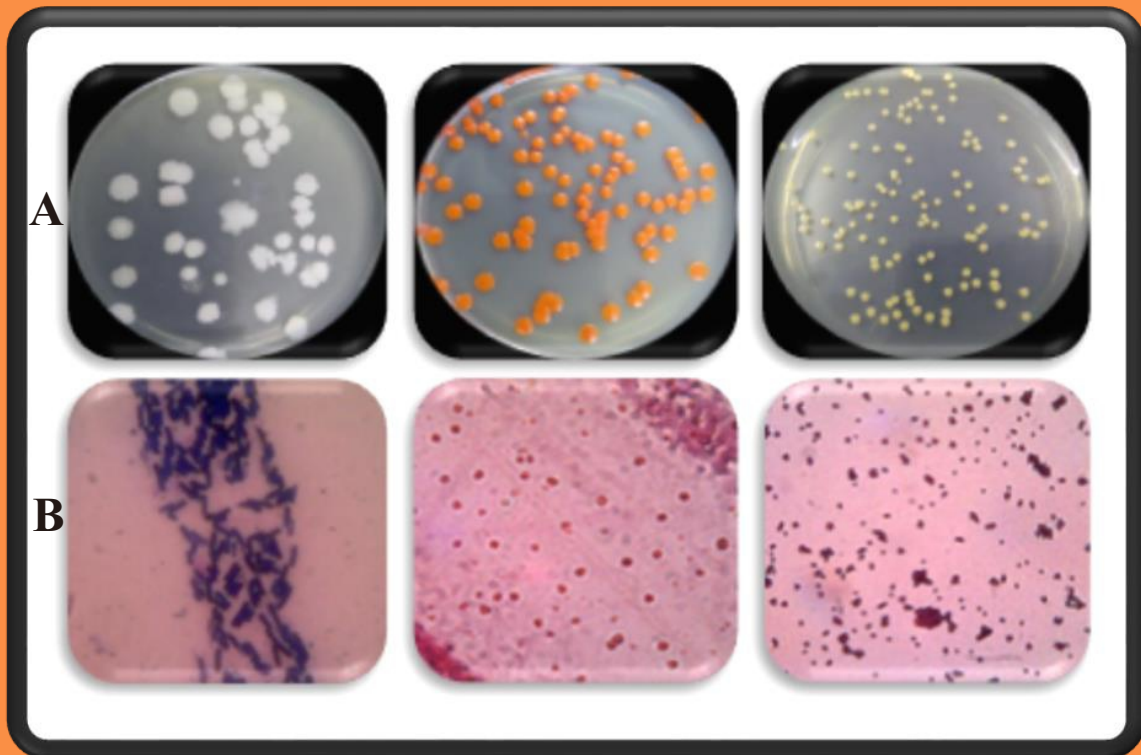


Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati



BERITA BIOLOGI

Vol. 16 No. 1 April 2017

Terakreditasi Berdasarkan Keputusan Kepala Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
No. 636/AU3/P2MI-LIPI/07/2015

Tim Redaksi (*Editorial Team*)

Andria Agusta (Pemimpin Redaksi, *Editor in Chief*)
Kusumadewi Sri Yulita (Redaksi Pelaksana, *Managing Editor*)
Gono Semiadi
Atit Kanti
Siti Sundari
Evi Triana
Kartika Dewi
Dwi Setyo Rini

Desain dan Layout (*Design and Layout*)

Muhamad Ruslan, Fahmi

Kesekretariatan (*Secretary*)

Nira Ariasari, Enok, Budiarmo

Alamat (*Address*)

Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Kompleks Cibinong Science Center (CSC-LIPI)
Jalan Raya Jakarta-Bogor KM 46,
Cibinong 16911, Bogor-Indonesia
Telepon (021) 8765066 - 8765067
Faksimili (021) 8765059
Email: berita.biologi@mail.lipi.go.id
jurnalberitabiologi@yahoo.co.id
jurnalberitabiologi@gmail.com

Keterangan foto cover depan (*Notes of cover picture*): Bentuk koloni isolat bakteri Bt, BLSP-4, dan BLSP-3: (A) pada media pertumbuhan NA dan (B) pada pengamatan secara mikroskopis dengan perbesaran 100x (*Bacterial colony shapes of Bt, BLSP-4 and BLSP-3, respectively: (A) bacterial colony in growth medium NA (B) bacterial colony on 100 x microscopic magnification*), sesuai dengan halaman 15.



ISSN 0126-1754
636/AU3/P2MI-LIPI/07/2015
Volume 16 Nomor 1, April 2017

Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati

Berita Biologi	Vol. 16	No. 1	Hlm. 1 - 110	Bogor, April 2017	ISSN 0126-1754
----------------	---------	-------	--------------	-------------------	----------------

Pusat Penelitian Biologi - LIPI

Ucapan terima kasih kepada
Mitra Bebestari nomor ini
16(1) – April 2017

Dr. Heddy Julistiono
Ir. Suciatmih M.Si.
Dr. Nuril Hidayati
Drs. Awit Suwito, M.Si
Dr. Rizkita Rachmi Esyanti
Prof. Dr. Amarila Malik, MSi., Apt.
Ir. I Gusti Bagus Adwita Arsa, MP.
Dra. Shanti Ratnakomala, M.Si.
Dr. Fenny M. Dwivany
Dr. Ir. Barep Sutiyono, M.S.
Dr. I Made Suidiana, M.Sc.
Dr. Tri Muji Ermayanti
Dr. Ika Roostika Tambunan, SP. MSi.
Ucu Yanu Arbi M.Si.
Vani Nur Oktaviany Subagyo SP., Msi

INDUKSI BIAK KALUS DAN BIAK SUSPENSI SEL *Aquilaria malaccensis* Lam. [Induction of Callus Culture and Cell Suspension Culture of *Aquilaria malaccensis* Lam.]

Aryani Leksonowati^{1,2✉}, Witjaksono² dan Diah Ratnadewi³

✉¹Mahasiswa Pascasarjana, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Pertanian Bogor, kampus Dramaga, Bogor 16680

²Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong Science Center,
Jl. Raya Bogor-Jakarta Km 46, Cibinong, Bogor

³Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Pertanian Bogor, kampus Dramaga, Bogor 16680
email : ryani_like@yahoo.com

ABSTRACT

Aquilaria malaccensis Lam. is a plant species producing fragrant woody material that contains some resins. The compounds can be used as medicine and perfume. Sesquiterpenoid, one group of compounds has been found being synthesized and subsequently extracted from callus and cell suspension culture of *Aquilaria* species. The aim of this research was to find a method of producing friable calli and cell suspension cultures from leaves or internodes of *A. malaccensis* *in vitro* by using suitable plant growth regulators; cell suspension that will suitably serve as material to produce sesquiterpenoid afterwards. Calli were established in almost all treatments of auxin-cytokinin on both leaves and internod explants. The treatment of 10 mg/L IBA induced the highest percentage of callus coverage from leaves with a rather compact structure. The combined treatment of 1–2 mg/L 2,4-D and 0.2–0.3 mg/L BA induced friable callus formation in more than 80% of cultures with 27–32% callus coverage percentage. The use of 2,4-D induced a better formation of cell suspension than Picloram, with maximum volume up to 7 mL. Cell suspension culture with fine and homogenous aggregate could be established in the medium supplemented with 0.5–1 mg/L 2,4-D.

Key word: *Aquilaria malaccensis*, callus induction, cell suspension culture, plant growth regulator

ABSTRAK

Aquilaria malaccensis Lam. merupakan tumbuhan penghasil gubal gaharu yang mengandung resin wangi. Senyawa tersebut dimanfaatkan untuk keperluan industri parfum dan obat-obatan. Sesquiterpena, salah satu komponen gubal gaharu dapat diekstraksi melalui kultur kalus dan suspensi sel dari spesies *Aquilaria*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode induksi biak kalus remah dan suspensi sel dari potongan daun atau ruas batang *A. malaccensis in vitro* melalui penambahan zat pengatur tumbuh yang tepat, sebagai bahan untuk memproduksi sesquiterpena. Kalus dapat diinduksi hampir dari semua perlakuan auksin-sitokinin pada inokulum potongan daun dan ruas batang. Perlakuan 10 mg/L IBA menginduksi semua ekplan potongan daun membentuk kalus dengan persentase penutupan mencapai 50% dengan struktur yang agak kompak. Kombinasi 1–2 mg/L 2,4-D dan 0,2–0,3 mg/L BA pada inokulum daun juga efektif untuk menginduksi terbentuknya kalus dengan struktur remah hingga lebih dari 80% dengan persentase penutupan kalus 27–32%. Perlakuan 2,4-D lebih baik dalam menginduksi terbentuknya suspensi sel dibanding Picloram, dengan volume maksimum mencapai 7 mL. Kultur suspensi dengan kumpulan sel yang halus dan homogen dapat dicapai pada penambahan 0,5–1 mg/L 2,4-D.

Kata kunci : *Aquilaria malaccensis*, induksi kalus, kultur suspensi sel, zat pengatur tumbuh.

PENDAHULUAN

Tumbuhan gaharu *Aquilaria malaccensis* Lam. (genus *Aquilaria*) merupakan salah satu jenis tumbuhan penghasil gubal gaharu yang dikategorikan sebagai hasil hutan bukan kayu (HHBK). Tumbuhan ini tersebar di India, Burma, Malaysia, Filipina dan Indonesia. *Aquilaria malaccensis* banyak diburu karena adanya resin wangi dengan senyawa aktif berupa sesquiterpena dan kromona, yang dapat dimanfaatkan secara luas untuk keperluan industri parfum, kosmetik, dan obat-obatan (Akter *et al.*, 2013; Subasinghe *et al.*, 2012). Resin tersebut dihasilkan tumbuhan sebagai respon dari masuknya patogen ke dalam jaringan yang terluka baik secara alami maupun disengaja (Ng *et al.*, 1997). Sejak tahun 1995, tumbuhan gaharu *A. malaccensis* dimasukkan dalam daftar Appendix II

CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) dimana perdagangannya dibatasi dengan kuota agar kepunahan spesies tanaman ini dapat dicegah akibat adanya perburuan liar (Barden *et al.*, 2000).

