

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA, KERANGKA BERPIKIR DAN HIPOTESIS

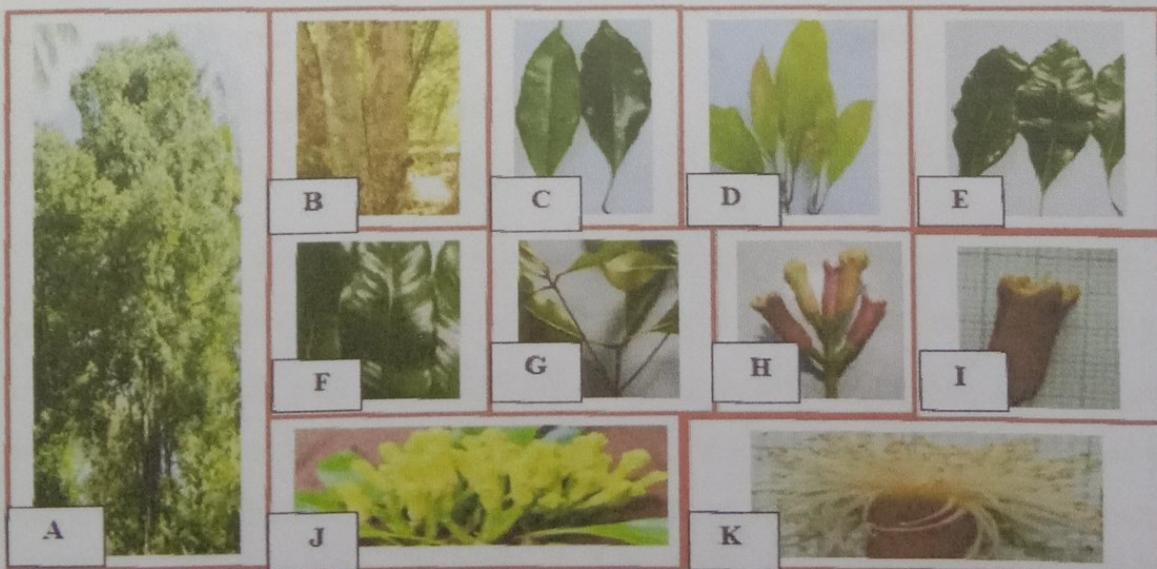
#### 2.1. Tinjauan pustaka

##### 2.1.1. Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.)

Menurut Suwanto dan Hermawati. (2014) tanaman cengkeh dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : Plantae  
Filum : Angiospermae  
Kelas : Magnoliopsida  
Ordo : Myrtales  
Famili : Myrtaceae  
Genus : *Syzygium*  
Spesies : *Syzygium aromaticum* L.

Tanaman cengkeh sudah dikenal oleh masyarakat luas terutama penggemar rokok kretek. Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dalam bahasa Inggris disebut cloves, adalah tangkai bunga kering beraroma dari keluarga pohon Myrtaceae. Cengkeh adalah tanaman asli Indonesia Gambar 1 menampilkan morfologi tanaman cengkeh, contohnya varietas Zanzibar.



Gambar 1. Morfologi Cengkeh Zanzibar : (A) Bentuk Pohon/Mahkota Tanaman, (B) Warna Batang Utama, (C) Bentuk Daun, (D) Warna Daun Muda, (E) Warna Daun Tua, (F) Glossy Permukaan daun, (G) Letak Daun, (H) Bentuk Bunga, (I) Warna Bud/Bunga, (J) Warna Bunga Muda, (K) Warna Benang Sari.

Sumber : Soenarsih, Wahyudiyono, dan Manda (2021)

Cengkeh Zanzibar merupakan tetua dari semua jenis cengkeh yang ada. Pohonnya rimbun, sehingga membuat buah sangat lebat saat musim berbunga, warna tabung bunga umumnya berwarna merah dan warna pangkal agak kehijauan (Soenarsih *et al.*, 2021). Tabel 1 menampilkan informasi tentang sifat-sifat morfologis cengkeh (warna bunga, bentuk daun, dan sebagainya).

