4-D dan BAP tidak dapat merangsang dalam pembentukan dan pertumbuhan kalus.

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa:

1. Karya tulis saya, tesis ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (sarjana, magister, dan atau doktor), baik di Polinela maupun diperguruan tinggi lain.
2. Karya tulis ini adalah murni gagasan dan penelitian saya sendiri dengan arahan komisi pembimbing.
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila di kemudian hari terdapat ketidak benaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya ini, serta sanksi lainnya sesuai dengan kode etik yang berlaku di Polinela.

Bandar Lampung, November 2023
Yang membuat pernyataan

Materai Rp.10.000

Fifit Yuniardi
NPM 207021005

HALAMAN PERSEMBAHAN

Kupersembahkan karya tulis ini kepada:

1. Kedua orang tua bapak Sumardi, S.Pd dan ibu Siti Rokhana, S.Pd, Kedua mertuaku bapak Darsono dan Ibu Rodiah, Istriku Damayanti Fitri Lestari, A.Md, dan kedua putraku Muhammad Raihan Al Kahfi, Alviandra Ramadhan Al Fatih yang tercinta.
2. Guru-guruku sejak sekolah dasar sampai perguruan tinggi.
3. Progam studi DIII Hortikultura Politeknik Negeri Lampung dimana awal perjalanan menjalani perkuliahan.
4. Almamater Sekolah Tinggi Ilmu Pertanian Dharma Wacana Metro.
5. Almamater Program Pascasarjana Magister Terapan Politeknik Negeri Lampung.
6. Kawan-kawan seperjuangan Program Studi Magister Terapan Politeknik Negeri Lampung angkatan 1.

MOTTO

Dan mintalah pertolongan dengan sabar dan sholat.
(Q.S Al Baqarah: 45)

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan
kesanggupannya.
(Q.S Al Baqarah: 286)

Dan janganlah kamu merasa lemah dan janganlah pula bersedih hati,
sebab kamulah yang paling tinggi derajatnya jika kamu orang-orang
yang beriman.
(QS. Ali Imran: 139)

Cukuplah Allah menjadi penolong kami dan Allah adalah sebaik-baik
pelindung.
(Q.S Ali Imran: 173)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan atas ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat, Hidayah dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul Perbanyakkan Tanaman Gembili (*Dioscorea Esculenta L.*) Aksesi Asal Papua Barat Melalui Induksi Kalus Secara *In-Vitro* Sebagai Sumber Bahan Pangan Alternatif. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Ir. Ratna Dewi, M.P., selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan dan motivasi kepada penulis dalam proses penyusunan tesis.
2. Bapak Anung Wahyudi, S.P., M.Sc., Ph.D., selaku pembimbing II yang telah memberikan pengarahan dan motivasi kepada penulis dalam proses penyusunan tesis.
3. Ibu Dr. Ir. Ni Siluh Putu Nuryanti, M.P. selaku dosen pembahas yang telah memberikan masukan dalam penyempurnaan tesis.
4. Seluruh dosen Program Studi Ketahanan Pangan yang telah memberikan ilmu dan bimbingan yang sangat berarti.
5. Bapak Arif dari BPTP Papua Barat yang telah meluangkan waktu dan tenaganya membantu dan mencari umbi gembili untuk penelitian ini.
6. Semua teman-teman Program Studi Ketahanan Pangan angkatan 2020 yang telah memberi dukungan serta semangat.

Semoga hasil penelitian ini dapat berkontribusi bagi pengembangan kebijakan ketahanan pangan di masa yang akan datang.

Bandar Lampung, November 2023

Fifit Yuniardi

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR.....	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Kerangka Pemikiran	4
1.4. Hipotesis.....	5
1.5. Manfaat Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Diversifikasi Pangan	6
2.2. Klasifikasi Tanaman Gembili.....	8
2.3. Morfologi Tanaman Gembili.....	9
2.3.1. Akar.....	9
2.3.2. Batang	9
2.3.3. Daun	9
2.3.4. Umbi	10
2.4. Glukomanan	10
2.5. Permasalahan Budidaya Gembili.....	11
2.6. Teknik Perbanyakan Tanaman Secara Kultur In Vitro.....	12
2.7. Media Kultur	13
2.8. Zat Pengatur Tumbuh	13
2.9. Pembentukan Kalus	14
III. BAHAN DAN METODE.....	17
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.2. Bahan dan Alat	17
3.3. Metode Penelitian	18
3.4. Pelaksanaan Penelitian	19
3.4.1. Sterilisasi alat.....	19
3.4.2. Pembuatan larutan stock	19
3.4.3. Aplikasi perlakuan	20
3.4.4. Media kultur dan sterilisasinya.....	21
3.4.5. Persiapan eksplan dan penanaman.....	22
3.4.6. Pemeliharaan	23
3.4.7. Pengamatan	23

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1. Karakter Kualitatif Warna Daun	28
4.2. Karakter Kualitatif Bentuk Daun	28
4.3. Karakter Kualitatif Bentuk Puncak Daun dan Jarak Antar Lobus	29
4.4. Karakter Kualitatif Warna Kalus	29
4.5. Karakter Kualitatif Tekstur Kalus	32
4.1. Pengamatan Kuantitatif Kecepatan Tumbuh Kalus (Hari)	33
4.2. Pengamatan Kuantitatif Diameter Kalus	38
4.3. Pengamatan Kuantitatif Berat Kalus	41
V. KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1. Kesimpulan	43
5.2. Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	48

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbandingan hasil uji proksimat umbi gembili aksesi papua barat dengan beberapa sumber	7
2. Formulasi media MS (murashige dan skoog, 1962) yang dibuat stok	20
3. Warna kalus eksplan gembili aseksi Papua Barat pada berbagai asal eksplan serta konsentrasi bap dan 2,4-d secara in vitro	31
4. Hasil visual tekstur dan warna kalus dalam berbagai komposisi media kultur	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman dan umbi gembili	9
2. Bagan alir pembuatan media	21
3. Gambar bentuk daun dioscera	24
4. Bentuk pucuk daun dioscera	24
5. Bentuk jarak antar lobus daun dioscera	25
6. Karakteristik warna daun gembili	27
7. Morfologi daun gembili (a) bentuk daun tanaman gembili, (b) duri terletak diawah ruas tangkai daun tanaman gembili aksesori Papua Barat	28
8. Penampakan bentuk muka daun (a) bentuk puncak daun, (b) bentuk lobus daun, (c) bentuk daun utuh tanaman gembili aksesori Papua Barat	29
9. Warna kalus pada media kultur	30
10. Penampakan tekstur kalus pada media	32
11. Pertumbuhan kalus dan tunas pada berbagai media dengan bahan eksplan nodus	34
12. Penampakan eksplan daun pada berbagai media perlakuan	36
13. Histogram hasil pertumbuhan kalus dalam berbagai komposisi media kultur	37
14. Histogram hasil pengukuran diameter kalus tanaman gembili aksesori Papua Barat dalam berbagai komposisi media kultur	39
15. Penampakan diameter kalus yang tumbuh pada perlakuan media kultur dengan penambahan zpt	40
16. Histogram hasil pengamatan berat kalus tanaman gembili aksesori Papua Barat dalam berbagai komposisi media kultur	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Tabel analisis variansi untuk hari tumbuh kalus.....	49
2. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari hari kalus untuk kelompok	49
3. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari hari kalus untuk perlakuan	49
4. Tabel analisis variansi untuk diameter kalus	50
5. Tabel analisis variansi untuk diameter kalus transfor sqrt+0,5	50
6. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari diameter kalus kelompok	50
7. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari diameter kalus perlakuan	50
8. Tabel analisis variansi untuk berat kalus.....	51
9. Tabel analisis variansi untuk berat kalus data sudah di transformasi sqrt +0.5.....	51
10. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari berat kalus kelompok	51
11. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari berat kalus perlakuan	51
12. Foto tanaman gambili aksesori Papua Barat.....	52

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Kontribusi jenis **tanaman** umbi-umbian sebagai sumber pangan alternatif dalam pemenuhan kebutuhan pangan berkualitas dapat memberikan pengaruh signifikan terhadap ketahanan pangan, dan merupakan bahan pangan yang aman untuk dikonsumsi oleh masyarakat yang menderita diabetes dan mengurangi kasus obesitas. Diversifikasi pangan di Indonesia sangat terbatas padahal diversifikasi pangan dapat digunakan sebagai acuan dalam menentukan mutu pangan. Diversifikasi konsumsi pangan pokok tidak dimaksudkan untuk mengganti beras secara keseluruhan atau total, namun mengubah pola konsumsi masyarakat sehingga masyarakat akan lebih banyak mengkonsumsi lebih banyak jenis pangan dan lebih baik gizinya. Dengan demikian bahan pangan akan lebih beragam, bergizi dan berimbang. Sehingga diversifikasi pangan dengan umbi-umbian diharapkan dapat membantu ketahanan pangan dan meningkatkan kesehatan di masyarakat.

Salah satu jenis umbi yang dapat digunakan dalam diversifikasi pangan adalah ubi gembili. Sudah lama masyarakat Papua membudidayakan umbi gembili mesti tidak secara masal. Umbi gembili biasanya dikonsumsi dengan cara direbus. Gembili dianggap sebagai tumbuhan yang berpotensi besar dimasa depan karena kandungan karbohidrat didalam ubi gembili yaitu glukomanan dapat membantu dalam program diet. Glukomanan merupakan serat yang tinggi sehingga akan menjaga rasa kenyang, kandungan glukomanan dapat menyatu dengan protein yang dapat mengurangi kolesterol didalam tubuh manusia. Bibit gembili yang mulai langka menyebabkan keberadaan tanaman gembili sangat jarang ditemui dimasyarakat, di wilayah papua barat sendiri masyarakat setempat masih mengandalkan ketersediaan umbi gembili dari alam, mereka terbiasanya menanam umbi gembili di hutan tanpa adanya budidaya yang baik. Dengan demikian dikawatirkan umbi gembili mulai terancam keberadaannya. Oleh karena itu diperlukan teknologi dalam teknik perbanyakan yang dapat

memperbanyak bibit gambeli dengan singkat tanpa membutuhkan asal bibit dalam jumlah banyak.

Penyediaan bibit gambeli selama ini oleh masyarakat ditempuh secara konvensional dengan menggunakan umbi. Namun, cara tersebut membutuhkan waktu yang lebih lama untuk menghasilkan bibit dalam jumlah yang banyak. Disamping itu perbanyakn secara konvensional terdapat banyak kendala dimulai dari musim yang tidak menentu hingga serangan hama dan penyakit tanaman yang dapat menurunkan kualitas maupun kuantitas tanaman gambeli. Dengan demikian pemanfaatan bioteknologi diharapkan dapat membantu dalam memperbanyak tanaman gambeli secara masal dan cepat, di antaranya melalui pemanfaatan teknik kultur *in-vitro*. Kultur *in-vitro* dapat dimanfaatkan untuk tujuan memperbanyak klon unggul maupun perbaikan sifat tanaman melalui *in-vitro* mutagenesis dan seleksi *in-vitro*. Teknik kultur jaringan juga diperlukan dalam transformasi genetik untuk meregenerasikan sel tanaman yang telah ditransformasi.

Metode induksi kalus dan regenerasi gambeli yang efisien melalui kultur *in-vitro* sangat diperlukan dengan keterbatasan sumber eksplan yang tersedia. Induksi kalus merupakan tahap awal dari teknik kultur *in-vitro* yang bertujuan untuk menghasilkan dan memperbanyak sel kalus secara masal. Kalus merupakan sumber bahan tanam yang sangat penting dalam meregenerasi tanaman karena setiap sel tanaman memiliki kemampuan membentuk individu baru. Oleh karena itu, upaya induksi kalus yang efisien merupakan tahap penting dalam rangka mendapatkan bibit gambeli yang cepat dalam jumlah banyak. Strategi kultur jaringan melalui induksi kalus sangat efektif karena kalus dapat diinisiasi dari bagian tanaman manapun seperti daun dan batang tanaman. kegiatan kultur melalui proses pembentukan kalus merupakan satu teknik yang digunakan untuk menghasilkan bibit tanaman bebas penyakit dan virus, karena kalus akan membelah terus menerus. Manfaat kultur kalus lainnya adalah untuk dimanfaatkan dalam mempelajari metabolisme dan diferensiasi sel, morfogenesis sel, variasi somaklonal, transformasi genetik serta produksi metabolit sekunder yang banyak digunakan oleh negara-negara maju dalam bidang industri kosmetik dan obat-obatan.

Dalam kegiatan kultur *in-vitro* pengetahuan media kultur *in-vitro* amat penting karena merupakan jalan pembuka untuk suksesnya tahap pelaksanaan kultur *in-vitro*. Media kultur *in-vitro* ini komponen utamanya adalah unsur hara makro, mikro ditambah dengan gula sebagai pengganti unsur karbon yang didapat dari hasil fotosintesis. Perkembangan selanjutnya adalah penambahan vitamin-vitamin, asam-asam amino, bahan-bahan organik yang ternyata memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan komposisi yang terdiri dari unsur hara makro mikro saja (Sandra dkk., 2016).

Selain unsur hara, zat pengatur tumbuh (ZPT) sangat diperlukan dalam mencapai tujuan pertumbuhan yang diinginkan secara *in-vitro*. Dalam kultur kalus, dua ZPT yang sering digunakan untuk perangsang perbanyakan kalus yaitu sitokinin dan auksin. Jenis dan konsentrasi dari masing-masing ZPT tergantung pada tujuan dan tahap pengkultur. ZPT yang umumnya digunakan adalah dari golongan sitokinin derivat adenine, seperti benziladenin (BA) atau benzylaminopurine, furfurylaminopurine (kinetin) dan isopentenyladenine (2-iP). Sedangkan dari golongan auksin, seperti 2,4-D (2,4 Diclorophenoxyacetic acid).

Berdasarkan penjelasan pendahuluan diatas dapat dikemukakan masalah yang ingin disampaikan yaitu:

1. Mengenalkan salah satu komoditas diversifikasi pangan kepada masyarakat khususnya komoditas umbi.
2. Penggunaan teknologi dalam pertanian untuk menghasilkan bibit dalam jumlah banyak dengan waktu yang singkat serta bahan yang terbatas.
3. Aplikasi zat pengatur tumbuh terhadap media kultur untuk menentukan jenis dan dosis yang tepat dalam perbanyakan tanaman secara *in-vitro* dengan sumber eksplan bagian tanaman yang berbeda.

1.2. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis :

1. Pengaruh 2,4-D terhadap daya pembentukan kalus umbi gembili asal bagian tanaman yang berbeda secara *in-vitro*.
2. Pengaruh penambahan BAP terhadap pembentukan kalus gembili asal bagian tanaman yang berbeda secara *in-vitro*.

3. Pengaruh interaksi BAP dan 2,4-D terhadap daya pembentukan kalus umbi gembili asal bagian tanaman yang berbeda secara *in-vitro*

1.3. Kerangka Pemikiran

Keanekaragaman jenis ubi-ubian seperti gembili harus dipertahankan agar tidak punah ketersediaannya di alam. Dalam program diversifikasi tanaman, umbi-umbian merupakan salah bahan pokok yang dapat digunakan apakah untuk bahan substitusi, seperti tepung umbi, pati dan tepung komposit. Sehingga ragam bahan pangan masyarakat lebih beragam dan berimbang. Teknik kultur *in-vitro* dapat digunakan untuk mengkonservasi plasma nutfah umbi-umbian karena spesies ini sulit dikonservasi dalam bentuk biji. Masih banyak peluang penelitian dan pengujian untuk memperoleh metode konservasi *in-vitro* yang tepat bagi masing-masing jenis varietas.