Beberapa alternatif solusi telah dicoba untuk mengatasi penurunan populasi gaharu di alam yaitu budidaya tanaman gaharu dan inokulasi buatan dengan memasukkan inokulum patogenik ke dalamnya untuk mendapatkan resin wangi gaharu. Namun cara ini memiliki kelemahan antara lain memerlukan budidaya dalam skala besar dan lama serta konsistensi keberhasilan yang rendah (Azah *et al.*, 2008). Alternatif solusi lain yaitu produksi resin wangi melalui kultur suspensi sel dari spesies *Aquilaria*, yang diharapkan lebih efektif karena dapat menghemat lahan tanam, lebih cepat dan

efisien (Ito *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2005; Okudera and Ito, 2009; Jayaraman dan Mohamed, 2015).

Beberapa penelitian induksi seskuiterpena melalui kalus dan suspensi sudah pernah dilakukan. Menurut Okudera dan Ito (2009), kalus dari galur *A. crassna* dari Vietnam (n6) dan Thailand (ti, tr) serta *A. sinensis* (sr) terdeteksi dapat menghasilkan senyawa seskuiterpena seperti α -guaiaena, α -humulena dan δ -guaiaena. Menurut Rijal (2011), seskuiterpena yang dihasilkan akibat interaksi kalus *A. malaccensis* dengan cendawan *Fusarium* galur A Gaharu, B Gaharu dan *F. solani* galur LIPI MC 744 adalah *cis*- α -bisabolena, β -elemena dan α -guaiaena. Menurut Jayaraman and Mohamed (2015), pada kombinasi 8 g/L inokulum kalus pada suspensi *A. malaccensis* dan 8 mg/L ekstrak *Trichoderma* terdeteksi beberapa senyawa penting gaharu seperti 8-epi-gama-eudesmol, α -guaiaena, dan aloaromadendrena oksida-1.

Metode induksi biak kalus dan suspensi sel gaharu yang efektif dan efisien sangat diperlukan sebagai bahan inokulum penelitian induksi seskuiterpena. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode induksi kalus remah dan biak suspensi sel dari potongan daun atau ruas batang *A. malaccensis in vitro* dengan penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) auksin dan sitokinin yang tepat.

BAHAN DAN CARA KERJA

Medium tumbuh dan faktor lingkungan tumbuh biak. Medium dasar yang dipakai adalah formulasi MS (Murashige and Skoog, 1962) dengan penambahan sukrosa 30 g/L, dan ZPT auksin dan sitokinin sesuai perlakuan. Medium padat menggunakan bahan pematik Gelrite 2 g/L. Sebelum ditambahkan Gelrite, medium tumbuh diatur pHnya antara 5,7–5,8 dengan menambahkan larutan penyangga 0,1 N HCl atau KOH. Setelah itu medium diautoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 15 Psi selama 20 menit. Medium kemudian dituang secara aseptik ke *Petri dish* steril berukuran 90 mm × 20 mm, masing-masing sebanyak 25 mL. Medium tumbuh disimpan dalam lemari pada ruangan bersuhu 25 °C minimal sehari sebelum dipergunakan.

Bahan tanaman. Sumber eksplan yang digunakan dalam percobaan ini adalah daun dan ruas batang dari planlet gaharu *A. malaccensis* yang dipelihara secara *in vitro* (koleksi Laboratorium Biak Sel dan Jaringan, Pusat Penelitian Biologi-LIPI) berumur 2 bulan pada subkultur terakhir. Daun pada posisi kedua sampai dengan keempat dari pucuk dipotong pada kedua sisinya, dengan ukuran sekitar 0,5 x 0,8 cm². Potongan daun ini ditanam pada medium perlakuan yang terdiri dari 3–4 ulangan (*Petri dish*), dan masing-masing *Petri dish* diisi 14 eksplan. Untuk eksplan ruas batang, ditumbuhkan terlebih dahulu pada medium MS ditambah 0,5 mg/L Giberelin (GA) untuk menginduksi pemanjangan ruasnya. Ruas batang yang dipakai untuk bahan percobaan berukuran panjang sekitar 0,5–0,8 cm, setiap perlakuannya terdiri dari 3–5 ulangan (*Petri dish*), dan masing-masing *Petri dish* diisi 5 eksplan.

Inisiasi biak kalus gaharu. Induksi kalus *A. malaccensis* dari eksplan potongan daun dipelajari dengan perlakuan tunggal ZPT auksin 4-amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylic acid atau Picloram (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 mg/L), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid atau 2,4-D (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 mg/L), indole-3-acetic acid atau IAA (0; 5, 10, 15 mg/L) dan indole-3-butyric acid atau IBA (0; 5, 10, 15 mg/L). Selain itu, dicoba pula kombinasi auksin-auksin atau auksin-sitokinin yaitu kombinasi 2,4-D (1 dan 2 mg/L) dan 1-naphthaleneacetic acid atau NAA (0; 0,1; 0,5; 1 mg/L), kombinasi 2,4-D (1 dan 2 mg/L) dan benzyl adenine atau BA (0; 0,1; 0,2; 0,3 mg/L), kombinasi NAA (0; 0,1; 0,5; 1 mg/L) dan BA (0,1 dan 0,2 mg/L), kombinasi IBA (0,5; 1; 5; 10; 15 mg/L) dan BA (0; 0,1; 0,2; 0,3 mg/L) untuk menginduksi terbentuknya kalus. Untuk ruas batang digunakan medium MS dengan perlakuan 2,4-D (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 mg/L), serta kombinasi 2,4-D (1 dan 2 mg/L) dan BA (0; 0,1; 0,2; 0,3 mg/L). Jenis dan kisaran ZPT yang diberikan berdasarkan penelitian sebelumnya pada tanaman sejenis (*unpublished*) dan modifikasi beberapa literatur (Qi *et al.*, 2005; Okudera and Ito, 2009). Parameter persentase hidup, pembentukan kalus, penutupan kalus, serta tipe kalus diamati pada umur 1 bulan setelah inisiasi. Persentase kalus dihitung dari jumlah eksplan yang membentuk kalus dibandingkan dengan jumlah yang

ditanam, sedangkan persentase penutupan kalus diperoleh dari seberapa luas kalus yang terbentuk telah menutup eksplan daun atau ruas batang. Data ditampilkan dalam bentuk rata-rata dan standar error (SE). Data diolah menggunakan SAS versi 9.0 untuk analisis sidik ragam diikuti oleh *Duncan's multiple range test* (DMRT) pada selang kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Parameter tipe kalus dikategorikan menjadi beberapa macam yaitu agak remah, cukup remah, remah, agak kompak, cukup kompak, kompak, mengapas atau nodular. Salah satu kombinasi formulasi medium dan ZPT yang menghasilkan pertumbuhan kalus remah, tumbuh cepat dan tingkat induksi tinggi dipergunakan sebagai medium proliferasi kalus pada perlakuan suspensi sel gaharu. Inisiasi dan proliferasi kalus dilakukan di ruang gelap dengan suhu sekitar 25 °C.

Inisiasi dan pemeliharaan biak suspensi sel gaharu. Sekitar 0,3 g kalus remah yang terbentuk dari eksplan yang tumbuh pada medium padat ditransfer ke medium cair untuk membuat kultur suspensi sel. Perlakuan yang digunakan adalah auksin 2,4-D (4 ulangan) dan Picloram (3 ulangan) secara tunggal, dengan konsentrasi masing-masing 0,1; 0,5; 1; 2; 5 mg/L. Agregat kalus dicacah sampai ukuran kecil (sekitar 1 mm) lalu dimasukkan ke dalam 25 mL medium pada labu *Erlenmeyer* 100 mL kemudian digoyang di atas *shaker* dengan kecepatan 120 rpm agar menghasilkan suspensi yang homogen. Ruang kultur diatur suhunya sekitar 22–25 °C, tanpa pencahayaan lampu (redup). Pertumbuhan biak suspensi diukur tiap minggu dari minggu ke-1 sampai minggu terakhir (*fase stationary*) dengan cara memindahkan secara aseptik seluruh sel suspensi ke tabung sentrifugasi steril berukuran 50 mL, kemudian diukur volume sel suspensi yang mengendap. Data ditampilkan dalam bentuk rata-rata dan standar error (SE). Pemisahan sel-sel dari agregat besar dan kecil dilakukan dengan menyaring suspensi sel dengan *stainless steel filter* berukuran 1,5 mm pada saat subkultur. Sel-sel yang lolos pada saringan tersebut digunakan sebagai inokulum untuk disubkultur berikutnya. Subkultur dilakukan pada saat pertumbuhan sel mencapai fase linear dengan menggunakan medium terbaik.

HASIL

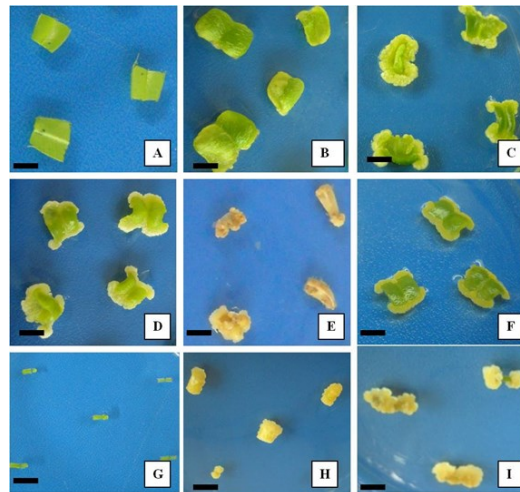
Inisiasi dan morfologi kalus dari daun dan ruas batang

Inisiasi kalus dari eksplan potongan daun dan ruas batang dari tunas *in vitro* menunjukkan respon pertumbuhan dan perkembangan yang berbeda tergantung pada medium perlakuan (Gambar 1). Pada tahap awal, eksplan daun membesar secara tidak beraturan sehingga permukaan daun bergelombang (Gambar 1B) atau ruas batang membengkak (Gambar 1H). Kemudian ujung/tepi eksplan menunjukkan pertumbuhan sel-sel yang cepat dan tidak teratur atau tidak terorganisir berupa kalus. Tetapi setelah 3–4 minggu, sel-sel bercampur membentuk kalus kompak berwarna kuning muda (Gambar 1C), ada pula yang berupa kalus kapas berwarna putih (Gambar 1D). Sebagian eksplan ada yang mengalami pencoklatan dan mati (Gambar 1E). Beberapa medium perlakuan seperti 2,4-D atau kombinasi 2,4-D dan BA menginduksi kalus yang kecil-kecil, cukup remah berwarna kekuningan (Gambar 1F dan 1I).

Pengaruh pemberian auksin tunggal pada berbagai konsentrasi

Pengaruh auksin terhadap pembentukan kalus dan tipe kalus pada eksplan potongan daun dan ruas batang dapat dilihat pada Tabel 1. Eksplan dapat bertahan hidup pada seluruh formulasi medium perlakuan, namun kalus hanya terbentuk dari medium yang mengandung auksin. Perlakuan Picloram dan IAA, mampu mempertahankan daya hidup tetapi hanya dapat menginduksi kalus dengan persentase rendah (<60%) dengan penutupan kalus <20%. Perlakuan 2,4-D memberikan daya hidup yang tinggi pada eksplan potongan daun (90–100%) dengan induksi kalus sekitar 70–90%, tetapi berbeda nyata pada 5 mg/L 2,4-D karena hanya 53% yang bertahan hidup dengan persentase kalus dua pertiganya (35%). ZPT IBA mampu menginduksi 100% eksplan daun untuk hidup dan membentuk kalus sebesar 96–100%. Persentase penutupan kalus maksimum pada potongan daun diperoleh dari perlakuan 10 mg/L IBA sebesar 51%.

Perlakuan 0,1–1 mg/L 2,4-D pada potongan ruas batang memberikan daya hidup dan persentase kalus yang tinggi (>90%), namun pada konsentrasi



Gambar 1. Perbedaan morfologi kalus dari eksplan potongan daun dan ruas batang gaharu. (A) potongan daun; (B) pembentukan kalus pada tahap awal; (C) kalus kompak; (D) kalus kapas; (E) kalus mencoklat; (F) kalus remah; (G) potongan ruas batang; (H) ruas batang mulai membengkak; (I) kalus dari ruas batang; bar = 5 mm. [*Morphological differences of callus from gaharu leaves and internodes. (A) leaves explant, (B) callus formation at an early stage, (C) compact callus, (D) cotton-like callus, (E) brown callus, (F) friable callus, (G) internodes explants, (H) swelling of internodes explants, and (I) callus from internodes explants; bar =5 mm*].

2,4-D yang lebih tinggi menurunkan daya hidup hingga kurang dari 30%. ZPT 0,1 mg/L 2,4-D mampu membentuk penutupan kalus maksimum sebesar 50%. Dari segi morfologi, perlakuan Picloram menyebabkan tipe kalus yang terbentuk pada daun menjadi mengapas, sedangkan IBA menginduksi kalus kompak berwarna kuning. Perlakuan 1–2 mg/L 2,4-D pada daun menginduksi kalus dengan morfologi remah.

Pengaruh perlakuan kombinasi auksin-auksin dan auksin-sitokinin

Pengaruh kombinasi auksin-auksin serta auksin-sitokinin pada pembentukan dan tipe kalus dari eksplan daun dan ruas batang disajikan pada Tabel 2. Potongan daun dan ruas batang dapat hidup dengan persentase cukup tinggi ($\geq 70\%$) dan mampu membentuk kalus pada semua kombinasi ZPT yang diberikan. Pada kombinasi 2,4-D dan NAA, pemberian NAA di semua konsentrasi 2,4-D menurunkan persentase eksplan membentuk kalus, bahkan rata-ratanya menurun hingga kurang dari 50% pada 2 mg/L 2,4-D. Sementara itu, parameter persentase penutupan kalus hanya mencapai 12% dari kombinasi perlakuan tersebut.

Pada kombinasi 2,4-D dan BA, pemberian BA dapat meningkatkan daya hidup eksplan potongan

daun sampai lebih dari 80%. Penambahan semua konsentrasi BA pada 1 mg/L 2,4-D dapat menginduksi kalus hingga 100%. Namun demikian, untuk persentase penutupan kalusnya tidak menunjukkan perbedaan nyata antar kombinasi perlakuan 2,4-D dan BA (25–32%). Kombinasi perlakuan BA dan NAA menyebabkan tingginya daya hidup dan induksi kalus yang terbentuk pada eksplan daun (89–100%), dengan penutupan kalus sekitar 19–36%. Potongan daun yang diberi perlakuan NAA tanpa BA dapat hidup 100%, tetapi tingkat induksi kalusnya rendah ($< 30\%$). Untuk kombinasi IBA dan BA, daya hidup eksplan sekitar 70–100%. Untuk eksplan potongan daun tanpa penambahan BA, persentase kalusnya tidak terlalu tinggi (20–70%), kecuali pada 5 mg/L BA dapat mencapai 100%. Penambahan BA meningkatkan persentase kalusnya menjadi 67–95%, dengan penutupan kalus 14–30%. Sementara itu eksplan ruas batang juga memiliki daya hidup yang tinggi antara 86–100% dengan kemampuan membentuk kalus 90–100%, kecuali pada 2 mg/L 2,4-D yang dikombinasikan dengan 0,3 mg/L 2,4-D yang hanya mampu membentuk kalus sebesar 50%. Persentase penutupan kalus pada eksplan ruas batang sekitar 31–66%.

Tabel 1. Pengaruh jenis dan konsentrasi auksin terhadap induksi dan tipe kalus pada potongan daun dan ruas batang *A. malaccensis* (*The effects of the types and concentrations of auxin on induction and types of callus in A. malaccensis leaves and internodes explant*)

Auksin (<i>Auxin</i>) (mg/L)	Hidup (<i>Survival</i>) (%)	Kalus (<i>Callus</i>) (%)	Penutupan kalus (<i>Callus coverage</i>) (%)	Tipe kalus (<i>Type of callus</i>)
Picloram ; Eksplan daun (<i>Leaves explant</i>)				
0	66,7 ± 25,0 a	0,0 ± 0,0 a	-	-
0,1	100,0 ± 0,0 a	50,0 ± 19,2 a	6,6 ± 1,4 a	Mengapas (<i>cotton-like</i>)
0,5	91,1 ± 3,7 a	46,9 ± 13,5 a	7,1 ± 2,0 a	Mengapas (<i>cotton-like</i>)
1	90,4 ± 5,5 a	29,3 ± 14,7 a	4,1 ± 1,4 a	Mengapas (<i>cotton-like</i>)
2	92,7 ± 2,4 a	46,4 ± 15,5 a	11,7 ± 4,2 a	Mengapas (<i>cotton-like</i>)
5	93,0 ± 4,4 a	57,1 ± 10,4 a	4,9 ± 1,8 a	Mengapas (<i>cotton-like</i>)
2,4-D; Eksplan daun (<i>Leaves explant</i>)				
0	93,8 ± 6,2 a	0,0 ± 0,0 c	-	-
0,1	95,8 ± 4,8 a	72,2 ± 6,8 a	27,5 ± 6,8 a	Kompak (<i>compact</i>)
0,5	100,0 ± 0,0 a	90,0 ± 7,1 a	10,3 ± 4,3 a	Agak kompak (<i>rather compact</i>)
1	95,4 ± 2,6 a	90,7 ± 3,7 a	16,8 ± 7,2 ab	Cukup remah (<i>quite friable</i>)
2	97,7 ± 2,8 a	81,6 ± 9,8 a	4,9 ± 1,1 b	Cukup remah (<i>quite friable</i>)
5	53,9 ± 18,2 b	35,0 ± 21,8 b	11,1 ± 6,1 b	Mengapas (<i>cotton-like</i>)
IAA; Eksplan daun (<i>Leaves explant</i>)				
0	93,8 ± 6,3 a	0,0 ± 0,0a	-	-
5	100,0 ± 0,0 a	23,3 ± 14,5 a	2,5 ± 0,0 a	Mengapas (<i>cotton-like</i>)
10	100,0 ± 0,0 a	10,0 ± 5,8 a	2,5 ± 0,0 a	Nodular (<i>nodular</i>)
15	100,0 ± 0,0 a	40,0 ± 23,1 a	4,1 ± 1,3 a	Nodular (<i>nodular</i>)
IBA; Eksplan daun (<i>Leaves explant</i>)				
0	93,8 ± 6,3 a	0,0 ± 0,0 b	-	-
5	100,0 ± 0,0 a	90,0 ± 5,8 a	21,0 ± 9,0 a	Kompak (<i>compact</i>)
10	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	51,2 ± 5,7 a	Kompak, mengapas (<i>compact, cotton-like</i>)
15	100,0 ± 0,0 a	96,7 ± 3,3 a	34,9 ± 13,8 a	Kompak (<i>compact</i>)
2,4-D; Eksplan ruas batang (<i>Internodes explant</i>)				
0	100,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 c	-	-
0,1	97,1 ± 2,9 a	97,1 ± 2,8 a	51,4 ± 2,2 a	agak kompak (<i>rather compact</i>)
0,5	100,0 ± 0,0 a	94,3 ± 5,7 a	47,4 ± 3,6 a	Kompak (<i>compact</i>)
1	97,1 ± 2,9 a	97,1 ± 2,9 a	38,7 ± 2,6 a	Kompak (<i>compact</i>)
2	28,6 ± 18,6 b	28,6 ± 18,6 b	47,3 ± 15,7 a	Kompak (<i>compact</i>)
5	23,8 ± 9,5 c	23,3 ± 8,3 bc	33,3 ± 8,3 a	Kompak (<i>compact</i>)

Keterangan (*Notes*) : Nilai rata-rata ± SE; nilai diikuti huruf yang sama pada kolom dan grup yang sama tidak berbeda nyata menurut uji lanjut DMRT ($\alpha=0,05$); (-) = tidak terbentuk kalus (*Values are mean ± SE; means in the same column in the same group followed by the same letters are not significantly different at $\alpha=0.05$, determined by DMRT; (-) = no callus*).