² Konservasi *in-vitro* merupakan alternatif metode konservasi yang dapat meminimalisir kendala konservasi *in-vivo*. Pada konservasi *in-vitro*, materi genetik ditanam di dalam botol dan disimpan dalam tempat yang terkontrol sehingga hanya memerlukan ruangan yang lebih sempit untuk menyimpan materi genetik dalam jumlah yang besar. Konservasi *in-vitro* juga mengurangi kehilangan atau matinya materi genetik akibat serangan hama dan penyakit karena ditanam pada media aseptik dalam botol (Budiarto dkk., 2020).

¹ Komposisi media dan ZPT untuk masing-masing spesies, antar klon, atau varietas dalam satu spesies sering berbeda satu dengan lainnya. Sitokinin merupakan ZPT yang mendorong pembelahan (sitokinesis). Beberapa macam sitokinin merupakan sitokinin alami (misal : kinetin, zeatin) dan beberapa lainnya merupakan sitokinin sintetik. ² Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan pertumbuhan kalus adalah dengan menambahkan zat pengatur tumbuh ke dalam media. Ada dua jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam kultur *in-vitro*, yaitu sitokinin dan auksin. Penggunaan auksin bersama dengan sitokinin memungkinkan untuk menentukan jenis morfogenesis yang diinginkan (Handayani dkk., 2019).

Menurut Edi shandra (2016) dalam buku pelatihan kultur jaringan esha flora menyebutkan bahwa kalus dapat dihasilkan dari potongan organ yang telah steril,

didalam media yang mengandung auksin dan terkadang juga sitokinin. Pemberian hormon dalam konsentrasi yang tinggi maka eksplan akan tumbuh menjadi kalus. Kalus dapat diinisiasi dari hampir semua bagian tanaman seperti embrio muda, hipokotil, kotiledon dan batang muda merupakan bagian yang mudah untuk dideferensiasi dan menghasilkan kalus.

1.4. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah :

1. Diduga ada pengaruh konsentrasi 2,4-D terhadap daya pertumbuhan kalus gembili dari asal eksplan yang berbeda secara *in-vitro*.
2. Diduga adanya pengaruh konsentrasi BAP terhadap daya pertumbuhan kalus gembili dari asal eksplan yang berbeda secara *in-vitro*.
3. Diduga adanya interaksi konsentrasi 2,4-D dan konsentrasi BAP terhadap daya pertumbuhan kalus gembili dari asal eksplan yang berbeda secara *in-vitro*.

1.5. Kontribusi

Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan sumbangsih terhadap ilmu pengetahuan salah satunya dapat dijadikan sebagai bahan referensi dalam penelitian-penelitian selanjutnya dan diharapkan akan ada penelitian selanjutnya dengan harapan bisa mendapatkan bibit tanaman yang banyak dan sehat, sehingga dapat diterapkan dalam budidaya di lapangan kelak.

Penelitiannya ini juga dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang kegiatan diversifikasi pangan pokok dengan bahan utama adalah umbi-umbian serta dapat merangsang masyarakat untuk membudidayakan dan mengkonsumsi umbi-umbian sebagai kegiatan diversifikasi pangan pokok sehingga tidak selalu tergantung dengan bahan pokok beras dan terigu.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Diversifikasi Pangan

Pangan adalah segala sesuatu yang berasal dari sumber hayati produk pertanian, perkebunan, kehutanan, perikanan, peternakan, perairan, dan air, baik yang diolah maupun tidak diolah yang diperuntukkan sebagai makanan atau minuman bagi konsumsi manusia, termasuk bahan tambahan Pangan, bahan baku Pangan, dan bahan lainnya yang digunakan dalam proses penyiapan, pengolahan, dan atau pembuatan makanan atau minuman (Undang-undang RI No 18 2012).

Dengan adanya program revolusi hijau pada tahun 1970-1980 menyebabkan masyarakat beralih dari bahan pangan lokal seperti umbi-umbian beralih ke bahan pangan pokok beras. Hal ini mengakibatkan pola konsumsi pangan pokok masyarakat di Indonesia telah bergeser dari pola beragam menjadi pola tunggal yaitu beras. ¹³ Pengertian pangan lokal dalam konteks nasional mengacu pada Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2012 tentang Pangan (UU Pangan), adalah makanan yang dikonsumsi oleh masyarakat setempat sesuai potensi dan kearifan lokal, yaitu sumber daya pangan dan budaya makan setempat. Disebut pangan lokal apabila diproduksi dengan mengoptimalkan sumber daya setempat dan dikonsumsi secara turun-temurun oleh masyarakat setempat, baik dalam bentuk pangan segar maupun yang telah diolah sesuai budaya dan kearifan lokal, dan menjadi makanan khas daerah setempat.

⁹ Seringkali pemerintah hanya menganjurkan masyarakat untuk melakukan keanekaragaman konsumsi pangan dan bersifat hanya menyuruh tanpa didukung oleh ketersediaan bahannya yang dapat diperoleh secara mudah. Peran beras sebagai pangan pokok semakin kuat, yang ditunjukkan oleh tingkat partisipasi yang cukup tinggi di berbagai wilayah termasuk pada wilayah yang sebelumnya mempunyai pola pangan pokok bukan beras. Bahkan di beberapa provinsi, terjadi pergeseran pangan pokok dari beragam cenderung pola tunggal yaitu beras. Di sisi lain, pangan lokal seperti jagung, ubi jalar dan ubi kayu semakin ditinggalkan masyarakat (Mulyaningsih, 2021).

Bahan yang digunakan dalam program diversifikasi pangan salah satu bahannya adalah umbi gembili, dimana dari dahulu sudah dikonsumsi oleh masyarakat pedesaan sebagai bahan pangan pokok sebelum tergerus oleh pola konsumsi masyarakat ke bahan pangan beras. Alasan mengapa umbi gembili dijadikan sebagai salah satu bahan untuk program diversifikasi pangan adalah karena kandungan karbohidrat umbi gembili sangat tinggi, namun umbi gembili diimbangi oleh kandungan glukomanan disetiap hasil umbinya.

Hasil analisis proksimat umbi gembili diseksi asal papua barat dan perbandingan dengan data sumber yang lain ini dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Kandungan	Data Kandungan Nasi dan Umbi Gembili			
	Nasi (Fat Secret Platform (API 2012))	Hasil proksimat Gembili Aksesori Papua Barat	Gembili menurut Sabda dkk (2019)	Gembili Menurut Direktorat Gizi Kementerian Kesehatan RI
Air (%)		76.0887	85.00	66.4
Abu (%)	14.00	0.5510	14.00	1.0
Lemak (%)	0.506	0.4191	0.20	0.2
Protein (%)	2.66	0.7613	1.10	1.1
Serat Kasar (%)	0.40	1.2557	1.00	
Karbohidrat (%)	27.90	22.1800	31.30	31.30

Tabel 1. Perbandingan Hasil Uji Proksimat Umbi Gembili Aksesori Papua Barat dengan beberapa Sumber

Kandungan lemak dalam kandungan ubi gembili sangat rendah hanya 0.4191, menurut Nisa dkk (2020) lemak merupakan zat makanan penting yang mengandung sumber energi lebih efektif dibanding dengan karbohidrat dan protein. Menurut BPOM, kandungan lemak pada produk pangan dikategorikan rendah apabila nilainya tidak melebihi 3%. Dalam mengonsumsi lemak tidak boleh berlebihan, karena mengonsumsi lemak secara berlebihan akan mengakibatkan berkurangnya konsumsi makanan lain, hal ini disebabkan karena lemak berada didalam sistem pencernaan relatif lebih lama dibandingkan dengan protein dan karbohidrat, sehingga lemak menimbulkan rasa kenyang yang lebih lama (Kemenkes RI, 2014).

Kadar protein juga sangat rendah yaitu hanya 0.7613 sedangkan menurut SNI 01-7111.1-2005 yaitu kadar protein yang baik berkisar antara 8 - 22%. Sedangkan kandungan utama adalah karbohidrat 22.1800 masih dibawah kandungan karbohidrat nasi sehingga cocok untuk dijadikan pangan sehat hal ini disebabkan mengkonsumsi bahan pangan dengan kandungan Karbohidrat yang rendah akan mencegah terjadinya kegemukan dan diabetes.

2.2. Klasifikasi Tanaman Gembili

Iklm tropis Indonesia sangat mendukung untuk tumbuh dan berkembangnya berbagai jenis umbi-umbian. Keanekaragaman umbi-umbian di Indonesia sangat banyak dan salah satunya adalah tanaman Gembili (*Dioscorea esculenta L.*).

Sistematika tumbuhan gembili (*Dioscorea esculenta L.*) berdasarkan taksonominya adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
Sub kingdom : *Tracheobionta*
Super Divisi : *Spermatophyta*
Divisi : *Magnoliophyta*
Class : *Liliopsida*
Ordo : *Dioscoreales*
Famili : *Diosoreaceae*
Genus : *Dioscorea*
Spesies : *Dioscorea esculenta L*
Namalokal : Gembili
(Tri UdjePudjianto, 2014)



Gambar. 1. Tanaman dan Umbi Gembili

(sumber : www.faanadanflora.com/panduan-lengkap-cara-sukses-budidaya-tanaman-gembili-bagi-pemula).

2.3. Morfologi Tanaman Gembili

2.3.1. Akar

Akar dari gembili memiliki duri tetapi tidak sebanyak duri yang berada di batang. Duri pada akar ini dapat mengurangi kemungkinan adanya kerusakan yang disebabkan oleh binatang penggali dan babi hutan. Duri pada akar tersebut merupakan serabut akar yang halus dan tajam (Pudjianto, 2014).

2.3.2. Batang

Merupakan tanaman berduri yang merambat keatas. Jarang ditemukan tanaman gembili dengan tinggi lebih dari 3 meter. Batang dari gembili sangat kecil dengan diameter sekitar 1-3 milimeter. Ketika batang merambat, batang tanaman gembili memelintir kearah kiri (Pudjianto, 2014).

2.3.3. Daun

Daun dari tanaman gembili menyerupai jantung namun lebih bulat. Daun gembili sedikit berkerut dan permukaannya agak berbulu. Daun gembili tumbuh tunggal berselang-seling. Panjang dari daun bisa mencapai 12 cm dan lebar 15 cm. Sama seperti batang tanaman gembili, batang daun gembili juga ditumbuhi dengan duri (Pudjianto, 2014).

2.3.4. Umbi

Umbi gembili berbentuk bulat atau lonjong dengan diameter 6-8 cm dan panjang hingga 20 cm. Tebal kulit umbi sekitar 0,04 cm. Berat umbi sekitar 100-200 gram. Biasanya gembili dengan ukuran yang kecil dijadikan sebagai bibit. Umbi gembili tumbuh dibawah tanam dengan kedalaman dangkal. Gembili memiliki bentuk seperti kentang namun lebih panjang dan lebar. Bentuk dari gembili sangat dipengaruhi oleh tanah atau batu-batu yang ada didalam tanah. Setiap tanaman gembili menghasilkan umbi gembili sekitar 4-20 buah.

Banyaknya jumlah gembili yang dihasilkan tergantung dari varietas gembili tersebut serta lingkungan sekitar tempat gembili ditanam. Kulit umbi gembili sangat halus dan tipis serta terdapat serabut akar tidak beraturan. Daging gembili memiliki warna bervariasi dari putih, kuning pucat, sampai kehitaman (Pudjianto, 2014).

2.4. Glukomanan

Glukomana merupakan senyawa karbohidrat yang memiliki karakteristik yang khas dari selulosa dan galaktomanan, sehingga sangat banyak dimanfaatkan pada berbagai industri seperti industri *edible film*, industri makanan, cat, kosmetik, obat-obatan, bahan perekat, dan dalam industri lainnya. Glukomanan adalah polisakarida yang dapat larut dalam air dan dianggap sebagai serat pangan. *Polisakarida* larut air merupakan serat pangan larut air yang didefinisikan sebagai komponen dalam tanaman yang tidak terdegradasi secara enzimatis menjadi sub unit-sub unit yang dapat diserap dilambung dan usus halus. *Polisakarida* biasa juga disebut hidrokoloid, dewasa ini banyak sekali dimanfaatkan dalam industri makanan, guna mencapai kualitas yang diharapkan, dalam hal viskositas, stabilitas, tekstur, dan penampilan (Sareu, 2021). *Polisakarida* larut air dari kelompok *Dioscorea* mengandung polisakarida utama glukomanan. Hasil dari uji prosimat yang telah dilakukan menunjukkan karbohidrat umbi gembili tinggi, begitu pula merujuk dari sumber yang lain bahwasanya kandungan karbohidrat umbi gembili sangat tinggi, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai tepung umbi, pati dan tepung komposit. Umbi gembili

memiliki potensi besar sebagai bahan makanan, menurut Herlina (2018) kandungan glukomanan pada umbi gembili sebesar 2,9%. Untuk industri makanan glukomanan terlebih dahulu diolah menjadi tepung sebagai bahan substitusi tepung terigu, namun banyak pula masyarakat yang mengkonsumsi umbi gembili secara langsung dengan cara di kukus maupun dibakar.

¹⁵ Sampai akhir tahun 1970 diyakini bahwa mencerna serat tertentu dapat memperbaiki toleransi glukosa pada orang normal dan pada penderita penyakit diabetes. Konsentrat kaya glukon dari *oat* atau produk *barley*, serta *Polisakarida* larut air dari *psyllium* menyebabkan perbaikan respon glikemik. Asupan tinggi serat direkomendasikan bagi penderita diabetes. Sifat *Polisakarida* larut air yang kental dan membentuk gel dapat menghambat penyerapan makronutrien dan menurunkan respon glukosa *postprandial* (Sareu, 2021).

2.5. Permasalahan Budidaya Gembili

⁵ Papua merupakan provinsi yang memiliki kekayaan sumber daya genetik yang sangat beragam, namun banyak dari sumberdaya itu belum diketahui manfaatnya. Kekayaan plasma nutfah lokal asli Papua harus mendapatkan perhatian agar tidak punah di kemudian hari. Erosi genetik yang terjadi terhadap plasma nutfah harus dikurangi dan dicegah oleh semua pihak dan perhatian yang serius terhadap varietas lokal tanaman harus terus dilakukan. Pengelolaan plasma nutfah yang optimal merupakan bagian kegiatan untuk menjaga sumber daya genetik agar tetap lestari, salah satunya dengan melakukan kegiatan konservasi dan karakterisasi (Sabda, 2019).

Permasalahan dalam budidaya gembili adalah tingkat pengetahuan masyarakat yang kurang mengenai tanaman gembili dan ketersediaan bibit yang belum mencukupi. Menurut Diantina dan Hutami (2014) salah satu penyebab rendahnya konsumsi umbi gembili adalah rendahnya tingkat produksi dan ketersediaannya di pasar. Hal ini disebabkan oleh masa panennya relatif lama dan tidak tersedianya benih atau bibit dalam jumlah besar untuk budidaya komersial, oleh karena itu perlu adanya sentuhan teknik yang dibarengi dengan teknologi dalam memperbanyak bibit gembili dan mengenalkannya kepada masyarakat. Banyak tanaman endemik yang mulai mengalami kepunahan, permasalahan

tersebut karena tingginya tingkat panen yang dilakukan oleh masyarakat, distribusi yang terbatas sampai rusaknya habibat tanaman endemik tersebut di alam (Sagharyan, 2020).

2.6. Teknik Perbanyak Tanaman Secara Kultur *In-Vitro*

Kultur *in-vitro* atau biasa dikenal kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh kembali. Perbanyak tanaman yang dilakukan secara *in-vitro* yaitu dengan menyediakan nutrisi unsur makro, mikro, vitamin, hormon akan menghasilkan tanaman baru yang mempunyai sifat-sifat keturunan yang sama dengan induknya, pada mulanya Teknik kultur *in-vitro* hanya pembuktian teori totipotensi sel bahwa setiap sel mampu berkembang biak. Kemudian Teknik kultur *in-vitro* berkembang menjadi sarana penelitian dibidang fisiologi tanaman dan aspek-aspek biokimia tanaman serta industri tanaman (Indarto, 2019).