Tabel 2. Pengaruh kombinasi jenis dan konsentrasi auksin-auksin dan auksin-sitokinin terhadap induksi dan tipe kalus pada potongan daun dan ruas batang *A. malaccensis* (The effects of the types and concentrations of auxin-auxin and auxin-cytokinin on induction and types of callus in *A. malaccensis* leaves and internodes explant)

ZPT (PGR) (mg/L)	Hidup (Survival) (%)	Kalus (Callus) (%)	Penutupan kalus (Callus coverage) (%)	Tipe kalus (Types of callus)
<i>2,4D dan NAA; eksplan daun (leaves explant)</i>				
1-2,4D + 0 NAA	80,0 ± 20,0 a	76,7 ± 16,7 a	15,9 ± 4,1 a	Nodular (<i>nodular</i>)
1-2,4D+0,1NAA	86,7 ± 7,2 a	83,3 ± 6,4 a	5,0 ± 0,0 a	Kompak (<i>compact</i>)
1-2,4D+0,5NAA	95,0 ± 3,2 a	85,0 ± 4,2 a	5,0 ± 0,0 a	Kompak (<i>compact</i>)
1-2,4D + 1NAA	93,3 ± 4,7 a	75,0 ± 11,0 a	6,7 ± 3,1 a	Kompak (<i>compact</i>)
2-2,4D + 0 NAA	80,0 ± 13,3 a	53,3 ± 0,0 ab	6,9 ± 1,3 a	Nodular (<i>nodular</i>)
2-2,4D+0,1NAA	80,0 ± 8,2 a	36,7 ± 20,1 ab	7,5 ± 1,8 a	Agak kompak (<i>rather compact</i>)
2-2,4D+0,5NAA	76,7 ± 19,1 a	23,3 ± 12,3 b	12,2 ± 3,5 a	Kompak (<i>compact</i>)
2-2,4D+1NAA	80,0 ± 7,2 a	23,3 ± 19,1 b	10,0 ± 3,5 a	Kompak (<i>compact</i>)
<i>2,4D dan BA; eksplan daun (leaves explant)</i>				
1-2,4D + 0BA	75,0 ± 3,6 a	57,1 ± 14,3 bc	22,3 ± 4,8 a	Agak remah (<i>rather friable</i>)
1-2,4D + 0,1BA	96,4 ± 2,1 a	96,4 ± 2,1 a	32,5 ± 2,5 a	Agak remah (<i>rather friable</i>)
1-2,4D + 0,2BA	96,4 ± 2,1 a	96,4 ± 2,1 a	27,1 ± 2,6 a	Remah (<i>friable</i>)
1-2,4D + 0,3BA	83,9 ± 16,1 a	83,9 ± 16,1 ab	32,6 ± 3,9 a	Cukup remah (<i>quite friable</i>)
2-2,4D + 0BA	89,3 ± 10,7 a	46,4 ± 17,9 c	27,6 ± 10,1 a	Cukup remah (<i>quite friable</i>)
2-2,4D + 0,1BA	98,2 ± 1,8 a	98,2 ± 1,8 a	28,8 ± 1,3 a	Remah (<i>friable</i>)
2-2,4D + 0,2BA	87,5 ± 12,5 a	87,5 ± 12,5 ab	25,6 ± 2,4 a	Remah (<i>friable</i>)
2-2,4D + 0,3BA	83,9 ± 13,8 a	80,4 ± 12,8 ab	24,3 ± 6,2 a	Remah (<i>friable</i>)
<i>NAA dan BA; eksplan daun (leaves explant)</i>				
0NAA + 0,1BA	100,0 ± 0,0 a	23,2 ± 7,4 b	1,0 ± 0,0 d	Nodular (<i>nodular</i>)
0,1NAA+0,1BA	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	36,2 ± 3,8 a	Kompak (<i>compact</i>)
0,5NAA+0,1BA	100,0 ± 0,0 a	98,2 ± 1,8 a	35,0 ± 2,9 ab	Kompak (<i>compact</i>)
1NAA + 0,1BA	96,4 ± 3,6 a	96,4 ± 3,6 a	28,1 ± 3,4 abc	Kompak (<i>compact</i>)
5NAA + 0,1BA	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	19,6 ± 3,5 c	Kompak (<i>compact</i>)
0NAA + 0,2BA	100,0 ± 0,0 a	26,2 ± 4,1 b	5,0 ± 0,0 d	Nodular (<i>nodular</i>)
0,1NAA+0,2BA	1,0 ± 0,0 a	89,3 ± 8,5 a	24,2 ± 3,4 c	Kompak, mengapas (<i>compact, cotton-like</i>)
0,5NAA+0,2BA	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	26,3 ± 2,4 bc	Kompak, mengapas (<i>compact, cotton-like</i>)
1NAA + 0,2BA	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	23,8 ± 5,2 c	Kompak, mengapas (<i>compact, cotton-like</i>)
5NAA + 0,2BA	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	22,5 ± 2,5 c	Kompak, mengapas (<i>compact, cotton-like</i>)

Tabel 2. Pengaruh kombinasi jenis dan konsentrasi auksin-auksin dan auksin-sitokinin terhadap induksi dan tipe kalus pada potongan daun dan ruas batang *A. malaccensis* (*The effects of the types and concentrations of auxin-auxin and auxin-cytokinin on induction and types of callus in A. malaccensis leaves and internodes explant*) (lanjutan/ *continued*)

ZPT (PGR) (mg/L)	Hidup (Survival) (%)	Kalus (<i>Callus</i>) (%)	Penutupan kalus (<i>Callus coverage</i>) (%)	Tipe kalus (<i>Types of callus</i>)
<i>IBA dan BA; eksplan daun (leaves explant)</i>				
0,5IBA + 0BA	95,0 ± 2,9 a	25,0 ± 6,5 d	5,0 ± 0,0 g	Mengapas (<i>cotton-like</i>)
0,5IBA + 0,1BA	90,0 ± 5,8 a	83,3 ± 8,8 ab	28,3 ± 1,7 ab	Agak kompak (<i>rather compact</i>)
0,5IBA + 0,2BA	85,0 ± 11,9 a	82,5 ± 11,1 ab	29,9 ± 1,7 ab	Kompak (<i>compact</i>)
0,5IBA + 0,3BA	85,0 ± 11,9 a	67,5 ± 16,5 abc	26,9 ± 5,5 abc	Kompak (<i>compact</i>)
1IBA + 0BA	87,5 ± 12,5 a	52,5 ± 9,5 bcd	15,0 ± 2,0 c-g	Kompak (<i>compact</i>)
1IBA + 0,1BA	90,0 ± 10,0 a	87,5 ± 9,5 ab	18,5 ± 5,5 a-e	Kompak, mengapas (<i>compact, cotton-like</i>)
1IBA + 0,2BA	90,0 ± 10,0 a	82,5 ± 17,5 ab	24,1 ± 2,1 a-d	Kompak (<i>compact</i>)
1IBA + 0,3BA	95,0 ± 5,0 a	90,0 ± 5,7 a	24,3 ± 3,4 a-d	Kompak (<i>compact</i>)
5IBA + 0BA	72,5 ± 13,1 a	72,5 ± 13,1 abc	17,8 ± 4,5 a-f	Kompak (<i>compact</i>)
5IBA + 0,1BA	87,5 ± 4,8 a	87,5 ± 4,8 ab	27,5 ± 1,8 a-b	Kompak (<i>compact</i>)
5IBA + 0,2BA	97,5 ± 2,5 a	87,5 ± 6,3 ab	29,6 ± 4,4 a-b	Kompak (<i>compact</i>)
5IBA + 0,3BA	95,0 ± 5,0 a	82,5 ± 10,3 ab	26,7 ± 3,2 abc	Kompak (<i>compact</i>)
10IBA + 0BA	70,0 ± 15,3 a	43,3 ± 20,3 cd	6,2 ± 3,4 f-g	Kompak (<i>compact</i>)
10IBA + 0,1BA	85,0 ± 9,6 a	85,0 ± 9,6 ab	30,0 ± 4,1 a	Kompak (<i>compact</i>)
10IBA + 0,2BA	90,0 ± 7,1 a	85,0 ± 8,6 ab	26,3 ± 1,3 a-d	Kompak (<i>compact</i>)
10IBA + 0,3BA	85,0 ± 11,9 a	77,5 ± 16,0 ab	24,4 ± 4,8 a-d	Kompak (<i>compact</i>)
15IBA + 0BA	92,5 ± 7,5 a	65,0 ± 8,6 abc	9,5 ± 3,6 efg	Kompak (<i>compact</i>)
15IBA + 0,1BA	95,0 ± 2,9 a	95,0 ± 5,0 a	25,4 ± 2,2 a-d	Kompak (<i>compact</i>)
15IBA + 0,2BA	72,5 ± 14,4 a	70,8 ± 13,3 abc	17,4 ± 5,9 b-f	Kompak (<i>compact</i>)
15IBA + 0,3BA	85,0 ± 15,0 a	80,0 ± 20,0 ab	14,1 ± 2,6 d-g	Kompak (<i>compact</i>)
<i>2,4-D dan BA; eksplan ruas batang (internodes explant)</i>				
1-2,4D + 0BA	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	56,3 ± 1,3 a	Agak remah (<i>rather friable</i>)
1-2,4D + 0,1BA	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	66,3 ± 11,3 a	Agak remah (<i>rather friable</i>)
1-2,4D + 0,2BA	90,0 ± 10,0 a	90,0 ± 10,0 a	53,1 ± 3,1 a	Agak kompak (<i>rather compact</i>)
1-2,4D + 0,3BA	90,0 ± 10,0 a	90,0 ± 10,0 a	60,9 ± 1,6 a	Agak kompak (<i>rather compact</i>)
2-2,4D + 0BA	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	52,5 ± 5,0 a	Remah (<i>friable</i>)
2-2,4D + 0,1BA	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	50,7 ± 4,3 a	Remah (<i>friable</i>)
2-2,4D + 0,2BA	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	43,9 ± 1,1 a	Kompak (<i>compact</i>)
2-2,4D + 0,3BA	85,7 ± 14,3 a	50,0 ± 50,0 a	62,5 a	Kompak (<i>compact</i>)