Tujuan pokok penerapan perbanyak dengan Teknik kultur *in-vitro* adalah produksi tanaman dalam jumlah besar pada waktu singkat yang biasanya perbanyak sulit dan lambat bila dilakukan secara konvensional. Terutama untuk varietas-varietas unggul yang baru dihasilkan. Banyak metode dalam Teknik kultur *in-vitro*, selain untuk tujuan pokok yaitu juga untuk tujuan pemuliaan tanaman, menghasilkan jenis tanaman baru yang diinginkan, sehingga faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan sel pada metode kultur *in-vitro* diantaranya adalah sumber eksplan, media, hormone, zat pengatur tumbuh (ZPT) dan lingkungan fisik kultur *in-vitro* (Sandra, 2016). Oleh karena itu kultur dengan menggunakan jaringan sel dan organ merupakan metode yang sesuai untuk produksi, karena teknik kultur jaringan dan organ tanaman merupakan metode yang ekonomis dan tidak memerlukan bahan eksplan yang relatif banyak sehingga untuk produksi senyawa alami sangat cocok bila dikembangkan dengan konsep kegiatan di laboratorium (sagharyan, 2020).

2.7. ¹ Media Kultur

Media kultur *in-vitro* merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan perbanyakan tanaman dengan teknik kultur *in-vitro*. Pada saat ini sudah tersedia berbagai komposisi media kultur telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang dikulturkan. Diantaranya media Murashige and Skoog (1962) media Gamborg, B5 (1968), media Schenk dan Hildebrand, SH (1972), Woody Plant Medium, WPM (Lody dan McCown 1980). Komposisi media untuk setiap jenis tanaman sering kali berbeda-beda. Pada saat mengkulturkan jenis tanaman baru, percobaan-percobaan secara empiris perlu dilakukan untuk mendapatkan komposisi media kultur yang optimal. Akan tetapi media dasar yang paling sering digunakan untuk kultur *in-vitro* tanaman adalah media MS (Murashige and Skoog 1962). Media ini awalnya ditujukan untuk mengkulturkan tanaman tembakau, tetapi pada perkembangannya media ini diakui oleh seluruh dunia cocok untuk kultur *in-vitro* sebagian besar jenis tanaman (Sulistiani, 2012).

Menurut Rosmania (2021) media Murashige and Skoog (MS) merupakan media yang umum digunakan dalam perbanyakan tanaman secara *in-vitro* karena memiliki komposisi unsur hara yang lengkap. Keberhasilan perbanyakan secara *in-vitro* salah satunya dipengaruhi oleh komposisi media yang digunakan. Secara umum komposisi media kultur terdiri dari garam anorganik, garam mineral, zat pengatur tumbuh, bahan pematid, sumber karbon dan supplement organik. Sehingga tingkat keberhasilan dalam teknologi serta penggunaan metode *in-vitro* terutama disebabkan pengetahuan yang lebih baik tentang kebutuhan hara sel dan jaringan yang dikulturkan.

2.8. Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh adalah persenyawaan organik selain dari nutrient yang dalam jumlah sedikit dapat merangsang, menghambat, atau mengubah pola pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Dalam kultur *in-vitro*, dua golongan zat pengatur tumbuh yang sangat penting adalah sitokinin dan auksin. Interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media dan

yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur (Gunawan, 1992).

Zat pengatur tumbuh tidak berfungsi sebagai nutrisi tanaman, tetapi berfungsi sebagai pengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Senyawa ini umumnya aktif dalam konsentrasi yang sangat rendah. ZPT umumnya disintesis pada bagian tertentu tanaman, kemudian ditranslokasikan kebagian lain tanaman dimana zat tersebut menimbulkan respon biokimia, fisiologi dan morfologi (Sulistiani, 2012).

Manfaat dari zat pengatur tumbuh sitokinin diantaranya adalah untuk mempercepat pertumbuhan tunas, mempercepat penambahan jumlah daun, memperbanyak anakan dan menghambat penuaan organ tanaman. Jenis-jenis sitokinin antara lain BA/BAP, kinetin, 2-ip, TDZ dan Zeatin. Sedangkan Auksin digunakan untuk merangsang pertumbuhan akar, kalus, suspensi sel dan organ, auksin yang sering dipakai adalah IBA, NAA, 2,4-D dan IAA (Indarto, 2019).

2.9. Pembentukan Kalus

Kalus adalah suatu kumpulan sel yang terbentuk dari sel-sel jaringan yang membelah diri secara terus menerus dan belum mempunyai arah pertumbuhan baik ke tunas atau akar. Salah satu tujuan kultur kalus adalah untuk produksi planlet baru secara besar-besaran. Potensi terbesar penggunaan kultur kalus adalah dimana sel-sel kalus diperbanyak secara terus menerus kemudian dapat dipisahkan dan diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi embrio somatik kemudian menjadi planlet. Tujuan lain kultur kalus untuk menghasilkan varian somaklonal dan untuk produksi metabolit sekunder (Sandra, 2016).

Kalus adalah massa sel yang terbentuk dari berbagai rangsangan abiotik dan biotik tetapi *in-vitro*, itu membutuhkan pasokan eksogen auksin dan sitokinin pada rasio tertentu. Secara umum ditetapkan bahwa rasio sitokinin terhadap auksin yang lebih tinggi mendorong pembentukan tunas, rasio auksin terhadap sitokinin yang lebih tinggi mendorong pembentukan akar sementara tingkat keduanya yang tinggi menghasilkan pembentukan kalus (Mahmod, 2020). Bahkan perkembangan penelitian kalus digunakan sebagai bahan untuk memproduksi metabolit sekunder pada tanaman. Negara-negara maju banyak yang telah

menggunakan metode kultur *in-vitro* melalui pembentukan kalus untuk menghasilkan metabolit sekunder seperti Flavanoid, fenolik dan antioksidan yang akan digunakan dalam dunia industri kosmetik dan obat-obatan (Habibah, 2021).

Pembentukan kalus telah menarik banyak perhatian baik untuk skala keperluan penelitian ataupun industri, baik untuk perbanyakan maupun memproduksi metabolit skunder. Dengan pemilihan zat pengatur tumbuh yang sesuai maka tujuan untuk perbanyakan tanaman ataupun mendapatkan produksi metabolit sekunder akan tercapai sesuai dengan yang hasil yang diharapkan (Sagharyan, 2020). Konsentrasi dalam pembentukan kalus menurut Edi shandra dalam bukunya Rahasia Membuat Variagata (2020) menuliskan bahwa gabungan antara auksin dan sitokinin dalam kekuatan yang sama dalam konsentrasi tinggi, contohnya IBA 2 mg.l⁻¹+ BAP 2 mg.l⁻¹ atau 2,4-D 2 mg.l⁻¹ + Kinetin 2 mg.l⁻¹ dapat merangsang pertumbuhan kalus. Cara lain adalah dengan sinergisitas hormon sitokinin dalam konsentrasi tinggi seperti BAP 4 mg.l⁻¹ + TDZ 2 mg.l⁻¹ atau kinetin 4 mg.l⁻¹ + 2 ip 2 mg.l⁻¹.

Dalam penelitian setiawati (2019) menyatakan bahwa sebagian besar kalus yang terbentuk dari eksplan batang krisan memiliki tekstur kompak dan pada beberapa perlakuan bertekstur kombinasi kompak dan remah. Kalus asal eskplan daun krisan memiliki tekstur kalus yang bervariasi, namun secara umum bertekstur kompak. Pembentukan kalus yang diinduksi dari eskplan batang dan daun planlet krisan terjadi pada seluruh perlakuan kombinasi 2,4-D + kinetin dan NAA + BAP. Sebagian besar kalus yang terbentuk memiliki tekstur kompak dengan warna kehijauan. Ukuran kalus, berat basah dan berat kalus tertinggi yang diinduksi dari eksplan batang dan daun krisan berturut-turut terdapat pada kombinasi 3 ml.l⁻¹ 2,4-D + 2 ml.l⁻¹ kinetin dan 1 ml.l⁻¹ NAA + 1 ml.l⁻¹ BAP.

Menurut Puspitasari (2021) dalam penelitian kalus gambeli Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi antara 1 ml.l⁻¹ 2,4-D + 1 ml.l⁻¹ kinetin menghasilkan berat basah yang paling tinggi yaitu sebesar 2,1782 gram. Sel yang dihasilkan dominan berbentuk globular, namun ada beberapa yang berdiferensiasi menjadi memanjang, warna sel bervariasi dari coklat muda hingga coklat tua. Hasil penelitian Isnaini (2020) bahwasanya media MS dengan penambahan 2 mg.l⁻¹ BAP dan 0,5 mg.l⁻¹ NAA merupakan media yang paling baik bagi eksplan

tangkai daun dalam pembentukan kalus, tunas dan akar yang ditandai dengan jumlah masing-masing adalah 75%, 50% dan 56,67%. Selanjutnya, eksplan berupa kalus lebih mudah memberikan respon membentuk tunas dan akar dibandingkan dengan tangkai daun, baik pada kondisi ruang penyimpanan gelap maupun terang.

Hasil penelitian Rismayanti (2021) pada daun kopi arabika menunjukkan bahwa perlakuan F (Air Kelapa 20% + 2,4-D 0,5 mg.l⁻¹) menghasilkan waktu inisiasi kalus lebih cepat. Berbanding dengan hasil penelitian dari Mahmud (2020) untuk kultur kalus dioscera yang telah dilakukan bahwasanya induksi kalus dari ruas batang untuk mengevaluasi potensi kultur kalus *Dioscorea hispida* **Dennst.** Hasil menunjukkan bahwa kombinasi 1 mg.l⁻¹ asam naftalen aasetat (NAA), 1 mg.l⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP) dan 0,5 mg.l⁻¹ Asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) dalam media Gamborg (B5) meningkatkan multiplikasi dan diferensiasi kalus dalam kultur batang dibandingkan dengan media Murashige dan Skoog (MS).

1 III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Budidaya Tanaman Pangan, Politeknik Negeri Lampung, Bandar Lampung, dari bulan Mei 2022 hingga Juli 2022.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan ruas tanaman Gambeli aksesori lokal yang diperoleh dari kabupaten Papua barat sebagai eksplan awal yang akan ditanam terlebih dahulu untuk mendapatkan suber eksplan daun dan tangkai tanaman, *Benzylaminopurine* sebagai ZPT sitokinin (BA) dan 2.4-D sebagai ZPT auksin, agar-agar bubuk, gula, aquadest stock komposisi senyawa Murashige and Skoog (MS), alkohol 96% sebagai cairan untuk mensterilisasi ruang tanam dan alkohol 75% untuk sterilisasi bahan, alat dan bagian tangan yang akan masuk kedalam laminar sebelum penanaman, spirtus putih sebagai cairan untuk menghidupkan lampu bunsen, plastik *prophopilen* (PP) 0,3 mm sebagai lapisan penutup botol kultur, aluminium foil sebagai lapisan penutup botol kultur agar terhindar dari sumber kontaminasi; karet gelang sebagai pengikat lingkaran botol setelah pelapisan aluminium foil dan kertas label sebagai label tulisan kode perlakuan, varietas, dan tanggal tanam, serta sabun cuci sebagai bahan untuk sterilisasi peralatan dan tangan.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol kultur untuk tempat media perlakuan dan tempat mengkulturkan eksplan, lampu bunsen untuk sterilisasi alat tanam, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) sebagai tempat tanam yang steril, petridish untuk penempatan ekplan atau bahan tanam, peralatan diseksi (pinset besar untuk pengambilan eksplan pada botol kultur, pinset kecil untuk penjepit eksplan saat dipotong dengan *scalpel* pada setiap buku atau ruas tunas kentang, dan pisau *scalpel* digunakan untuk memotong eksplan), timbangan analitik untuk menimbang bahan kimia dengan ukuran kecil dalam satuan gram (g), *hand sprayer* sebagai tempat alkohol menyemprot tangan sebelum melakukan

kegiatan penanaman di dalam *laminar air flow cabinet*; magnetik stirer untuk mengaduk bahan kimia yang susah larut agar homogeny, *hot plate* digunakan sebagai alat untuk memanaskan bahan kimia yang susah larut agar homogen, labu takar untuk mengukur volume larutan bahan kimia, *beker glass* digunakan sebagai tempat untuk melarutkan bahan kimia, erlenmeyer sebagai tempat larutan bahan kimia setelah dilarutkan, pH meter untuk mengukur tingkat keasaman dan kebasahan larutan media tanam setelah dilarutkan; *autoclave* sebagai alat untuk sterilisasi peralatan dan bahan sebelum digunakan, pipet ukur untuk mengambil larutan bahan kimia sesuai dengan volume yang diinginkan, oven digunakan sebagai tempat peralatan yang telah disterilisasi, lemari pendingin untuk menyimpan bahan-bahan kimia dan larutan stok, rak kultur untuk penempatan botol kultur setelah penanaman.

3.3 Metode Penelitian

Perlakuan disusun Rancangan Acak Kelompok (RAK). Perlakuan yang dicobakan adalah konsentrasi ZPT dan bagian tanaman sebagai sumber eksplan.

Perlakuan tersebut adalah

1. BAP 2 ml.l⁻¹ + sumber eksplan ruas
2. BAP 2 ml.l⁻¹ + sumber eksplan daun
3. BAP 4 ml.l⁻¹ + sumber eksplan ruas
4. BAP 4 ml.l⁻¹ + sumber eksplan daun
5. 2,4-D 1 ml.l⁻¹ + sumber eksplan ruas
6. 2,4-D 1 ml.l⁻¹ + sumber eksplan daun
7. 2,4-D 2 ml.l⁻¹ + sumber eksplan ruas
8. 2,4-D 2 ml.l⁻¹ + sumber eksplan daun
9. Kombinasi BAP 2 ml.l⁻¹ + 2,4-D 1 ml.l⁻¹ + sumber eksplan ruas
10. Kombinasi BAP 2 ml.l⁻¹ + 2,4-D 1 ml.l⁻¹ + sumber eksplan daun
11. Kombinasi BAP 2 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹ + sumber eksplan ruas
12. Kombinasi BAP 2 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹ + sumber eksplan daun
13. Kombinasi BAP 4 ml.l⁻¹ + 2,4-D 1 ml.l⁻¹ + sumber eksplan ruas
14. Kombinasi BAP 4 ml.l⁻¹ + 2,4-D 1 ml.l⁻¹ + sumber eksplan daun
15. Kombinasi BAP 4 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹ + sumber eksplan ruas
16. Kombinasi BAP 4 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹ + sumber eksplan daun

1 Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali, sehingga terdapat 48 satuan percobaan. Setiap percobaan masing-masing berisi satu potongan eksplan Semua perlakuan tersebut ditambahkan ke dalam media dasar yang sama, yaitu formulasi MS (Murashige dan Skoog, 1962).

Data hasil penelitian diolah dengan menggunakan analisis ragam, sebelumnya diuji homogenitasnya dengan uji Barlett dan ketidak aditifannya dengan uji *Tuckey*. Untuk melihat pengaruh rata-rata perlakuan dilakukan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf signifikan 5%.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat

Alat-alat seperti botol kultur, spatula, scalpel, pinset, cawan petri, gelas ukur dan alat-alat gelas lainnya sebelum dipakai dicuci terlebih dahulu. Kemudian alat-alat tersebut disterilisasi menggunakan autoclave selama 60 menit pada temperature 121°C dengan tekanan 1,5 atm.

3.4.2 Pembuatan larutan stock

Media MS (Murashige and Skoog) adalah media kultur jaringan yang banyak digunakan untuk mengkulturkan berbagai jenis tanaman. Media MS dipakai karena merupakan komposisi media kultur yang mempunyai unsur hara makro dan mikro yang lebih lengkap dibandingkan komposisi media kultur lainnya. Dalam pembuatan media kultur dalam kegiatan ini, langkah pertama yang dilakukan adalah membuat larutan stock untuk menghemat pekerjaan menimbang bahan yang berulang-ulang setiap kali dalam pembuatan media kultur. Dalam pembuatan larutan stock penimbangan mengacu dalam tabel komposisi penimbangan unsur hara MS. Larutan stock berdasarkan pengelompokannya dibagi larutan stock makro, larutan stock mikro, larutan stock vitamin dan larutan stock Zat Pengatur Tumbuh yang terbagi dalam berbagai botol penyimpanan. Selanjutnya larutan stock makro, mikro, vitamin dan ZPT yang sudah dibuat disimpan dalam lemari es untuk memperpanjang masa simpan.

1
Tabel 2. Formulasi Media MS (Murashige dan Skoog, 1962) yang dibuat Stok

Senyawa	Konsentrasi dalam media (mg/L)	Konsentrasi dalam larutan stok (mg/L)	Konsentrasi dalam larutan stok (mg/250mL)
Hara Makro A		100 kali	
NH ₄ NO ₃	1.650	165.000	41.250
KNO ₃	1.900	190.000	47.500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	37.000	9.250
KH ₂ PO ₄	170	17.000	4.250
1 Makro B (Stok Ca)		1 100 kali	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	44.000	11.000
Hara Mikro A		100 kali	
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	1.690	422,5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	860	215
H ₃ BO ₃	6,2	620	155
Hara Mikro B		1000 kali	
KI	0,830	830	207,5
Na ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	0,250	250	62,5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	25	6,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	25	6,25
Hara Mikro C (Fe)		100 kali	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	2.780	695
Na ₂ EDTA	37,3	3.730	932,5
Vitamin		100 kali	
Tiamin-HCl	0,1	10	2,5
Piridoksin-HCl	0,5	50	12,5
Asam Nikotinat	1 0,5	50	12,5
Glisin	2,0	1 20	50
<i>Mio-inositol</i>	100	100 kali 10000	2500
ZPT		1000 kali	
BAP	1	1 10 mg/L	100mg/100mL
2,4-D	1	100 mg/L	100mg/100mL
Sukrosa	30.000		
Agar	7.000		
pH	5,7		

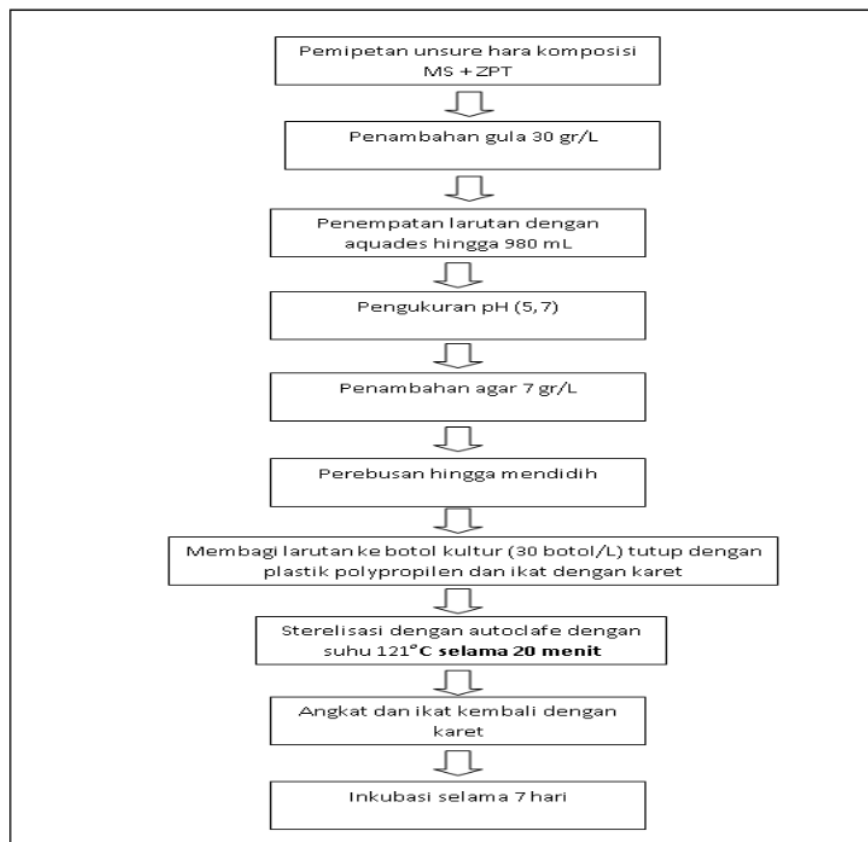
Sumber: M. Tahir dan Wiwik Indrawati (2016)

1 3.4.3. Aplikasi perlakuan

Aplikasi BAP dilakukan dengan cara memipet BAP sesuai dengan perlakuan yang dibutuhkan yaitu 2 ml.l⁻¹, 4 ml.l⁻¹, kemudian memipet 2,4-D sesuai perlakuan yaitu 0,5 ml.l⁻¹, 1 ml.l⁻¹, ditambahkan kedalam larutan **1** hara makro, hara mikro, dan vitamin sesuai komposisi media MS. Untuk perlakuan pemberian zat pengatur tumbuh dimedia, zat pengatur tumbuh terlebih dahulu di timbang dan dilarutkan untuk dijadikan larutan stock. Penimbangan dan pelarutan larutan stock zat pengatur tumbuh ditimbang dengan kepekatan atau tingkat kekentalan 1000 kali untuk 100 ml stock.

3.4.4. Media kultur dan sterilisasinya

Media perlakuan MS ditambahkan zat pengatur tumbuh yaitu *benzylaminopurine* dengan dua taraf konsentrasi yaitu 2 ml.l⁻¹, 4 ml.l⁻¹, serta penambahan 2,4-D 1 ml.l⁻¹, 2 ml.l⁻¹. Media perlakuan tersebut diatur pH-nya menjadi 5,8 menggunakan pH meter dengan penambahan NaOH 2 N atau HCl 2 N sebelum ditambahkan agar-agar sebagai pematat media sebanyak 7 g/L. Media yang telah diberi pematat dimasak sambil diaduk-aduk hingga mendidih sampai pematat mediana larut. Kemudian media dituangkan ke botol kultur berkapasitas 250 mL, masing-masing sebanyak 30 botol dengan tinggi media 1 cm, lalu ditutup tutup botol tahan panas. Sterilisasi media dilakukan menggunakan autoklaf selama 20 menit pada temperature 121°C dengan tekanan 1,5 atm, setelah didinginkan dan disimpan selama sedikitnya 7 hari, media tersebut siap untuk digunakan.



Gambar 2. Bagan Alir Pembuatan Media

3.4.5 Persiapan eksplan dan penanaman ¹

Sebelum kegiatan maka dilakukan sterilisasi *laminar air flow* dengan menyemprotkan alkohol 96% pada lantai dan dinding laminar, alat tanam, media, bahan tanam dan lain-lain sebelum dimasukkan kedalam laminar disemprotkan dahulu dengan alkohol 75% begitu pula dengan tangan sebelum melakukan kultur. Kegiatan penanaman dengan mengikuti kaidah yang mengacu pada International Board For Plant Genetic Resources (IPGRI) (1997)

1. Penentuan bagian tanaman yang akan diambil

Dalam penelitian yang dilakukan mengambil bagian Daun dan ruas tanaman. Terlebih dahulu daun dan ruas tanaman dibersihkan dari kotoran yang menempel di air mengalir. Selanjutnya daun dan ruas tanaman yang telah dibersihkan direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida selama 30 menit, daun dan ruas tanaman yang telah direndam kemudian di cuci dengan menggunakan air steril untuk membersihkan dari sisa fungisida dan bakterisida yang mungkin saja tertinggal di bagian luar daun dan ruas tanaman. Untuk menjaga sterilisasi daun dan ruas tanaman dicelupkan di alkohol 96% sebelum dimasukkan kedalam laminar air flow cabinet, didalam laminar air flow cabinet daun dan ruas tanaman di sterilisasi dengan menggunakan larutan pemutih pakaian 30% selama 30 menit dan 20% selama 20 menit. Setelah perendaman selanjutnya daun dan ruas tanaman dibilas dengan air steril 3 kali untuk membersihkan sisa larutan pemutih pakaian yang tertinggal di kulit daun dan ruas tanaman.

Pemotongan daun dan ruas tanaman sebagai sumber eksplan dengan cara memotong berukuran 1cm x 1cm untuk daun dan untuk ruas diikutkan 1 ruas per batang. Kegiatan tersebut dilakukan pada cawan petridish yang sudah steril dengan menggunakan alat diseksi (*scaple* dan pinset) yang sudah disterilisasi, bagian luar atau kulit dibuang sehingga menyisakan daging bagian dalam daun dan ruas tanaman. Sebelum ditutup, mulut botol dipanaskan kembali. Setelah itu, botol ditutup dengan tutup botol, agar lebih lekat maka sekeliling mulut botol di bungkus dengan menggunakan plastik *wrapping*.

2. Tanggal penanaman.

Botol diberi label sesuai perlakuan dan tanggal penanamannya dengan menulis tanggal, bulan dan tahun penanaman. Bagian daun dan ruas tanaman yang telah ditanam kemudian diinkubasi pada ruangan inkubasi yang telah diset suhunya 18°C - 20°C dengan menghidupkan AC.

3. Proses regenerasi

Kegiatan proses melalui kegiatan organogenesis, berdasarkan panduan IPGRI (1997) terdapat dua pilihan kegiatan untuk kegiatan kultur daun dan ruas tanaman-daun dan ruas tanaman yaitu organogenesis dan embryogenesis somatic.

3.4.6. Pemeliharaan

Semua kultur daun dan ruas tanaman yang telah ditanam atau disubkultur, diletakkan pada rak-rak kultur di dalam ruang kultur yang dikondisikan dengan suhu 20°C, dengan pencahayaan menggunakan lampu *fluorescent* (TL) berintensitas 1.000—3.000 lux selama 60 hari waktu perlakuan.

3.4.7. Pengamatan

A. Karakter kualitatif

Karakter kualitatif dapat dilihat dari bentuk visual dan proses yang terjadi pada eksplan. Pengamatan kualitatif mengikuti kaidah yang mengacu pada *International Board For Plant Genetic Resources* (IPGRI) (1997) dan penelitian kalus sebelumnya antara lain Mahmod kultur kalus *Dioscorea hispida* Dennst (2020), Setiawati (2019) kultur kalus krisan dan Pedoman Kultur kalus *Seamo Biotrop* (2014).

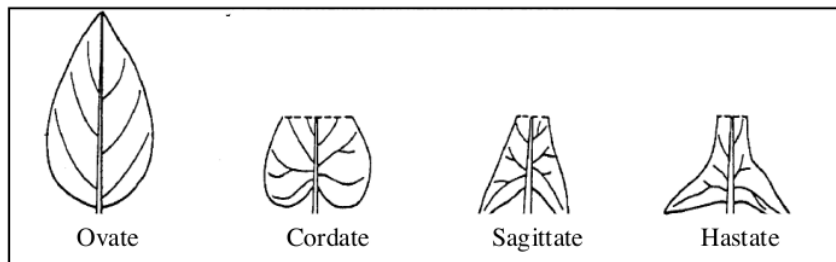
1. Warna daun muda

Pengamatan dengan melihat penampakan visual daun yang tumbuh dipersemaian. Dalam catatan IPGRI terdapat 5 warna daun : *Yellowish* (kekuning-kuningan), *pale green* (hijau pucat), *dark green* (hijau tua), *purplish*

green (hijau keunguan), *purple* (ungu) dan terdapat pilihan jika ternyata warna daun muda yang tumbuh tidak masuk kedalam 5 warna tersebut.

2. Bentuk daun

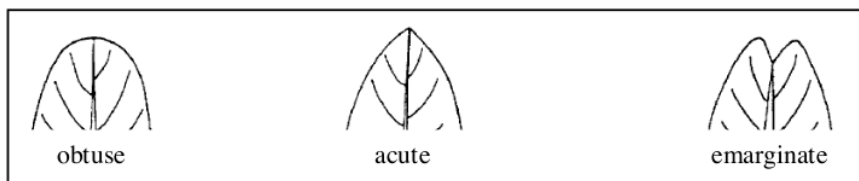
Dalam panduan IPGRI terdapat 7 macam bentuk daun yaitu *Ovate* (bulat telur), *Cordate* (berbentuk hati), *cordate long* (berbentuk hati memanjang), *cordate board* (berbentuk hati melebar), *sagittate long* (membentuk sagitarius memanjang), *Sagittate broad* (sagitarius melebar), *Hastate* (mengacak kesamping) dan pilihan bila bentuk daun tidak termasuk ke 7 pilihan tersebut. Bentuk daun dapat dilihat pada gambar 3 dibawah ini:



Gambar 3. Gambar Jenis Bentuk Daun Dioscera
Sumber Standar Pengamatan Pengamatan IPGRI, 1997

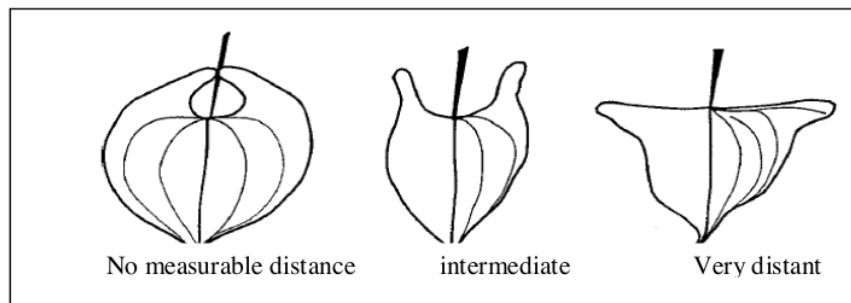
3. Bentuk puncak daun dan jarak antar lobus

Menurut panduan IPGRI terdapat 3 bentuk pucuk daun yaitu obtuse (bulat tumpul), acute (runcing) dan emarginate (bergelombang, menggunung).



Gambar 4. Bentuk Pucuk Daun Dioscera
Sumber Standar Pengamatan Pengamatan IPGRI (1997)

Menurut panduan IPGRI terdapat 3 macam jarak antar lobus yaitu no *measurable distance* (merapat), *intermediate* (agak melebar), *Very distant* (melebar).



Gambar 5. Bentuk Jarak Antar Lobus Daun Dioscera
Sumber Standar Pengamatan Pengamatan IPGRI (1997)

4. Warna kalus dalam botol

Pengamatan warna kalus dimulai setelah kalus terbentuk, yaitu pada umur kalus 2 minggu, 4 minggu, 6 minggu dan 8 minggu. Merujuk dari penelitian yang dilakukan pada laboratorium biotrop pada penelitian penumbuhan kalus rumput laut bahwasanya kalus mulai terbentuk pada umur 14 hari setelah inisiasi. Namun bila dalam kurun waktu sebelum 14 hari sudah mulai terbentuk kalus maka dilakukan pengamatan pertama.

5. Tekstur dan warna kalus diakhir penelitian

Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga jenis, yaitu: kompak (*non-friable*), *intermediate* dan *crumbly (friable)* (Turhan, 2004). Pengamatan tekstur kalus dilakukan setelah masa penelitian selesai dengan mengeluarkan kalus dari dalam botol sehingga menjadi sample dekonstruktif.