Keterangan (*Notes*) : Nilai rata-rata ± SE; nilai diikuti huruf yang sama pada kolom dan grup yang sama tidak berbeda nyata menurut uji lanjut DMRT ($\alpha=0.05$); (-) = tidak terbentuk kalus (*Values are mean ± SE; means in the same column in the same group followed by the same letters are not significantly different at $\alpha=0.05$, determined by DMRT; (-) = no callus*).

Dari segi tipe kalus, perlakuan 2,4-D dan BA baik pada eksplan potongan daun dan ruas batang dapat membentuk struktur kalus yang bersifat remah dengan warna kuning atau kuning muda. Kalus pada potongan daun muncul di pinggir maupun pada permukaan daun. Pada kombinasi perlakuan NAA dan 2,4-D serta NAA dan BA, kalus yang terbentuk bersifat kompak dan mengapas, sedangkan pada kombinasi perlakuan IBA dan BA sebagian besar membentuk kalus kompak, ada pula yang mengapas. Kalus yang bersifat remah baik dari eksplan potongan daun ataupun ruas batang dipilih untuk disubkultur setiap satu bulan di medium MS dengan penambahan 1 mg/L 2,4-D.

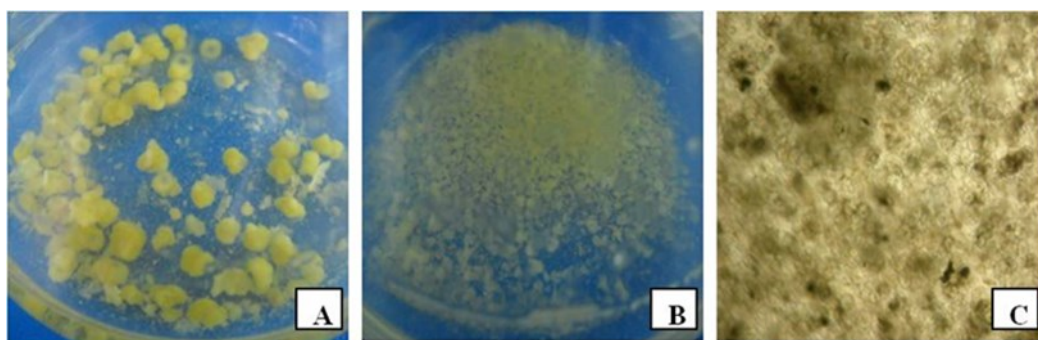
Inisiasi dan Pemeliharaan Biak Suspensi Sel *A. malaccensis*

Kultur suspensi sel gaharu dibuat dari kalus remah yang tumbuh dari eksplan potongan daun. Kalus gaharu yang dipindahkan ke medium cair berangsur-angsur akan membentuk agregat yang semakin besar ukurannya (Gambar 2A). Pengocokan yang terus-menerus menyebabkan terbentuknya sel-sel yang lepas-lepas, sehingga membentuk sekumpulan sel yang halus jika dilihat secara langsung maupun di bawah mikroskop (Gambar 2B dan 2C). Pada perlakuan 2,4-D pertumbuhan suspensi gaharu membentuk kurva sigmoid pada semua konsentrasi, kecuali 5 mg/L (Gambar 3A). Sementara itu, penambahan Picloram pada medium

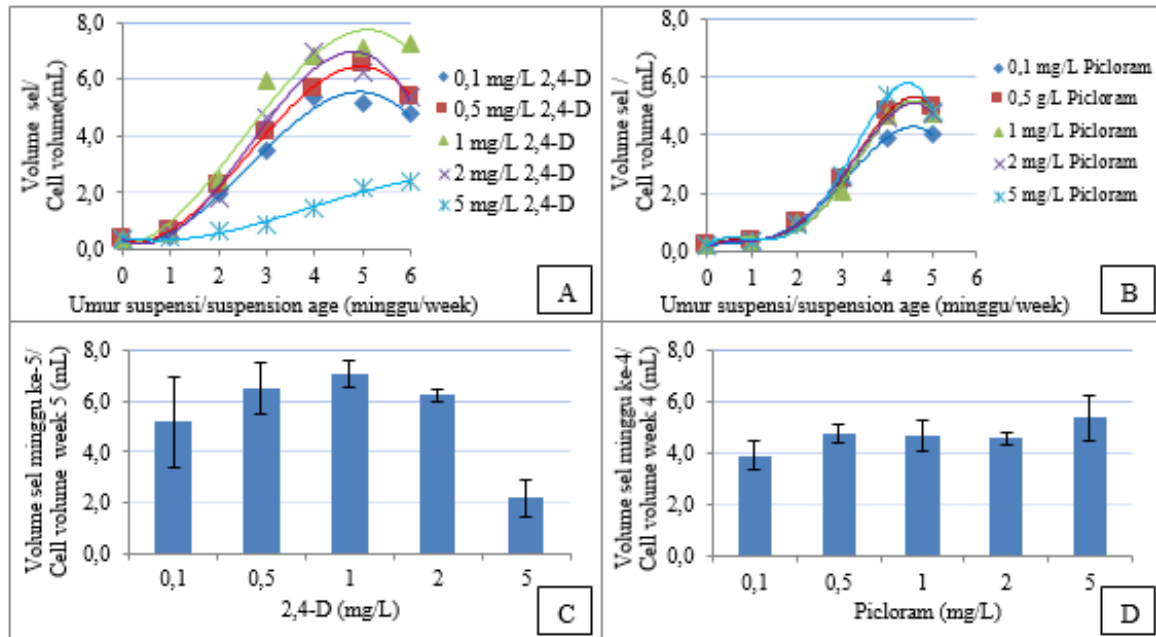
memberikan respon pertumbuhan kalus berupa kurva sigmoid juga, tetapi volume selnya lebih rendah dan masa kulturnya lebih pendek (5 minggu) dibanding perlakuan 2,4-D yang berumur 6 minggu (Gambar 3B). Pertumbuhan sel maksimum pada perlakuan 2,4-D diperoleh pada konsentrasi 1 mg/L dengan volume sel 7 mL pada minggu kelima (Gambar 3C), sedangkan pada perlakuan Picloram respon maksimum volume selnya tidak berbeda nyata pada semua konsentrasi (Gambar 3D). Suspensi sel terbaik dengan kumpulan sel yang halus yaitu pada 0,5 dan 1 mg/L 2,4-D dipilih dan disubkultur ke medium MS dengan penambahan 1 mg/L 2,4-D pada saat pertumbuhan sel mencapai fase linear (umur 2–3 minggu).

PEMBAHASAN

Kalus gaharu dapat diinisiasi dari potongan daun ataupun ruas batang planlet *in vitro* *A. malaccensis* yang diberi perlakuan auksin tunggal maupun kombinasi auksin-auksin atau auksin-sitokinin. Gaharu memiliki kemampuan proliferasi kalus yang baik, karena berdasarkan semua perlakuan auksin dan sitokinin yang dicoba, potongan daun dan ruas batang umumnya memiliki daya hidup >80% dengan tingkat pembentukan kalus >50% (Tabel 1 dan 2). Kalus dari eksplan potongan daun dan ruas batang, keduanya dapat digunakan untuk menginduksi kalus dengan persentase yang tinggi dengan tipe remah. Perlakuan auksin Picloram



Gambar 2. Morfologi kalus gaharu dalam medium cair MS dengan penambahan 1 mg/L 2,4-D. (A) Kalus yang membentuk gumpalan berdiameter sekitar 2–5 mm; (B) Kalus sudah mulai membentuk kumpulan sel yang halus, dan (C) Agregat suspensi sel (perbesaran 10x10). [*Morphology of gaharu callus in a liquid MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D. (A) The aggregate of callus about 2–5 mm diameter; (B) callus had established to a fine aggregate; and (C) cell suspension aggregates (10x10 magnification).*].