Untuk mendapatkan eksplan maka umbi di tunaskan terlebih dahulu sehingga akan diperoleh data pengamatan kualitatif morfologi tanaman yaitu :

B. Karakter kuantitatif

Pengamatan karakter kuantitatif mengikuti kaidah yang mengacu pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan beberapa peneliti sebelumnya:

Variabel yang diamati meliputi:

1. Kecepatan tumbuh kalus/ hari munculnya kalus (hari)

Dihitung dari hari penanaman hingga hari terbentuknya kalus
(Seamo Biotrop, 2014)

2. Diameter kalus (cm)

Dengan cara menghitung dengan menggunakan penggaris secara manual dengan meletakkan kalus disamping penggaris diluar botol (Mahmod, 2020)

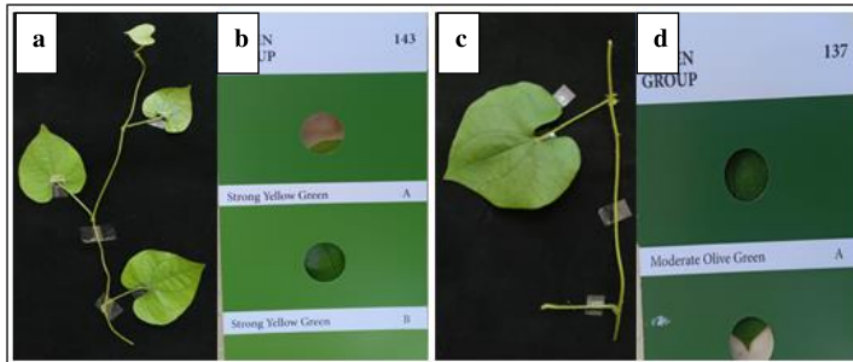
3. Berat kalus (mg)

Ditimbang di ruang timbang dengan menggunakan neraca timbang analitik.
(Setiawati, 2019)

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakter Kualitatif Warna Daun

Daun merupakan organ tumbuhan yang sangat penting dan pada umumnya merupakan bagian yang terbanyak pada tumbuhan. Daun terdapat pada batang. Bagian batang tempat duduknya daun atau tempat melekatnya daun disebut dengan ruas buku-buku (*nodus*) batang, dan tempat di atasnya daun merupakan sudut antara batang dengan tangkai daun disebut dengan ketiak daun (*axilla*). Sepanjang perjalanan daun mengalami perubahan warna yang pada saat mudah berwarna hijau muda, saat dewasa berwarna hijau tua, namun menjelang gugur akan berubah warna menjadi pucat atau kekuningan (Silalahi, 2019).



Gambar 6. Karakteristik warna daun gembili (a) daun gembili muda (b) warna daun muda dengan menggunakan RHS *colour chart*, (c) daun gembili tua (d) warna daun tua tanaman gembili aseksi papua barat dengan menggunakan RHS *colour chart*

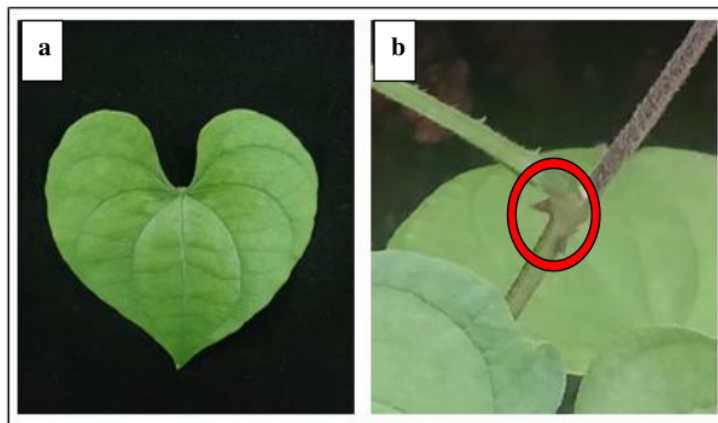
Daun merupakan bagian terpenting tanaman karena proses fotosintesis tumbuhan terletak di bagian daun. Untuk warna daun baik daun muda ataupun daun tua masuk dalam *green group* dimana daun muda masuk dalam kategori *green group 143 strong yellow green B* dimana warna daun muda berwarna hijau pucat (*pale green*, IPGRI). Sedangkan daun tua warna daun tua masuk kategori *green group 137 moderate olive green A* dimana warna daun cenderung arah warna hijau tua (*dark green*, IPGRI). Menurut Setyowati (2016) dalam penelitiannya bahwasanya karakter warna daun gembili dalam koleksi di Bank

Gen Balitbangtan di BB Biogen dilaporkan berwarna hijau muda untuk daun muda dan warna hijau untuk daun tua.

4.2 Karakter Kualitatif Bentuk Daun

Umbi gembili yang telah disemai dan tumbuh maka diamati sifat-sifat fisiologis tanaman gembili. Dari hasil pengamatan dan melihat literatur dari IPGRI (1997), maka diperoleh data pengamatan visual bentuk daun gembili aksesori Papua Barat berbentuk *cordate boar* (berbentuk hati melebar). Susunan daun gembili berselang seling dengan batang menjulur keatas, diseluruh bagian batang gembili yang menjalar terdapat duri-duri kecil dibawah ruas daun.

¹²Berdasarkan jumlah anak daun yang dimiliki oleh tanaman gembili adalah daun tunggal. ¹²Daun tunggal merupakan daun yang hanya memiliki satu helaian daun, sedangkan daun majemuk merupakan daun yang memiliki lebih dari satu helaian daun.



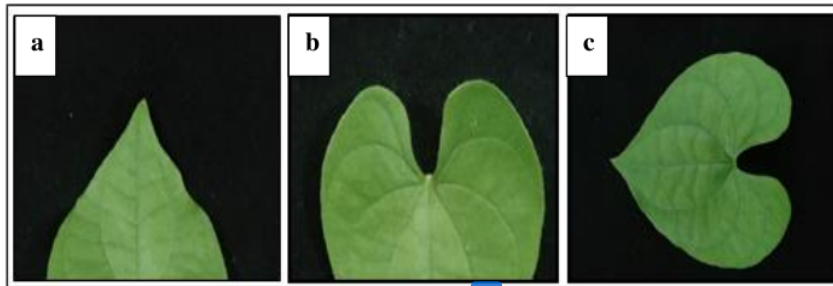
Gambar 7. Morfologi daun gembili (a) Bentuk daun tanaman gembili, (b) Duri terletak dibawah ruas tangkai daun tanaman gembili aksesori Papua Barat.

Bentuk daun gembili seperti ini juga dapat dikatakan berbentuk segitiga dengan ujung daun meruncing seperti gunung. Penelitian Sabda dkk. (2019) menuliskan bahwasanya dari 8 aksesori Papua yang diamati keseluruhan bentuk daun berbentuk segitiga. Hal ini menunjukkan bahwasanya morfologi daun

tanaman gembili berbagai aksesori Papua tidak ada perbedaan. Tekstur daun gembili tidak berbulu dengan tekstur bagian atas daun yang sedikit kasar dengan warna lebih hijau dibandingkan bagian bawah daun, sedangkan daun bagian bawah lekuk-lekuk tulang daun sangat terlihat dengan jelas dan bertemu pada pusat tulang daun di pangkal *lobus*.

4.3 Karakter Kualitatif Bentuk Puncak Daun dan Jarak Antar Lobus

Dari hasil pengamatan pucuk daun dari tanaman umbi diperoleh kesimpulan bahwa pucuk daun gembili aksesori Papua Barat berbentuk *acute* (runcing), dengan bentuk pinggir daun yang agak bergelombang dan membesar ke arah pangkal *lobus*. Tekstur pinggi daun tanaman gembili bertekstur tidak terlalu kasar dari ujung (puncak) daun hingga pangkal *lobus*.



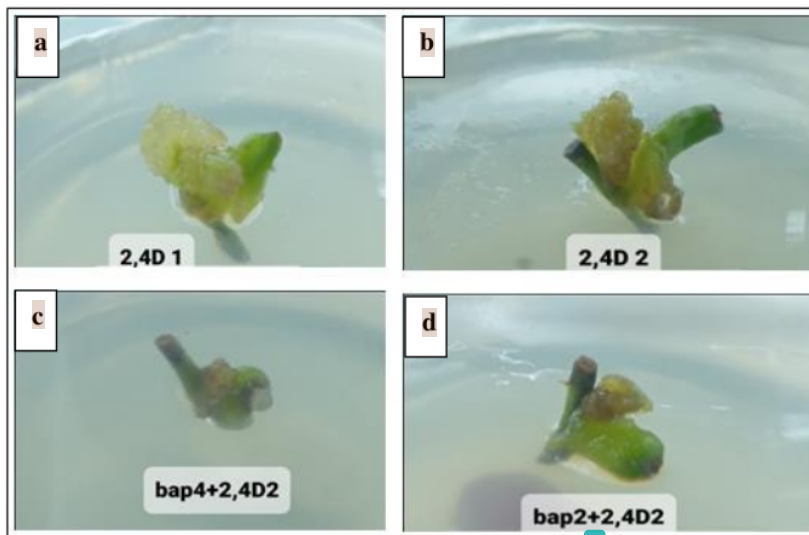
Gambar 8. Penampakan bentuk muka daun (a) Bentuk puncak daun (b) Bentuk lobus daun (c) Bentuk daun utuh tanaman gembili aksesori Papua Barat.

IPGRI (1997) menyebutkan bahwasanya jarak antar *lobus* digolongkan ke dalam tipe *Intermediate* dimana jarak antara *lobus* terbagi dua dengan jarak antar *lobus* terpisah. Lekukan lobus daun gembili aksesori Papua Barat termasuk dalam dengan bagian atas daun *lobus* melebar membentuk cangkir. Pada daun muda jarak antar *lobus* saling bertemu satu dengan yang lainnya, namun dengan bertambahnya umur tanaman *lobus* semakin merenggang dan akhirnya terpisah antara-satu dengan yang lainnya.

4.4 Karakter Kualitatif Warna Kalus

Warna kalus merupakan Indikator keberhasilan dalam kegiatan regenerasi kalus secara *in-vitro*. Tampilan visual dari warna kalus dapat menggambarkan

apakah kalus masih memiliki sel yang aktif membelah atau telah mati. Menurut Andaryani (2019) bahwasanya, warna kalus menunjukkan adanya klorofil dalam jaringan. Warna kalus yang lebih hijau berarti kandungan klorofilnya lebih banyak. Warna terang atau putih dapat menandakan bahwa kondisi kalus masih cukup baik. Warna kalus menggambarkan tampilan apakah kalus masih memiliki sel yang aktif membelah atau telah mati. Jaringan kalus yang dihasilkan dari eksplan biasanya menunjukkan warna yang berbeda. Kalus yang berkualitas baik memiliki warna hijau. Warna kalus menunjukkan adanya klorofil dalam jaringan. Warna kalus yang lebih hijau berarti kandungan klorofilnya lebih banyak. Warna terang atau putih dapat menandakan bahwa kondisi kalus masih cukup baik.



Gambar 9. warna kalus pada media kultur (a) 2,4-D 1 ml.l⁻¹ (b) 2,4-D 2 ml.l⁻¹ (c) BAP 4 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹ (d) BAP 2 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹.

Dari hasil penelitian yang telah dilaksanakan bahwa respon ZPT auksin 2,4-D dalam regenerasi kalus tunas gambeli berwarna bening atau hijau kekuningan. Warna kalus dalam media kultur 2,4-D 1 ml.l⁻¹ menggambarkan kondisi warna kalus yang sangat baik, dengan warna kuning bening kekuningan, kalus tidak mengalami pencoklatan dan berkembang lebih cepat dibandingkan media dengan perlakuan kombinasi antara BAP dan 2,4-D. Hal ini menandakan bahwasanya untuk merangsang pertumbuhan tunas dari bagian nodus penambahan auksin 2,4-D sudah cukup untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan

kalus. Pembentukan kalus bertujuan untuk menghasilkan kumpulan kalus yang biasanya disebut dengan embrio somatik.

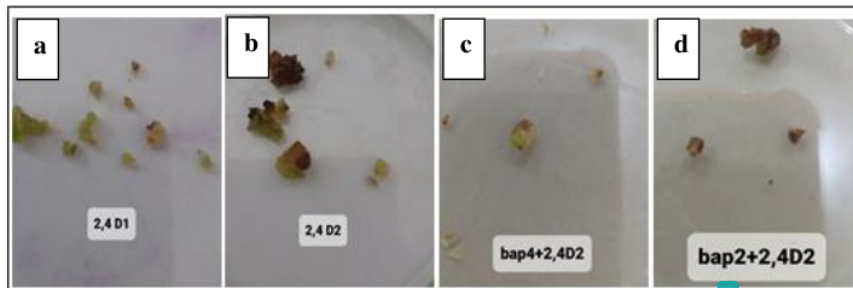
Tabel 3. Warna kalus eksplan gembili aseksi Papua Barat pada berbagai asal eksplan serta konsentrasi BAP dan 2,4-D secara *in-vitro*.

Perlakuan	Warna kalus
BAP 2 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 2 (eksplan ruas)	Tidak tumbuh kalus (tumbuh tunas)
BAP 4 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 4 (eksplan ruas)	Tidak tumbuh kalus (tumbuh tunas)
2,4D 1 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
2,4D 1 (eksplan ruas)	Hijau kekuningan
2,4D 2 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
2,4D 2 (eksplan ruas)	Hijau kecoklatan
BAP 2 + 2,4D 1 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 2 + 2,4D 1 (eksplan ruas)	Tidak tumbuh kalus (hanya terjadi)
BAP 2 + 2,4D 2 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 2 + 2,4D 2 eksplan ruas)	Hijau kecoklatan
BAP 4 + 2,4D 1 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 4 + 2,4D 1 (eksplan ruas)	Tidak tumbuh kalus (hanya terjadi)
BAP 4 + 2,4D 2 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 4 + 2,4D 2 (eksplan ruas)	Hijau kecoklatan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan bahwasanya penggunaan konsentrasi BAP dan 2,4-D yang tinggi menunjukkan warna kalus yang mengarah kecoklatan, Gejala pencoklatan merupakan tanda-tanda kerusakan fisiologis eksplan. Warna kecoklatan menandakan kondisi kalus cepat mengalami kerusakan, Warna kalus yang semakin gelap (menjadi coklat) berarti menandakan pertumbuhan kalus menurun karena kalus mengalami proses penuaan (*senescence*) sel. Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian Andaryani (2019) bahwasanya semakin banyak penambahan 2,4-D dapat menyebabkan peningkatan pembentukan kalus dengan warna coklat pada jarak pagar. Penelitian sofiani dan Purnawanto (2017), menyebutkan bahwa penambahan konsentrasi sitokinin menghasilkan kalus dengan warna mengarah kecoklatan pada proliferasi kalus tanaman kencur. Hasil penelitian anggraeni (2022), memperkuat kesimpulan bahwasanya penambahan sitokinin pada media 2,4-D akan menimbulkan warna coklat pada kalus.

4.5 . Karakter Kualitatif Tekstur Kalus

Untuk menilai kualitas kalus salah satu hal yang dapat diamati adalah tekstur dari terbentuknya kalus tersebut. Menurut andaryani (2019) kalus yang baik adalah kalus yang memiliki tekstur yang gembur (*friable*). Hal ini dimaksudkan dengan tekstur kalus yang gembur memudahkan pemisahan menjadi sel tunggal dalam kultur suspensi serta meningkatkan aerasi oksigen antar sel, tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga jenis, yaitu: kompak (*non-friable*), *intermediate* dan *crumbly (friable)* (Andaryani.2019).