Gambar 3. Kurva pertumbuhan suspensi sel gaharu. (A) perlakuan 2,4-D; (B) perlakuan Picloram; (C) volume sel maksimum dari perlakuan 2,4-D (minggu ke-5); dan (D) volume sel maksimum dari perlakuan Picloram (minggu ke-4). Nilai rata-rata \pm SE; ulangan = 3–4. [The growth curve of gaharu suspension cell. (A) treatment of 2,4-D; (B) treatment of Picloram; (C) the maximum cell volume of 2,4-D treatment (week 5); and (D) the maximum cell volume of Picloram treatment (week 4). Values are mean \pm SE; $r = 3-4$].

dan IAA, tidak direkomendasikan untuk menginduksi kalus gaharu karena daya hidupnya cukup rendah (<50%). Dari semua ZPT yang digunakan, pemberian IBA tunggal sangat efektif dalam menginduksi kalus dari segi persentase kalus maupun penutupan kalus, sedangkan 2,4-D lebih baik dalam menginduksi kalus remah meskipun persentase kalus dan penutupan kalusnya lebih rendah daripada IBA. Penambahan BA dalam konsentrasi rendah (0,1–0,3 mg/L) pada media yang mengandung 1–2 mg/L 2,4-D lebih efektif memicu terbentuknya kalus dari segi persentase maupun keremahan kalus.

Data pada Tabel 1 dan 2 menunjukkan bahwa setiap ZPT memiliki pengaruh yang berbeda terhadap pembentukan kalus. Tiap jenis auksin maupun sitokinin terikat pada reseptor yang berbeda-beda supaya terjadi perubahan metabolik yang mengarah pada penguatan sinyal sehingga menyebabkan respon pertumbuhan dan perkembangan. IAA dan IBA merupakan auksin

alami yang disintesis oleh tumbuhan, efektif untuk inisiasi akar adventif, tetapi tidak terlalu efektif untuk pembentukan kalus, sedangkan 2,4-D yang merupakan auksin sintetik yang berfungsi sebaliknya, memiliki pengaruh kuat dalam membentuk kalus (George, 1993). Penggunaan kombinasi auksin dan sitokinin sangat penting dalam pembentukan kalus gaharu, dimana adanya sitokinin dengan konsentrasi yang lebih tinggi dapat memicu pembelahan sel (Ito *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2005; Saikia *et al.*, 2012; Daud, 2013; Khairunisa, 2013; Zalikha, 2013; Jayaraman *et al.*, 2014). Kombinasi yang terbaik untuk menginduksi kalus *A. crassna* diperoleh pada medium MS dengan penambahan 10^{-6} M 2,4-D dan 10^{-6} M BA (Okudera and Ito, 2009), sedangkan kombinasi 2 mg/L 2,4-D dan 0,1 mg/L kinetin dapat menginduksi kalus dari daun *A. malaccensis* hingga 70-73% dengan biomassa yang tinggi dan tumbuh cepat (Saikia *et al.*, 2013). Khairunisa (2013) dan Zalikha (2013) melaporkan bahwa kalus dari eksplan lamina *A. beccariana* Van

Teigh dan daun *A. malaccensis* dapat diinduksi dari medium MS ditambah 2 mg/L 2,4-D dan 0,5 mg/L BAP, sedangkan Jayaraman *et al.* (2014) memperoleh kalus remah dari eksplan daun yang berasal dari persemaian dengan biomassa tertinggi (berat kering 93,3 mg) melalui kombinasi hormon 1,1 μ M NAA dan 2,2 μ M BAP.

Kalus remah yang diperoleh pada medium padat dapat langsung dipindahkan ke medium cair untuk mendapatkan suspensi sel. Perlakuan 2,4-D tampaknya memberikan hasil yang lebih baik dibanding Picloram dilihat dari segi pertambahan volume sel per minggu dan morfologi sel yang lebih halus (Gambar 2 dan 3). Konsentrasi 0,5 dan 1 mg/L 2,4-D pada medium MS cair sama-sama memicu pembentukan agregat sel yang kecil-kecil, namun dari segi pertumbuhan sel, volume sel maksimum dicapai pada perlakuan 1 mg/L 2,4-D (Gambar 3A). Pemberian konsentrasi 2,4-D yang lebih tinggi sebesar 5 mg/L justru dapat menurunkan volume sel. Pada konsentrasi 1 mg/L 2,4-D, terjadi keseimbangan antara jumlah metabolit dalam sel dan medium sehingga terjadi pembelahan sel. Dalam sistem suspensi sel, terbentuknya sel-sel yang halus akibat tidak adanya ikatan antara satu dengan yang lain (lepas-lepas). Dinding sel tumbuhan memiliki lapisan perekat (lamela tengah) yang berfungsi untuk merekatkan antara satu sel dengan sel yang lain. Lamela tengah terdiri dari komponen hemiselulosa dan pektin. ZPT 2,4-D kemungkinan menyebabkan komponen pada lamela tengah tersebut menjadi rusak. Selain itu, 2,4-D yang bersifat asam menyebabkan dinding sel tumbuh dan meregang lebih cepat sehingga memacu pembentukan kalus gaharu menjadi remah. Pemberian jenis dan konsentrasi auksin yang tepat dapat menginduksi dan meningkatkan proliferasi kalus dengan sel-sel yang sehat sehingga pertambahan volumenya terjadi lebih cepat, namun kombinasi yang tepat dan konsentrasi yang optimal tersebut juga dipengaruhi beberapa faktor seperti genotipe tanaman, asal eksplan, galur dan sebagainya (Mathur dan Shekhawat, 2013). Pada kultur suspensi sel dari kalus asal jaringan akar *in vitro* *A. sinensis* (Lour) Gilg dapat diperoleh dari kombinasi 10,7 μ M NAA dan 2,2 μ M BA pada medium MS (Qi *et al.*, 2005).

Kurva pertumbuhan kultur kalus *A. malaccensis* pada perlakuan 1 mg/L 2,4-D membentuk kurva sigmoid (Gambar 3C). Pada minggu pertama sel-sel kalus mengalami pemulihan untuk persiapan fase pertumbuhan eksponensial dan linear di mana sel-sel mengalami penambahan yang cepat dengan memanfaatkan nutrisi dan ZPT yang tersedia. Setelah melewati fase linear, nutrisi dalam medium akan semakin berkurang sedangkan kebutuhan nutrisi dan ruang sangat tinggi, akibatnya pertumbuhannya melambat dan terjadi kematian sel. Biak kalus yang ditanam pada medium cair akan mempercepat pertumbuhan selnya karena medium menjadi lebih homogen dan distribusi nutrisinya lebih merata. Selain itu, pengocokan medium membantu sel yang terbentuk menjadi remah dan lepas-lepas. Subkultur kalus gaharu dilakukan sebelum pertumbuhan sel mencapai maksimum yaitu minggu ke-2 sampai ke-3 di medium MS dengan penambahan 1 mg/L 2,4-D. Penyaringan dengan diameter $\leq 1,5$ mm pada saat subkultur membantu mendapatkan kultur dengan kumpulan sel yang halus dan homogen

Metode yang optimal untuk mendapatkan kalus dengan persentase induksi kalus yang tinggi dan struktur yang remah sangat diperlukan untuk induksi senyawa seskuiterpena dari kultur suspensi sel gaharu di mana nantinya bermanfaat untuk mengatasi ketersediaan bahan tanaman yang terbatas oleh karena masalah penurunan populasi gaharu di alam, juga oleh keterbatasan lahan yang semakin banyak beralih fungsinya.