Gambar 10. Penampakan tekstur kalus pada media (a) 2,4-D 1 ml.l⁻¹ (b) 2,4-D 2 ml.l⁻¹ (c) BAP 4 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹ (d) BAP 2 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹

Secara visual ikatan antar sel pada kalus remah terbentuk pada perlakuan 2,4-D 1 ml.l⁻¹ dengan bentuk secara visual kalus remah dan berwarna hijau kekuningan. Sedangkan media dengan perlakuan 2,4-D 2 ml.l⁻¹ rata-rata kalus terbentuk dengan keadaan remah namun kalus mengalami warna pencoklatan. Hasil penelitian Puspitasari dkk. (2021) bahwasanya diperoleh kesimpulan semakin tinggi konsentrasi ZPT yang digunakan maka warna sel yang dihasilkan semakin tua. Warna coklat tersebut diduga disebabkan adanya kandungan senyawa *flavonoid* yang terkandung di dalam sel. Warna coklat merupakan penyebab dari adanya kandungan senyawa *flavonoid* di dalam sel yang teroksidasi oleh oksigen.

Dalam penelitiannya anggraeni menjelaskan bahwasanya media dengan perlakuan 2,4-D 1 ml.l⁻¹ + BA 1,5 ml.l⁻¹ terjadi perubahan warna pada kalus menjadi browning (kecokelatan) pada daun *talinum triangulare* (Jacq.) yang menandakan kalus mulai mengalami oksidasi yang menyebabkan pertumbuhan kalus dan proses pembelahan sel menjadi lambat.

Tabel 4. Hasil visual tekstur dan warna kalus dalam berbagai komposisi media kultur

Media Perlakuan	Pembentukan kalus
BAP 2 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 2 (eksplan ruas)	Tidak tumbuh kalus (tumbuh tunas)
BAP 4 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 4 (eksplan ruas)	Tidak tumbuh kalus (tumbuh tunas)
2,4D 1 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
2,4D 1 (eksplan ruas)	kompak agak remah, dengan warna hijau kekuningan
2,4D 2 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
2,4D 2 (eksplan ruas)	kompak agak remah warna hijau kecoklatan
BAP 2 + 2,4D 1 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 2 + 2,4D 1 (eksplan ruas)	Tidak tumbuh kalus
BAP 2 + 2,4D 2 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 2 + 2,4D 2 (eksplan ruas)	coklat kehitaman
BAP 4 + 2,4D 1 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 4 + 2,4D 1 (eksplan ruas)	Tidak tumbuh kalus
BAP 4 + 2,4D 2 (eksplan daun)	Tidak tumbuh kalus
BAP 4 + 2,4D 2 (eksplan ruas)	coklat kekuningan

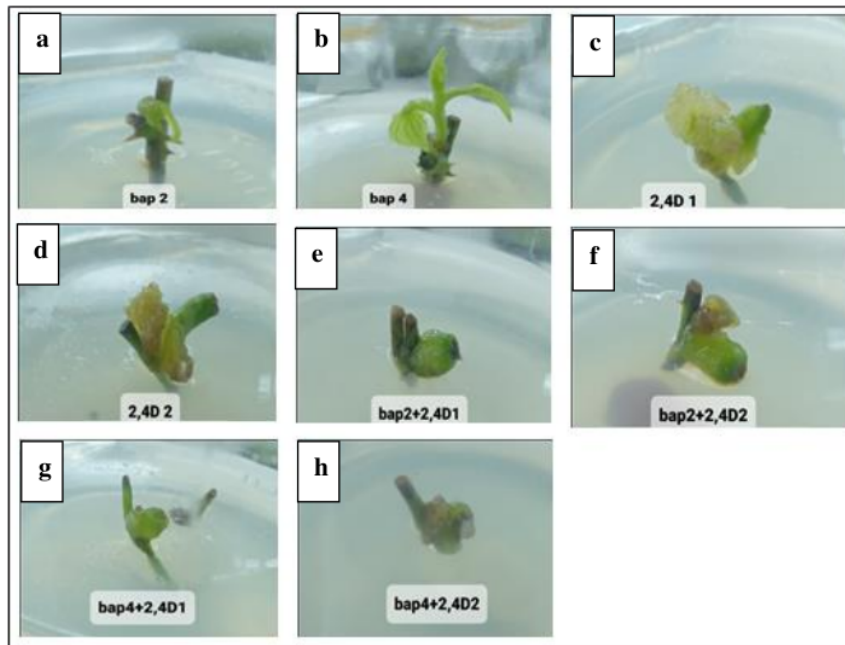
Kalus pada dasarnya terbentuk sebagai respon terhadap adanya gangguan mekanik atau karena adanya pelukaan terhadap jaringan eksplan. Sel-sel disekitar jaringan yang terluka akan membelah secara cepat dan membentuk lapisan sel-sel yang menutupi bagian yang terluka (Mastuti, 2018).

Menurut andaryani (2019) warna kalus yang semakin mengalami warna pencoklatan menandakan pertumbuhan kalus semakin menurun, bahwasanya peristiwa pencoklatan merupakan peristiwa alam dan proses perubahan adaptif pada bagian tanaman akibat pengaruh fisik seperti pengupasan dan pemotongan. Gejala pencoklatan merupakan tanda-tanda kerusakan fisiologis eksplan. Selain menunjukkan terjadinya sintesis senyawa fenolik, warna coklat juga disebabkan oleh bertambahnya usia sel atau jaringan kalus.

4.6. Pengamatan Kuantitatif Kecepatan Tumbuh Kalus (Hari)

Salah satu Indikator yang diamati dalam penelitian ini adalah pembentukan kalus. kalus adalah sel-sel tidak berdiferensiasi yang terbentuk pada satu atau seluruh irisan eksplan. Pada penelitian ini, kalus terbentuk pada nodus sedangkan untuk eksplan daun tidak terlihat pengaruh zpt terhadap pertumbuhan kalus. Terbentuknya kalus ditandai dengan adanya pembengkakan pada bagian

yang langsung menyentuh dimedia. ⁵ pengatur tumbuh (ZPT) dalam kultur sel berperan penting untuk memacu pertumbuhan dan perkembangan sel. Tanpa adanya ZPT maka pertumbuhan sel akan terhambat.



Gambar 11. Pertumbuhan kalus dan tunas pada berbagai media dengan ⁴han eksplan nodus. (a) BAP 2 ml.l^{-1} (b) BAP 4 ml.l^{-1} (c) 2,4-D 1 ml.l^{-1} (d) 2,4-D 2 ml.l^{-1} (e) BAP 2 ml.l^{-1} + 2,4-D 1 ml.l^{-1} (f) BAP 2 ml.l^{-1} + 2,4-D 2 ml.l^{-1} (g) BAP 4 ml.l^{-1} + 2,4-D 1 ml.l^{-1} (h) BAP 4 ml.l^{-1} + 2,4-D 2 ml.l^{-1} .

Untuk nodus terjadi pembengkaan dan pertumbuhan kalus, media dengan perlakuan 2,4-D (1ml.l^{-1} dan 2ml.l^{-1}) kalus terbentuk pada tunas air atau tunas ketiak dan langsung terjadi kepertumbuhan kalus. Untuk media kultur dengan perlakuan 2,4-D (1ml.l^{-1} dan 2ml.l^{-1}) pembentukan kalus terlihat dari perubahan bentuk tidak beraturan pada bagian eksplan dan terus beregenerasi membesar, sedangkan untuk media kultur dengan kombinasi BAP (2ml.l^{-1} , 4ml.l^{-1}) dan 2,4-D (1ml.l^{-1} , 2ml.l^{-1}) sampai masa pengamatan 4 mst masih terjadi pembengkaan pada eksplan dan belum menunjukkan perubahan kepembentukan kalus terkecuali media kultur dengan kombinasi BAP 2 ml.l^{-1} + 2,4-D 2 ml.l^{-1} dan BAP 4 ml.l^{-1} + 2,4-D 2

ml.l⁻¹ menunjukkan pembengkakan dengan diikuti pembentukan kalus dengan persentase kecil bila dibandingkan dengan media kultur dengan perlakuan 2,4-D saja.

Andaryani (2019) menuliskan bahwasanya secara umum penambahan auksin pada konsentrasi rendah akan merangsang pembentukan kalus. Sebaliknya, jika rasio auksin dan sitokinin dalam medium lebih tinggi, maka akan merangsang eksplan kalus untuk beregenerasi membentuk organ selain kalus. Dilihat dari hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan bahwasanya konsentrasi 2,4-D yang lebih rendah dari konsentrasi BAP belum dapat mengimbangi fungsi dari masing-masing zat pengatur tumbuh tersebut.

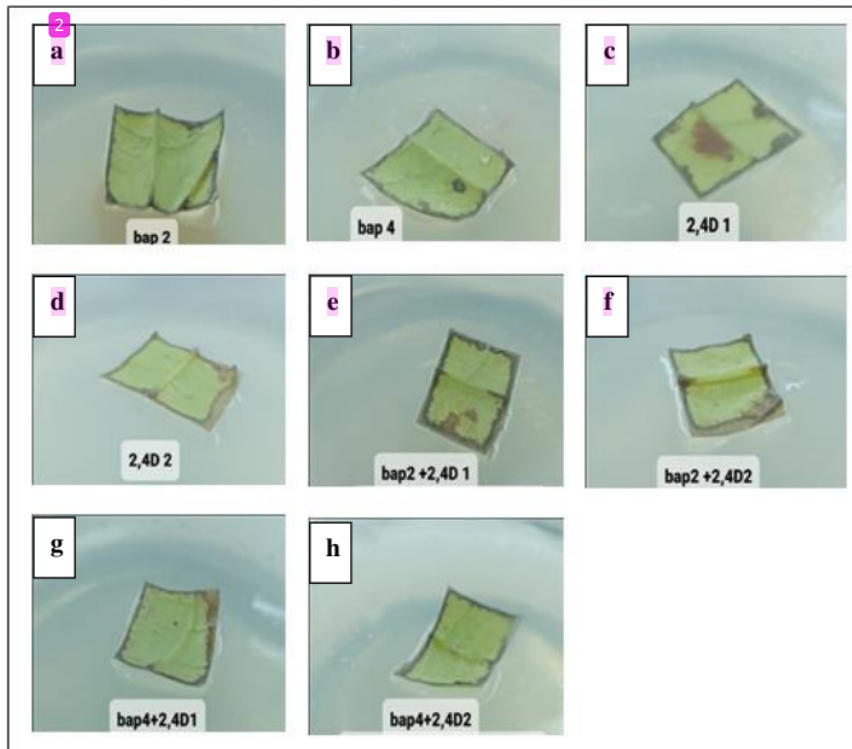
Untuk eksplan daun sendiri tidak terjadi pembentukan kalus diseluruh media percobaan dengan ditandai tidak adanya respon pembengkakan bahkan bagian pinggir daun mulai berwarna hitam yang menandakan jaringan eksplan mulai mengalami kematian. Mengutip teori totipotensi yang dikemukakan oleh schwann dan scheiden bahwasanya dalam masing-masing sel tumbuhan mengandung informasi genetik dan sarana fisiologis tertentu yang mampu membentuk tanaman lengkap bila ditempatkan dalam lingkungan yang sesuai.

Kemungkinan eksplan dari bagian daun tidak terjadi pertumbuhan kalus karena kondisi didalam media tidak mendukung untuk pertumbuhan kalus. Hal ini bisa terjadi karena ketidakcocokan eksplan dengan unsur hara, vitamin ataupun konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tidak sesuai (terlalu tinggi atau terlalu rendah).

Menurut Purba dkk. (2017) dalam penelitiannya menyebutkan bahwasanya makin tinggi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang diberikan, induksi kalus makin terhambat. Penggunaan 2,4-D konsentrasi rendah akan lebih baik dalam menginduksi kalus dibanding konsentrasi tinggi. Hal ini disebabkan karena 2,4-D mempunyai sifat fitotoksitas yang sangat tinggi, bila konsentrasinya berlebihan dalam tanaman.

Zat pengatur tumbuh 2,4-D sering dipakai dalam kegiatan kultur in vitro karena bersifat stabil dan tidak mudah mengalami kerusakan oleh cahaya maupun pemanasan pada waktu sterilisasi dengan suhu tinggi. Penambahan 2,4-D

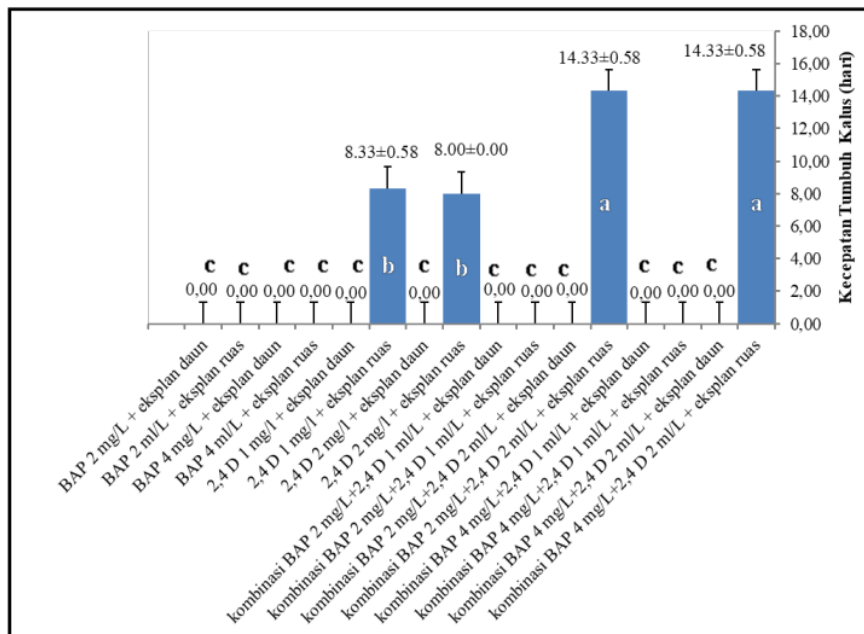
diberikan kedalam media kultur bertujuan untuk merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan.



Gambar 12: Penampakan eksplan daun pada berbagai media perlakuan (a) BAP 2 ml.l⁻¹ (b) BAP 4 ml.l⁻¹ (c) 2,4-D 1 ml.l⁻¹ (d) 2,4-D 2 ml.l⁻¹ (e) BAP 2 ml.l⁻¹ + 2,4-D 1 ml.l⁻¹ (f) BAP 2 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹ (g) BAP 4 ml.l⁻¹ + 2,4-D 1 ml.l⁻¹ (h) BAP 4 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹

Pada bagian daun terlihat beberapa mengalami pencoklatan (browning). Terdapat banyak faktor yang menyebabkan terjadinya browning pada eksplan, warna menjadi coklat browning dapat terjadi karena akumulasi polifenol oksidase yang dilepas atau disintesis jaringan dalam kondisi teroksidasi ketika sel dilukai, bagian tanaman yang diisolasi menjadi berwarna coklat atau berubah menjadi kehitaman dan akhirnya eksplan gagal untuk tumbuh. Sintesis senyawa fenol yang menutupi seluruh permukaan eksplan daun dapat menghambat pertumbuhan kalus bahkan dapat menyebabkan gagal tumbuh atau kematian pada eksplan. Berdasarkan hasil foto diatas menunjukkan bahwasanya pada eksplan daun

diperoleh hasil bahwasanya eksplan daun tidak terjadi pertumbuhan kalus baik pada media dengan perlakuan tunggal (2,4 D dan BAP) ataupun media dengan kombinasi antara ZPT 2,4-D dan BAP. Menurut hasil penelitian Zayova dkk. (2020) untuk menumbuhkan kalus baik dari daun ataupun ruas tanaman *Artemisia annua* L bahwasanya kombinasi 3 jenis zat pengatur tumbuh yaitu NAA 2 ml.l^{-1} + 2,4 D 2 ml.l^{-1} + BAP $0,2 \text{ ml.l}^{-1}$ menghasilkan pertumbuhan kalus yang baik, sedangkan untuk regenerasi tunas diperoleh untuk media perlakuan NAA $0,25 \text{ ml.l}^{-1}$ + 2,4 D $0,25 \text{ ml.l}^{-1}$ + BAP 1 ml.l^{-1} . Sehingga pemberian golongan zat pengatur sitokinin BAP harus lebih rendah dibandingkn pemberian zat pengatur tumbuh auksin 2,4 D ke dalam media kultur bila ingin mrnginduksi pertumbuhan kalus.