KESIMPULAN

Kalus *A. malaccensis* dapat diinduksi dari semua perlakuan auksin tunggal maupun kombinasi auksin-sitokinin dengan menggunakan potongan daun dan ruas batang sebagai eksplan. Kombinasi perlakuan 1–2 mg/L 2,4-D dan BA dalam selang konsentrasi rendah (0,1–0,3 mg/L) dapat menginduksi pembentukan kalus yang tinggi (>80%) dan cukup remah. Perlakuan 2,4-D lebih baik dalam menginduksi dan memelihara suspensi sel dibanding Picloram, dengan volume sel maksimum mencapai 7 mL. Kultur suspensi dengan kumpulan sel yang halus dan homogen dapat dicapai melalui penggunaan 0,5–1 mg/L 2,4-D.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami menyampaikan ucapan terima kasih kepada teman-teman (khususnya Ibu Katharina Utami Nugraheni, Tri Handayani, Yuli Meida Sari, Hasrat Enggal Prayogi) di Laboratorium Biak Sel dan Jaringan Tumbuhan, Bidang Botani, Puslit Biologi-LIPI, serta Meliana Safitri, Yudith Pradipta, Ilma Kherasani, Fitrië Phuspa Indrasari yang telah banyak membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Akter S, MT Islam, M Zulkefeli and SI Khan. 2013.** Agarwood Production-A Multidisciplinary Field to be Explored in Bangladesh. *Journal of Pharmaceutical and Life Sciences* **1(4)**, 1-11.
- Azah MAN, YS Chang, J Mailina, AA Said, A Husni, N Hasnida and N Yasmin. 2008.** Comparison of Chemical Profiles of Selected Gaharu Oils from Peninsular Malaysia. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* **2 (12)**, 338-340.
- Barden A, NA Anak, T Mulliken and M Song. 2000.** Heart of The Matter: Agarwood Use and Trade, and CITES Implementation for *Aquilaria malaccensis*.]. TRAFFIC International. http://www.trafficj.org/publication/00_heart_the_matter_agarwood.pdf. (Diunduh 6 April 2013).
- Daud NH. 2013.** Optimization of culture parameters for flavonoid production from callus and suspension cultures of the karas tree (*Aquilaria malaccensis* Lam.). Universiti Putra Malaysia, Selangor [Thesis].
- George EF. 1993.** *Plant Propagation by Tissue Culture Part 1*, 574. Exegetic Ltd, England.
- Ito M, K Okimoto, T Yagura and Honda G. 2005.** Induction of Sesquiterpenoid Production by Methyl Jasmonate in *Aquilaria sinensis* Cell Suspension Culture. *Journal of Essential Oil Research* **17**, 175-180.
- Jayaraman S, NH Daud, R Halis and R Mohamed. 2014.** Effects of Plant Growth Regulators, Carbon Sources and pH Values on Callus Induction in *Aquilaria malaccensis* Leaf Explants and Characteristics of The Resultant Calli. *Journal of Forestry Research* **25**, 535-540.
- Jayaraman S and R Mohamed. 2015.** Crude Extract of *Trichoderma* Elicits Agarwood Substances in Cell Suspension Culture of The Tropical Tree, *Aquilaria malaccensis* Lam. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **39**, 163-173.
- Khairunisa. 2013.** Suspension culture of *Aquilaria Beccariana* Van Teigh. Universiti Malaysia Sarawak, Sarawak. [Thesis].
- Murashige T and F Skoog. 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Plant Physiology* **15**, 473-497.
- Ng LT, YS Chang and AA Kadir. 1997.** A Review on Agar (Gaharu) Producing *Aquilaria* Species. *Journal of Tropical Forest Products* **2(2)**, 272-285.
- Okudera Y and M Ito. 2009.** Production of Agarwood Fragrant Constituent in *Aquilaria* Calli and Suspension Cultures. *Plant Biotechnology Journal* **26**, 307-315.
- Qi SY, ML He, LD Lin, CH Zhang, LJ Hu and HZ Zhang. 2005.** Production of 2-(2-Phenylethyl) Chromones in Cell Suspension Cultures of *Aquilaria sinensis*. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* **83 (2)**, 217-221.
- Saikia M, K Shrivastava and SS Singh. 2012.** An Efficient Protocol for Callus Induction in *Aquilaria malaccensis* Lam. Using Leaf Explants at Varied Concentrations of Sucrose. *International Journal of Plant Research* **2 (6)**, 188-194.
- Saikia M, K Shrivastava and SS Singh. 2013.** Effect of Culture Media and Growth Hormone Callus Induction in *Aquilaria malaccensis* Lam., A Medicinally and Commercially Important Tree Species of North East India. *Asian Journal of Biological Science* **6(2)**, 96-15.
- Rijal F. 2011.** Pengaruh inokulasi beberapa strain *Fusarium* spp. terhadap produksi seskuiterpena dari berbagai umur kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis*). Universitas Andalas, Padang. [Skripsi].
- Subasinghe SMCUP, DS Hettiarachchi and E Rathnamalala. 2012.** Agarwood-Type Resin from *Gyrinops walla* Gaertn: A New Discovery. *Journal of Tropical Forestry and Environment* **2(2)**, 43-48.
- Zalikha S. 2013.** Cell suspension culture of *Aquilaria malaccensis* Lamk. Universiti Malaysia Sarawak, Sarawak. [Skripsi].

Pedoman Penulisan Naskah Berita Biologi

Berita Biologi adalah jurnal yang menerbitkan artikel kemajuan penelitian di bidang biologi dan ilmu-ilmu terkait di Indonesia. Berita Biologi memuat karya tulis ilmiah asli berupa makalah hasil penelitian, komunikasi pendek dan tinjauan kembali yang belum pernah diterbitkan atau tidak sedang dikirim ke media lain. Masalah yang diliput, diharuskan menampilkan aspek atau informasi baru.

Tipe naskah

- 1. Makalah lengkap hasil penelitian (*original paper*)**

Naskah merupakan hasil penelitian sendiri yang mengangkat topik yang *up-to-date*. Tidak lebih dari 15 halaman termasuk tabel dan gambar. Pencantuman lampiran seperlunya, namun redaksi berhak mengurangi atau meniadakan lampiran.
- 2. Komunikasi pendek (*short communication*)**

Komunikasi pendek merupakan makalah hasil penelitian yang ingin dipublikasikan secara cepat karena hasil teremuan yang menarik, spesifik dan baru, agar dapat segera diketahui oleh umum. Artikel yang ditulis tidak lebih dari 10 halaman. Hasil dan pembahasan boleh digabung.
- 3. Tinjauan kembali (*review*)**

Tinjauan kembali merupakan rangkuman tinjauan ilmiah yang sistematis-kritis secara ringkas namun mendalam terhadap topik penelitian tertentu. Hal yang ditinjau meliputi segala sesuatu yang relevan terhadap topik tinjauan yang memberikan gambaran '*state of the art*', meliputi temuan awal, kemajuan hingga issue terkini, termasuk perdebatan dan kesenjangan yang ada dalam topik yang dibahas. Tinjauan ulang ini harus merangkum minimal 30 artikel.

Struktur naskah

- 1. Bahasa**

Bahasa yang digunakan adalah bahasa Indonesia atau Inggris yang baik dan benar.
- 2. Judul**

Judul harus singkat, jelas dan mencerminkan isi naskah diikuti oleh nama dan alamat surat menyurat penulis. Nama penulis untuk korespondensi diberi tanda amplop cetak atas (*superscript*).
- 3. Abstrak**

Abstrak dibuat dalam dua bahasa, bahasa Indonesia dan Inggris. Abstrak memuat secara singkat tentang latar belakang, tujuan, metode, hasil yang signifikan, kesimpulan dan implikasi hasil penelitian. Abstrak berisi maksimum 200 kata, spasi tunggal. Di bawah abstrak dicantumkan kata kunci yang terdiri atas maksimum enam kata, dimana kata pertama adalah yang terpenting. Abstrak dalam bahasa Inggris merupakan terjemahan dari bahasa Indonesia. Editor berhak untuk mengedit abstrak demi alasan kejelasan isi abstrak.
- 4. Pendahuluan**

Pendahuluan berisi latar belakang, permasalahan dan tujuan penelitian. Sebutkan juga studi terdahulu yang pernah dilakukan.
- 5. Bahan dan cara kerja**

Pada bagian ini boleh dibuat sub-judul yang sesuai dengan tahapan penelitian. Metoda harus dipaparkan dengan jelas sesuai dengan standar topik penelitian dan dapat diulang oleh peneliti lain. Apabila metoda yang digunakan adalah metoda yang sudah baku cukup ditulis sitasi dan apabila ada modifikasi harus dituliskan dengan jelas bagian mana dan apa yang dimodifikasi.
- 6. Hasil**

Sebutkan hasil-hasil utama yang diperoleh berdasarkan metoda yang digunakan. Apabila ingin mengacu pada tabel/grafik/diagram atau gambar uraikan hasil yang terpenting dan jangan menggunakan kalimat 'Lihat Tabel 1'. Apabila menggunakan nilai rata-rata harus menyebutkan standar deviasi.
- 7. Pembahasan**

Jangan mengulang isi hasil. Pembahasan mengungkap alasan didapatkannya hasil dan apa arti atau makna dari hasil yang didapat tersebut. Bila memungkinkan, bandingkan hasil penelitian ini dengan membuat perbandingan dengan studi terdahulu (bila ada).
- 8. Kesimpulan**

Menyimpulkan hasil penelitian, sesuai dengan tujuan penelitian, dan penelitian berikut yang bisa dilakukan.
- 9. Ucapan terima kasih**
- 10. Daftar pustaka**

Tidak diperkenankan untuk mensitasi artikel yang tidak melalui proses peer review. Apabila harus menyitir dari "Laporan" atau "komunikasi personal" dituliskan '*unpublished*' dan tidak perlu ditampilkan di daftar pustaka. Daftar pustaka harus berisi informasi yang *up to date* yang sebagian besar berasal dari *original papers*. Penulisan terbitan berkala ilmiah (nama jurnal) tidak disingkat.

Format naskah

- Naskah diketik dengan menggunakan program Word Processor, huruf New Times Roman ukuran 12, spasi ganda kecuali Abstrak. Batas kiri-kanan atas-bawah masing-masing 2,5 cm. Maksimum isi naskah 15 halaman termasuk ilustrasi dan tabel.
- Penulisan bilangan pecahan dengan koma mengikuti bahasa yang ditulis menggunakan dua angka desimal di belakang koma. Apabila menggunakan bahasa Indonesia, angka desimal menggunakan koma (,) dan titik (.) bila menggunakan bahasa Inggris. Contoh: Panjang buku adalah 2,5cm. Length of the book is 2.5 cm. Penulisan angka 1-9 ditulis dalam kata kecuali bila bilangan satuan ukur, sedangkan angka 10 dan seterusnya ditulis dengan angka. Contoh lima orang siswa, panjang buku 5 cm.
- Penulisan satuan mengikuti aturan *international system of units*.
- Nama takson dan kategori taksonomi merujuk kepada aturan standar termasuk yang diakui. Untuk tumbuhan *International Code of Botanical Nomenclature* (ICBN), untuk hewan *International Code of Zoological Nomenclature* (ICZN), untuk jamur *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plant* (ICFAFP), *International Code of Nomenclature of Bacteria* (ICNB), dan untuk organisme yang lain merujuk pada kesepakatan Internasional. Penulisan nama takson lengkap dengan nama author hanya dilakukan pada bagian deskripsi takson, misalnya pada naskah taksonomi. Sedangkan penulisan nama takson untuk bidang lainnya tidak perlu menggunakan nama author.
- Tata nama di bidang genetika dan kimia merujuk kepada aturan baku terbaru yang berlaku.
- Ilustrasi dapat berupa foto (hitam putih atau berwarna) atau gambar tangan (*line drawing*).
- Tabel
Tabel diberi judul yang singkat dan jelas, spasi tunggal dalam bahasa Indonesia dan Inggris, sehingga Tabel dapat berdiri sendiri. Tabel diberi nomor urut sesuai dengan keterangan dalam teks. Keterangan Tabel diletakkan di bawah Tabel. Tabel tidak dibuat tertutup dengan garis vertikal, hanya menggunakan garis horisontal yang memisahkan judul dan batas bawah. Paragraf pada isi tabel dibuat satu spasi.
- Gambar
Gambar bisa berupa foto, grafik, diagram dan peta. Judul ditulis secara singkat dan jelas, spasi tunggal. Keterangan yang menyertai gambar harus dapat berdiri sendiri, ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Gambar dikirim dalam bentuk .jpeg dengan resolusi minimal 300 dpi.
- Daftar Pustaka
Sitasi dalam naskah adalah nama penulis dan tahun. Bila penulis lebih dari satu menggunakan kata 'dan' atau *et al.* Contoh: (Kramer, 1983), (Hamzah dan Yusuf, 1995), (Premachandra *et al.*, 1992). Bila naskah ditulis dalam bahasa Inggris yang menggunakan sitasi 2 orang penulis

maka digunakan kata 'and'. Contoh: (Hamzah and Yusuf, 1995).