Gambar 13. Histogram hasil pertumbuhan kalus dalam berbagai komposisi media kultur

Keterangan : Angka-angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Dalam tabel di atas diperoleh hasil pengamatan dengan score 0.00 bahwa dapat diartikan dalam media perlakuan tersebut tidak terjadi pertumbuhan kalus. Untuk media dengan perlakuan BAP tanpa penambahan 2,4-D untuk sumber

eksplan ruas terjadi regenerasi pertumbuhan ke pertumbuhan tunas sehingga dituliskan data nol. Merujuk dari hasil penelitian Birhan (2021) penggunaan zat pengatur tumbuh BAP $0,5 \text{ ml.l}^{-1}$ dengan kombinasi NAA 1 ml.l^{-1} dan BAP $1,5 \text{ ml.l}^{-1}$ menghasilkan tunas eksplan paling tinggi. Hasil yang sama juga diperoleh Taha (2017) bahwasanya pemakaian BA/BAP 2 ml.l^{-1} dengan penambahan NAA $0,5 \text{ ml.l}^{-1}$ menunjukkan pertumbuhan tunas yang terbaik dengan sumber eksplan dari ruas tanaman *yam (Dioscorea spp)*. Hasil penelitian yang telah dilakukan untuk eksplan daun diseluruh media perlakuan tidak terjadi perubahan ke arah pertumbuhan kalus sehingga dituliskan dengan skor nol.

Hasil pengamatan diperoleh perlakuan terbaik adalah eksplan ruas media kultur dengan perlakuan 2,4D 2 ml.l^{-1} yaitu 8.00 namun tidak berbeda nyata dengan media perlakuan 2,4-D 1 ml.l^{-1} dengan skor 8.33. diikuti perlakuan media kultur kombinasi BAP + 2,4-D yaitu perlakuan BAP 2 ml.l^{-1} + 2,4-D 2 ml.l^{-1} dan BAP 4 ml.l^{-1} dan 2,4-D 2 ml.l^{-1} dengan skor rata-rata 14.3. untuk kombinasi BAP 2 ml.l^{-1} + 2,4-D 1 ml.l^{-1} dan BAP 4 ml.l^{-1} + 2,4-D 1 ml.l^{-1} tidak terjadi pembentukan kalus namun hanya terjadi pembengkakan saja. Hal ini menunjukkan bahwasanya konsentrasi 2,4-D yang lebih rendah belum mampu mengimbangi konsentrasi BAP dengan konsentrasi yang lebih tinggi dalam pembentukan kalus.

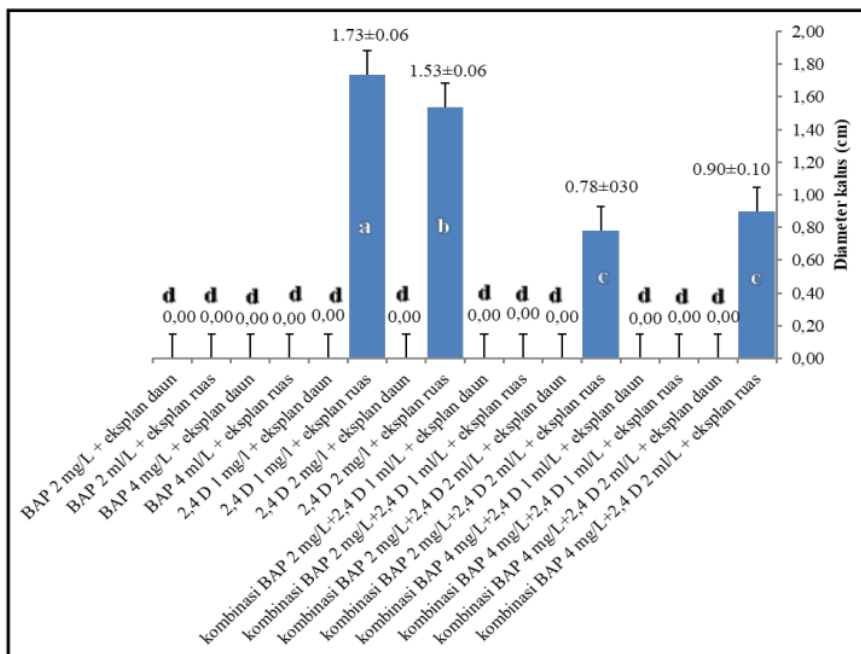
4.7. Pengamatan Kuantitatif Diameter Kalus

Pengamatan diameter kalus dilakukan untuk melihat perkembangan kalus, kalus yang mengalami perkembangan menandakan bahwa sel-sel yang terbentuk hidup. Penambahan ZPT eksogen ditujukan untuk memacu perkembangan kalus lebih cepat. Menurut Anggraeni (2022) interaksi auksin dan sitokinin dengan hormon endogen menentukan pola pertumbuhan eskplan. Jumlah dan jenis ZPT yang diberikan akan menentukan ZPT endogen pada eksplan akan mendukung atau menghambat kinerja ZPT. Interaksi pada ZPT eksogen yang diberikan dengan hormon endogen oleh sel tanaman akan menentukan arah perkembangan suatu kultur.

Dalam proses pembentukan kalus tidak terlepas dari pembelahan, pembesaran, dan perpanjangan sel. Auksin berperan dalam pembentukan kalus

tersebut, sehingga auksin dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel, sehingga air, ion-ion organik dan molekul-molekul anorganik masuk ke dalam sel. Hal ini ditunjukkan dengan terjadinya pertambahan ukuran dan berat kering kalus yang tidak dapat balik. Pertumbuhan berkaitan dengan pertambahan volume dan jumlah sel, pembentukan protoplasma baru, pertambahan berat dan selanjutnya meningkatkan berat keringnya (Setiawati, 2019).

Kalus merupakan sekumpulan sel *amorphous* (tidak berbentuk atau belum terdiferensiasi) yang terbentuk dari sel-sel yang membelah terus menerus, dengan demikian semakin besar pembentukan kalus menandakan bahwasanya sel tersebut aktif. Perkembangan kalus dapat dipengaruhi oleh kandungan ZPT yang dicampurkan dalam media kultur, namun tidak selalu komposisi ZPT yang diberikan dapat mempengaruhi pertumbuhan atau induksi kalus. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan media dengan perlakuan 2,4-D 1 mL.l^{-1} menunjukkan hasil yang terbaik media dengan perlakuan 2,4-D 2 mL/L dan terakhir media dengan kombinasi BAP + 2,4-D.

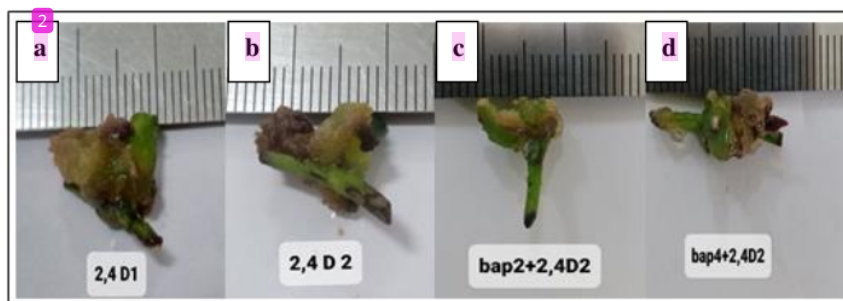


Gambar 14. Histogram hasil pengukuran diameter kalus tanaman gembili aksesi Papua Barat dalam berbagai komposisi media kultur.

Keterangan : Angka-angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Dari tabel diatas dapat disimpulkan bahwa penambahan BAP dalam media yang mengandung 2,4-D telah menghambat pertumbuhan kalus, karena zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin dengan dosis rendah mengarah ke pertumbuhan tunas. Penambahan BAP 2 ml.l⁻¹ dan 4 ml.l⁻¹ tidak dapat membantu dalam pembentukan kalus namun menghambat pertumbuhan kalus. Karena antara zpt sitokinin dan auksin fungsinya saling bertolak belakang, sehingga dengan penambahan konsentrasi BAP 2 ml.l⁻¹ dan 4 ml.l⁻¹ mungkin saja merupakan konsentrasi rendah sehingga tidak dapat mengimbangi peran 2,4-D dalam merangsang pertumbuhan dan perkembangan eksplan daun dalam pembentukan kalus.

Menurut Indarto (2019) dalam buku pelatihan kultur jaringan PT. Inagro menyebutkan bahwasanya konsentrasi sitokinin rendah akan mempengaruhi pertumbuhan tunas namun pemakaian konsentrasi tinggi akan merangsang eksplan untuk mengarah ke pertumbuhan kalus. Kalus dari eksplan daun mungkin saja akan terbentuk bila BAP digunakan dalam dosis tinggi dengan penambahan 2,4-D dalam dosis atau konsentrasi rendah.



Gambar 15. Penampakan diameter kalus yang tumbuh pada perlakuan media kultur dengan penambahan ZPT (a) 2,4-D 1 ml.l⁻¹, (b) 2,4-D 2 ml.l⁻¹ (c) BAP 2 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹, (d) BAP 4 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹.

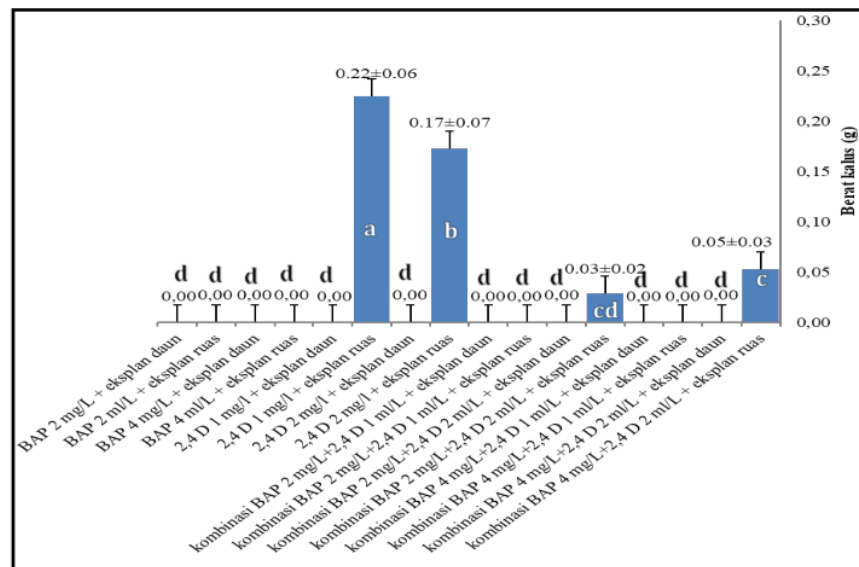
Harahap dkk. (2018) melakukan pengujian pada daun Ananas comosus dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin, diperoleh hasil bahwa pemberian 2,4-D tanpa kinetin menghasilkan tinggi kalus tertinggi. Hal ini menandakan, pemberian 2,4-D memberikan pengaruh terhadap tinggi kalus. Penambahan 2,4-D dalam media dapat merangsang pembelahan dan pembesaran

sel sehingga memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus. Menurut Habibah (2021) penambahan zat pengatur tumbuh auksin 2,4-D kedalam medium kultur ternyata mampu mempercepat proses pembelahan sel dan pembesaran sel pada eksplan tanaman yang dikultur sehingga pembentukan dan pertumbuhan kalus mengalami peningkatan.

4.8. Pengamatan Kuantitatif Berat Kalus

Pengukuran bobot segar kalus dapat merepresentasikan variabel pertumbuhan kalus. Menurut Andaryani (2019) bahwa berat segar fisiologis terdiri dari dua bahan, yaitu air dan karbohidrat. Bobot segar kalus yang besar disebabkan oleh kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel ini membelah, berkembang biak dan berlanjut dengan pembesaran kalus.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Silvina dkk. (2021), menyimpulkan bahwasanya pembelahan sel yang optimal dapat menyebabkan pertumbuhan kalus yang optimal sehingga menambah berat segar kalus. Hasil berat kalus yang berbeda-beda menandakan bahwa sel pada tanaman memiliki respon kemampuan absorpsi air yang berbeda.



Gambar 16. Histogram Hasil pengamatan berat kalus tanaman gembili aksesori Papua Barat dalam berbagai komposisi media kultur

Keterangan : Angka-angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Hasil pengamatan di peroleh bahwasanya nilai terbaik untuk bobot basah kalus diperoleh pada perlakuan media kultur dengan penambahan konsentrasi 2,4-D 1 ml.l⁻¹ dengan nilai 0.22 mg diikuti media kultur dengan perlakuan konsentrasi 2,4-D 2 ml.l⁻¹ dengan nilai 0.17. Sedangkan perlakuan media kultur kombinasi BAP + 2,4-D menghasilkan data tidak berbeda nyata untuk perlakuan media komposisi BAP 2 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹ dengan BAP 4 ml.l⁻¹ + 2,4-D 2 ml.l⁻¹ diperoleh nilai 0.02 mg dan 0.05 mg. Perlakuan kombinasi zpt BAP + 2,4-D juga menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan seluruh media perlakuan dengan bahan ekplan daun gambeli, dimana notasi masih menunjukkan notasi yang sama yaitu notasi d.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian perbanyakan gembili (*Dioscorea esculenta* L.) aksesori asal papua barat melalui induksi kalus secara in vitro adalah sebagai berikut.

1. Aplikasi 2,4-D dengan konsentrasi 1 ml.l⁻¹ dan 2ml.l⁻¹ sangat berpengaruh dalam pembentukan kalus tanaman gembili aksesori papua barat asal eksplan ruas, namun aplikasi 2,4-D dengan konsentrasi 1 ml.l⁻¹ dan 2ml.l⁻¹ belum sepenuhnya dapat mempengaruhi terhadap pertumbuhan kalus asal eksplan daun.
2. Aplikasi BAP dengan konsentrasi 2 ml.l⁻¹ dan 4 ml.l⁻¹ tidak berpengaruh dalam pembentukan kalus tanaman gembili aksesori papua barat asal eksplan ruas dan daun, namun BAP dengan konsentrasi 2 ml.l⁻¹ dan 4 ml.l⁻¹ menunjukkan pertumbuhan regenerasi tunas aksilar dari asal eksplan ruas.
3. Penambahan 2,4-D dan BAP terhadap sumber eksplan ruas terdapat kombinasi 2,4-D dan BAP yang dapat merangsang pertumbuhan kalus yaitu kombinasi BAP 2 ml.l⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l⁻¹ serta BAP 4 ml.l⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l⁻¹, namun untuk eksplan daun tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui jenis ZPT dan konsentrasi yang tepat untuk menumbuhkan kalus ataupun tunas dari berbagai sumber eksplan bagian tanaman.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk melanjutkan penelitian ke arah dediferensiasi kalus ke pertumbuhan tunas (vegetatif).

DAFTAR PUSTAKA

- Andaryani, S., Samanhudi, S., & Yunus, A. (2022). Effect of BAP and 2,4-D on callus induction of *Jatropha curcas* in vitro. *Cell Biology and Development*, 3(2). <https://doi.org/10.13057/cellbioldev/v030202>
- Anggraeni, D., Ismaini, L., Surya, M. I., Rahmi, H., & Saputro, N. W. (2022). Inisiasi Kalus Daun *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-Dichlorophenoxyatic Acid dan Benzyl Adenine. *Agrikultura*, 33(3), 276. <https://doi.org/10.24198/agrikultura.v33i3.40540>
- Apensa, V., & Mastuti, R. (2018). Effect of Banana Homogenate on Shoot Regeneration of Ciplukan (*Physalis angulata* L.). *The Journal of Experimental Life Sciences*, 8(1), 53–60. <https://doi.org/10.21776/ub.jels.2018.008.01.09>
- Birhan, D., Obsi, D., & Mulugeta, K. (1970). Protocol optimisation for micropropagation of Ethiopian yam. *African Crop Science Journal*, 29(1), 43–57. <https://doi.org/10.4314/acsj.v29i1.4>
- Budiarto, K., Raharjo, I. B., Hanudin, H., & Nuryani, W. (2020). Konservasi in vitro dua aksesi lili melalui modifikasi media kultur. *Jurnal Agro*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.15575/4179>
- Departemen Kesehatan Rakyat Indonesia. (2014). Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2014. (di akses dari <http://www.depkes.go.id> pada tanggal 28 Juni 2022).
- Diantina, S., & Hutami, S. (2014). Perbanyak Gembili (*Dioscorea esculenta*) dan Ubi Kelapa (*Dioscorea alata*) Menggunakan Bibit Set Mini. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 33(3), 196. <https://doi.org/10.21082/jpntp.v33n3.2014.p196-201>
- Gunawan, L.W. (1992). Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Habibah, N. A. (2021). *Produksi Senyawa Bioaktif dari Kultur Kalus Gembili (Dioscorea esculenta)*. Deepublish. Sleman
- Handayani, Rd. S., Yunus, I., Sayuti, M., & Irawan, E. (2019). In-vitro Callus Induction of Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Leaves Using Kinetin and 2,4-D (Dichlorophenoxyacetic acid). *Journal of Tropical Horticulture*, 2(2), 59. <https://doi.org/10.33089/jthort.v2i2.23>

- Harahap, F., Djulia, E., Purnama, D., Poerwanto, R., & Ananda, K. R. (2018). Pertumbuhan kalus nanas (*Ananas comosus* L.) Siphatar dengan eksplan daun in vitro hasil perlakuan zat pengatur tumbuh. Prosiding Seminar Nasional Biologi dan Pembelajarannya. Unimed, Medan.
- Herlina, H. (2019). Penggunaan Tepung Glukomanan dari Umbi Gembili (*Dioscorea esculenta* L.) pada Pembuatan Es Krim. *agriTECH*, 38(4), 404-412. <https://doi.org/10.22146/agritech.16907>
- Illahi, A. K., Ratnasari, E., & Dewi, S. K. (2022). Pengaruh 2,4-D terhadap Pertumbuhan Kalus Daun *Diospyros discolor* Willd pada Media MS secara in Vitro. *Lentera bio*, 11(3), 369-377.
- Indarto. (2019). *Panduan Pelatihan Kultur Jaringan*. Bogor
- IPGRI/IITA. (1997). Descriptors for Gembili (*Dioscorea* spp.). International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Isnaini, Y., & Novitasari, Y. (2020). Regenerasi Tunas Suweg (*Amorphophallus paeoniifolius* (Dennst.) Nicolson) pada Berbagai Konsentrasi BAP dan NAA dengan Kondisi Penyimpanan Terang dan Gelap. *Agriprima: Journal of Applied Agricultural Sciences*, 4(2), 94–105. <https://doi.org/10.25047/agriprima.v4i2.375>
- Mahmod, N. H., Mustapha, Z., Ariffin Husni, A. H., Ishak, N. A., & Jaafar, H. (2020). Shoot Generation and Callus Induction of *Dioscorea hispida* Dennst by Different Plant Growth Hormones and Basal Media. *Journal Of Agrobiotechnology*, 11(2), 30–38. <https://doi.org/10.37231/jab.2020.11.2.222>
- Mulyaningsih, A., & Astuti, A. (2021). Faktor-Faktor Yang Berpengaruh Terhadap Keberdayaan Petani Dalam Mencapai Diversifikasi Pangan. *Jurnal Agribisnis Terpadu*, 14(1), 137-152. <https://doi.org/10.33512/jat.v14i1.11463>
- Nisa, I.F., Candra, N.D., Zahro, A.F., Khotimah, N., Darmawan, A.E., Sunarno. (2020). Analisis Proksimat Beras Analog Biji Lamun, Latoh, Dan Tepung Mocaf Sebagai Alternatif Makanan Pokok Berprotein. *Bina wakya*, 15(1), 3877-3884.
- Pudjianto, TU. (2014). Budidaya Gembili. <http://agri-tani.blogspot.com/2014/02/budidaya-gembili.html> diakses 18 Oktober 2021.
- Purba, R. V., Yuswanti, H., & Astawa, I. N. G. (2017). Induksi Kalus Eksplan daun Tanaman Anggur (*Vitis vinivera* L.) dengan Aplikasi 2,4-D Secara in Vitro. 6(2), 218-228. <http://ojs.unud.ac.id/index.php/JAT>

- Rosmaina, R., Endika, R., & Zulfahmi, Z. (2021). Studi Pengaruh Media Alternatif Untuk Perbanyak Pisang Barangan (*Musa Acuminata* L.) Secara In-Vitro. *Jurnal Agroteknologi*, 12(1), 33-40. <https://doi.org/10.24014/ja.v12i1.12425>
- Sabda, M., Wulanningtyas, H. S., Ondikeleuw, M., & Baliadi, Y. (2019). Characterization of Potential Local Gembili (*Dioscorea esculenta* L) from Papua as Alternative of Staple Food. *Buletin Plasma Nutfah*, 25(1), 25-32. <https://doi.org/10.21082/blpn.v25n1.2019.p25-32>
- Sagharyan, M., Ganjeali, A., Cheniany, M., & Mousavi Kouhi, S. M. (2020). Optimization of Callus Induction with Enhancing Production of Phenolic Compounds Production and Antioxidants Activity in Callus Cultures of *Nepeta binaloudensis* Jamzad (Lamiaceae). *Iranian Journal of Biotechnology*, 18(4), 47-48. <https://doi.org/10.30498/IJB.2020.2621>
- Sandra, E. (2020). *Rahasia membuat tanaman mutasi dan variegata*. EdwritePublishing.
- Sandra, E., & Hapsiati. (2016). *Pengantar praktikum pelatihan kultur jaringan*. Esha flora.
- Sandra, E., Hapsiati, Zahra, A., & Denish, A. (2016). *Panduan materi kultur jaringan*. Esha flora.
- Sareu, P. L., Nurhaeni, Ridhay, A., Mirzan, Moh., & Syamsuddin. (2021). Ekstraksi Glukomanan dari Umbi Gembili (*Dioscorea esculenta* L.): Extraction of Glucomannan from Gembili Bulbs (*Dioscorea esculenta* L.). *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 7(1), 51–58. <https://doi.org/10.22487/kovalen.2021.v7.i1.12008>
- Setiawati, T., Ayalla, A., & Witri, A. (2019). *Induksi Kalus Krisan (Chrysanthemum morifolium Ramat.) dengan Penambahan Berbagai Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)*. *Jurnal EduMatSains*, 3(2), 119-132.
- Shofiyani, A. (2017). *Pertumbuhan Kalus Kencur (Kaemferia Galanga L) Pada Komposisi Media Dengan Perlakuan Sukrosa Dan Zat Pengatur Tumbuh*. *Agritech*, 19(1), 55-64.
- Silalahi, M., Adinugraha, F. (2019). *Penuntun Praktikum Morfologi Tumbuhan*. UKI PRESS. Jakarta Timur.
- Silvina, F., Isnaini, I., & Ningsih, W. (2022). Induksi kalus daun binahong merah (*Basella rubra* L.) dengan pemberian 2,4-D dan kinetin. *Jurnal AGRO*, 8(2), 274–286. <https://doi.org/10.15575/14273>

- Sri Puspitasari, A. D., & Habibah, N. A. (2021). Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D dan Kinetin terhadap Pertumbuhan dan Morfologi Sel Gembili (*Dioscorea esculenta*). *Life Science*, *10*(2), 191–200. <https://doi.org/10.15294/lifesci.v10i2.54460>
- Suleman, R., Kandowangko, N. Y., & Abdul, A. (2019). Karakterisasi Morfologi Dan Analisis Proksimat Jagung (*Zea mays*, L.) Varietas Momala Gorontalo. *Jambura Edu Biosfer Journal*, *1*(2), 72–81. <https://doi.org/10.34312/jebj.v1i2.2432>
- Sulistiani, E., & Yani, S. A. (2012). *Produksi bibit tanaman dengan menggunakan teknik kultur jaringan*. Bogor.
- Sulistiani, E., & Yani, S. A. (2014). *Kultur jaringan rumput laut kotoni (kappaphycus alvarezii)*. Bogor.
- Taha, S.S., Abdelaziz, M.E., (2017) In Vitro Propagation of Yam Via Nodal Segment Culture. *Innovative Scientific Information and Services Network Journal*, *14* (4): 1217-1222.
- Undang-undang RI No 18. (2012). Tentang Pangan. Jakarta.
- Zayova, E., Nedev, T., Petrova, D., Zhiponova, M., Kapchina, V., & Chaneva, G. (2020). Tissue Culture Applications of *Artemisia annua* L. Callus for Indirect Organogenesis and Production Phytochemical. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, *30*(1), 97–106. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v30i1.47795>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel analisis variansi untuk hari tumbuh kalus

SK	DB	JK	KT	Fhit	P
kelompok	2	0.13	0.0625	1.00	0.3798
perlakuan	15	1253.31	83.5542	1336.87	0.0000
Error	30	1.88	0.0625		
Total	47	1255.31			

Grand Mean	2.8125	KK 8.89
------------	--------	---------

Lampiran 2. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari hari kalus untuk kelompok

kelompok	Rerata	Notasi
3	2.8750	a
2	2.8125	a
1	2.7500	a

Tingkat kepercayaan 0.05 (95%)

Nilai Sd 0.0884

F tabel 2.042

Nilai BNT 0.1805

Lampiran 3. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari hari kalus untuk perlakuan

perlakuan	Rerata	Notasi
BAP 2 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (ruas)	14.333	a
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (ruas)	14.333	a
2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (ruas)	8.3333	b
2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (ruas)	8.0000	b
BAP 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.0000	c
BAP 2 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.0000	c
BAP 2ml.l ⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.0000	c
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (daun)	0.0000	c
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.0000	c
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.0000	c
BAP 2 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.0000	c
BAP 4 ml.l ⁻¹ (daun)	0.0000	c
BAP 4 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.0000	c
2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (daun)	0.0000	c
2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.0000	c
BAP 2 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (daun)	0.0000	c

Tingkat Kepercayaan 0.05 (95%)

Nilai Sd 0.2041

T tabel 2.042

Nilai BNT 0.4169

Lampiran 4. Tabel analisis variansi untuk diameter kalus data belum di transformasi

SK	DB	JK	KT	Fhit	P
kelompok	2	0.0059	0.00297	0.43	0.6570
perlakuan	15	15.7433	1.04955	150.61	0.0000
Error	30	0.2091	0.00697		
Total	47	15.9583			
Grand Mean	0.3094	KK 26.98			

Lampiran 5. Tabel analisis variansi untuk diameter kalus transfor sqrt+0.5

SK	DB	JK	KT	Fhit	P
kelompok	2	0.00112	0.00056	0.44	0.6482
perlakuan	15	3.48585	0.23239	183.06	0.0000
Error	30	0.03808	0.00127		
Total	47	3.52505			
Grand Mean	0.8590	KK 4.15			

Lampiran 6. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari diameter kalus kelompok

kelompok	Rerata	Notasi
2	0.8656	a
1	0.8569	a
3	0.8544	a

Tingkat kepercayaan 0.05 (95%)

Nilai Sd 0.0126

T Tabel 2.042

Nilai BNT 0.0257

Lampiran 7. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari diameter kalus perlakuan

perlakuan	Rerata	Notasi
2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (ruas)	1.4933	a
2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (ruas)	1.4233	b
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (ruas)	1.1800	c
BAP 2 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 2ml.l ⁻¹ (ruas)	1.1267	c
BAP 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 2 ml.l ⁻¹ + 2,4D 1 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.7100	d
BAP 2 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.7100	d
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 2 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.7100	d
BAP 4 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 4 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.7100	d
2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 2 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d

Tingkat kepercayaan 0.05 (95%)

Nilai Sd 0.0291

T tabel 2.042

Nilai BNT 0.0594

Lampiran 8. Tabel analisis variansi untuk berat kalus data belum di transformasi

SK	DB	JK	KT	Fhit	P
kelompok	2	0.00024	0.00012	0.18	0.8368
perlakuan	15	0.20869	0.01391	21.15	0.0000
Error	30	0.01974	0.00066		
Total	47	0.22867			

Grand Mean 0.0299 KK 85.74

Lampiran 9. Tabel analisis variansi untuk berat kalus data sudah di transformasi sqrt +0.5

SK	DB	JK	KT	Fhit	P
kelompok	2	0.00009	0.00004	0.18	0.8393
perlakuan	15	0.08239	0.00549	22.13	0.0000
Error	30	0.00745	0.00025		
Total	47	0.08992			

Grand Mean 0.7288 KK 2.16

Lampiran 10. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari berat kalus kelompok

kelompok	Rerata	Notasi
3	0.7300	a
2	0.7294	a
1	0.7269	a

Tingkat kepercayaan 0.05 (95%)

Nilai Sd 5.57003

Critical T Value 2.042

Nilai BNT 0.0114

Lampiran 11. Uji perbandingan semua-berpasangan LSD dari berat kalus perlakuan

perlakuan	Rerata	Notasi
2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.8500	a
2,4 d 2 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.8200	b
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.7433	c
BAP 2 ml + 2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.7267	cd
BAP 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 2 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.7100	d
BAP 2 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.7100	d
BAP 4 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 2 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.7100	d
BAP 4 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 4 ml.l ⁻¹ (ruas)	0.7100	d
2,4 D 1 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
2,4 D 2 ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d
BAP 2 ml.l ⁻¹ + 2,4 D 1ml.l ⁻¹ (daun)	0.7100	d

Tingkat kepercayaan 0.05 (95%) Nilai Sd 0.0129

F. Tabel 2.042

Nilai BNT 0.0263

Lampiran 12. Foto tanaman gembili aksesori papua barat

Keterangan gambar :
(a) penampakan bibit umbi gembili dari papua
(b) pertumbuhan tanaman gembili di nursery
(c) umbi gembili hasil panen di nursery

PERBANYAKAN TANAMAN GEMBILI (*Dioscorea esculenta* L.) AKSESI ASAL PAPUA BARAT MELALUI INDUKSI KALUS SECARA IN-VITRO SEBAGAI SUMBER BAHAN PANGAN ALTERNATIF

ORIGINALITY REPORT

24%

SIMILARITY INDEX

24%

INTERNET SOURCES

7%

PUBLICATIONS

%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	eprints.stiperdharmawacana.ac.id Internet Source	8%
2	journal.uinsgd.ac.id Internet Source	3%
3	jurnal.unpad.ac.id Internet Source	2%
4	www.isisn.org Internet Source	2%
5	pdfs.semanticscholar.org Internet Source	2%
6	ejournal.uki.ac.id Internet Source	1%
7	123dok.com Internet Source	1%
8	www.atlantis-press.com Internet Source	1%

jurnal.untirta.ac.id

9	Internet Source	1 %
10	www.slideshare.net Internet Source	1 %
11	www.studocu.com Internet Source	1 %
12	core.ac.uk Internet Source	1 %
13	e-journal.lppmdianhusada.ac.id Internet Source	1 %
14	journal.ipb.ac.id Internet Source	1 %
15	fr.scribd.com Internet Source	1 %
16	online-journal.unja.ac.id Internet Source	1 %

Exclude quotes On

Exclude matches < 1%

Exclude bibliography On