- a. Jurnal
Nama jurnal ditulis lengkap.
Premachandra GS, H Saneko, K Fujita and S Ogata. 1992. Leaf Water Relations, Osmotic Adjustment, Cell Membrane Stability, Epicuticular Wax Load and Growth as Affected by Increasing Water Deficits in Sorghum. *Journal of Experimental Botany* **43**, 1559-1576.
- b. Buku
Kramer PJ. 1983. *Plant Water Relationship*, 76. Edisi ke-(bila ada). Academic, New York.
- c. Prosiding atau hasil Simposium/Seminar/Lokakarya.
Hamzah MS dan SA Yusuf. 1995. Pengamatan Beberapa Aspek Biologi Sotong Buluh (*Septoteuthis lessoniana*) di Sekitar Perairan Pantai Wokam Bagian Barat, Kepulauan Aru, Maluku Tenggara. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XI*, Ujung Pandang 20-21 Juli 1993. M Hasan, A Mattimu, JG Nelwan dan M Litaay (Penyunting), 769-777. Perhimpunan Biologi Indonesia.
- d. Makalah sebagai bagian dari buku
Leegood RC and DA Walker. 1993. Chloroplast and Protoplast. In: *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. DO Hall, JMO Scurllock, HR Bohlar Nordenkamp, RC Leegood and SP Long (Eds), 268-282. Chapman and Hall. London.
- e. Thesis dan skripsi.
Keim AP. 2011. Monograph of the genus *Orania* Zipp. (Arecaceae; Oraniinae). University of Reading, Reading. [PhD. Thesis].
- f. Artikel online.
Artikel yang diunduh secara online mengikuti format yang berlaku misalnya untuk jurnal, buku atau thesis, serta dituliskan alamat situs sumber dan waktu mengunduh. Tidak diperkenankan untuk mensitasi artikel yang tidak melalui proses *peer review* atau artikel dari laman web yang tidak bisa dipertanggung jawabkan kebenarannya seperti wikipedia.
Forest Watch Indonesia[FWI]. 2009. Potret keadaan hutan Indonesia periode 2000-2009. <http://www.fwi.or.id>. (Diunduh 7 Desember 2012).

Formulir persetujuan hak alih terbit dan keaslian naskah

Setiap penulis yang mengajukan naskahnya ke redaksi Berita Biologi akan diminta untuk menandatangani lembar persetujuan yang berisi hak alih terbit naskah termasuk hak untuk memperbanyak artikel dalam berbagai bentuk kepada penerbit Berita Biologi. Sedangkan penulis tetap berhak untuk menyebarkan edisi cetak dan elektronik untuk kepentingan penelitian dan pendidikan. Formulir itu juga berisi pernyataan keaslian naskah, yang menyebutkan bahwa naskah adalah hasil penelitian asli, belum pernah dan sedang diterbitkan di tempat lain.

Penelitian yang melibatkan hewan

Untuk setiap penelitian yang melibatkan hewan sebagai obyek penelitian, maka setiap naskah yang diajukan wajib disertai dengan 'ethical clearance approval' terkait *animal welfare* yang dikeluarkan oleh badan atau pihak berwenang.

Lembar ilustrasi sampul

Gambar ilustrasi yang terdapat di sampul jurnal Berita Biologi berasal dari salah satu naskah. Oleh karena itu setiap naskah yang ada ilustrasi harap mengirimkan ilustrasi dengan kualitas gambar yang baik disertai keterangan singkat ilustrasi dan nama pembuat ilustrasi.

Proofs

Naskah *proofs* akan dikirim ke author dan diwajibkan membaca dan memeriksa kembali isi naskah dengan teliti. Naskah proofs harus dikirim kembali ke redaksi dalam waktu tiga hari kerja.

Naskah cetak

Setiap penulis yang naskahnya diterbitkan akan diberikan 1 eksemplar majalah Berita Biologi dan reprint. Majalah tersebut akan dikirimkan kepada *corresponding author*.

Pengiriman naskah

Naskah dikirim dalam bentuk .doc atau .docx.

Alamat kontak: Redaksi Jurnal Berita Biologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI

Cibinong Science Centre, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911

Telp: +61-21-8765067

Fax: +62-21-87907612, 8765063, 8765066

Email: jurnalberitabiologi@yahoo.co.id

berita.biologi@mail.lipi.go.id

BERITA BIOLOGI

Vol. 16 (1)

Isi (*Content*)

April 2017

MAKALAH HASIL RISET (ORIGINAL PAPERS)

INDUKSI BIAK KALUS DAN BIAK SUSPENSI SEL *Aquilaria malaccensis* Lam. [Induction of Callus Culture and Cell Suspension Culture of *Aquilaria malaccensis* Lam.]

Aryani Leksonowati, Witjaksono dan Diah Ratnadewi 1 - 11

BAKTERI ENTOMOPATOGEN SEBAGAI AGEN BOKONTROL TERHADAP LARVA *Spodoptera litura* (F.) [Entomopathogenic Bacteria as Biocontrol Agent Against *Spodoptera litura* (F.) Larvae]

Ni Putu Ratna Ayu Krishanti, Bramantyo Wikantyo, Aprivi Zulfitri dan Deni Zulfiana 13 - 21

PENINGKATAN PERTUMBUHAN PADI VAR. CIHERANG SETELAH DIINOKULASI DENGAN *Azospirillum* MUTAN MULTIFUNGSI PENAMBAT N₂, PELARUT P DAN PENGHASIL FITOHORMON INDOLE ACETIC ACID (IAA) [The growth enhancement of rice var. Ciherang after inoculated with *Azospirillum* mutants multifunction capable of N₂-fixation, P solubilization, and producing phytohormone indole acetic acid (IAA)]

Eny Ida Riyanti dan Edy Listanto 23 - 30

KUALITAS SEMEN BEKU DOMBA GARUT (*Ovis aries*) PADA PENAMBAHAN SUKROSA DALAM PENGECER SEMEN TRIS KUNING TELUR [The Quality of Garut Ram (*Ovis aries*) Frozen Semen In Tris Egg Yolk Extender to The Sucrose Supplementation]

Herdis Suharman 31 - 38

PENGELOLAAN AIR, BAHAN ORGANIK DAN VARIETAS ADAPTIF UNTUK MENINGKATKAN HASIL PADI DI LAHAN RAWA PASANG SURUT [Water Management, Organic Matter Application and Using Adaptable Variety to Increase Rice (*Oryza sativa* L.) Productivity on Tidal Swamp Land]

Koesrini dan Khairil Anwar 39 - 46

POTENSI SERAPAN CO₂ PADA BEBERAPA JENIS KANTONG SEMAR (*Nepenthes* spp.) DATARAN RENDAH [Potency of CO₂ Absorption of Lowland Pitcher Plants (*Nepenthes* spp.)]

Muhammad Mansur 47 - 57

CLONING, EXPRESSION, AND PARTIAL PURIFICATION OF PLANTARICIN W LOCUS PRODUCED BY *Lactobacillus plantarum* S34 [Kloning, Ekspresi, dan Purifikasi Parsial Lokus Plantarisin W Diproduksi oleh *Lactobacillus plantarum* S34]

Rifqiyah Nur Umami, Apon Zaenal Mustopa, Linda Sukmarini, Hasim Danuri, Andini Setyanti Putri, and Krisna Dwi Aria Wibowo 59 - 67

MIKROBA ENDOFIT DARI TANAMAN SRIKAYA (*Annona squamosa* L.) SEBAGAI PENGHASIL ANTI-MIKROBA *Staphylococcus aureus* DAN *Candida albicans* [Antimicrobial activity of endophytic microbes from sugar-apple (*Annona squamosa* L.) plant againsts *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*]

Ruth Melliawati dan Sunifah 69 - 83

KARAKTERISASI PISANG REJANG TETRAPLOID HASIL INDUKSI DENGAN ORYZALIN [Characterization of tetraploid Pisang Rejang induced by oryzalin]

Yuyu S. Poerba, T Handayani dan Witjaksono 85 - 93

KOMUNIKASI PENDEK

CATATAN KEKAYAAN JENIS GASTROPODA DI PESISIR PULAU LETI, KAWASAN BANDA SELATAN [Note on Species Richness of Gastropoda in Coastal Area of Leti Island, Southern Banda]

Muhammad Masrur Islami 95 - 99

KEANEKARAGAMAN KEONG DI PULAU ENGGANO, BENGKULU UTARA [The snails diversity in Enggano Island, Northern Bengkulu]

Heryanto 101 - 110