Tabel 1. Morfologi Tanaman Cengkeh Zanzibar (ZZBR)

No	Karakter Morfologi	Keterangan
A	Bentuk pohon/mahkota Tanaman	Oblong
B	Warna batang utama	Coklat
C	Bentuk daun	Elliptic
D	Warna daun muda	Hijau muda kekuningan
E	Warna daun tua	Hijau Tua
F	Glosy permukaan daun	Mengkilat
G	Letak daun	Berhadapan
H	Bentuk bunga	Bulat telur sungsang
I	Warna Bud/bunga	Merah
J	Warna Bunga Muda	Hijau
K	Warna Benang Sari	Krim

Sumber : Soenarsih *et al.*, (2021)

Tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) merupakan tanaman yang perakarannya kurang berkembang yang menyebabkan akar tersebut kurang kuat untuk menopang pohon dibandingkan dengan ketinggiannya. Pohon cengkeh memiliki susunan akar yang terdiri dari tudung akar yang melindungi akar ketika menembus tanah, akar tunggang yang lurus masuk ke dalam tanah, akar tunggang palsu yang tumbuh di bawah akar samping, akar samping yang terletak mendatar di permukaan tanah, dan bulu akar yang bagian dari akar yang bertekstur halus.

Batang pohon cengkeh besar dan berkayu keras, mampu bertahan hidup puluhan bahkan sampai ratusan tahun, tingginya dapat mencapai 20 sampai 30 meter, serta cabang-cabangnya cukup lebat. Cabang-cabang cengkeh pada umumnya panjang dan dipenuhi oleh ranting-ranting kecil yang mudah patah. Mahkota atau tajuk pohon cengkeh berbentuk kerucut. Daun cengkeh merupakan daun tunggal berwarna hijau berbentuk bulat telur memanjang dengan bagian ujung dan pangkalnya menyudut, rata-rata mempunyai ukuran lebih besar berkisar 2 sampai 3 cm, serta panjang daun tanpa tangkai berkisar 7,5 sampai 12,5 cm. Bunga dan buah cengkeh muncul pada ujung ranting dengan tangkai pendek dan bertandan. Pada saat masih muda bunga cengkeh berwarna keungu-unguan, kemudian berubah menjadi kuning kehijau-hijauan dan berubah menjadi merah muda apabila sudah tua. Bunga cengkeh kering berwarna coklat kehitaman dan berasa pedas, hal ini disebabkan mengandung minyak atsiri (Mandiri, 2010).

Pohon cengkeh menghasilkan buah dan biji. Buah ini memiliki bentuk seperti telur ayam yang terbalik yang berukuran kecil sekitar 2,5 cm. Jika buah sudah masak kulitnya berwarna merah dan di dalamnya berisi biji bercelah yang mengandung 1 atau 2 lembaga (Syamsulbahri, 2002). Biji cengkeh memiliki ukuran yang sangat kecil, berwarna kecokelatan, dan semakin tua umur tanaman cengkeh maka kualitas bijinya akan semakin baik.

#### 2.1.2. Perbanyak tanaman secara in vitro

Kultur jaringan adalah suatu metode penanaman protoplas, sel, jaringan, dan organ pada media buatan dalam kondisi aseptik sehingga dapat beregenerasi menjadi tanaman lengkap. Kultur jaringan telah dikenal secara meluas dan telah banyak diusahakan untuk tujuan komersial dengan perbanyak tanaman (Mariska dan Sukmadjaja, 2003). Prinsip dasar kultur jaringan yaitu teori totipotensi yang dimiliki oleh sel tumbuhan yang merupakan suatu kemampuan sel tunggal untuk mengekspresikan genom dengan pembelahan sel untuk tumbuh menjadi individu baru yang identik dengan induknya.

Keberhasilan kultur jaringan tanaman dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya sterilisasi, pemilihan bahan eksplan, faktor lingkungan seperti pH,

cahaya dan temperatur, serta kandungan ZPT dalam medium kultur (Pangestika, Samanhudi, dan Triharyanto, 2015). Dalam pemilihan bahan eksplan, Purba *et al.*, (2017) menyatakan semua jaringan tanaman yang sel-selnya masih hidup mampu membentuk kalus secara *in vitro*. Akan tetapi jaringan tanaman yang masih muda (belum ada lignifikasi pada dinding selnya) atau jaringan muda yang bersifat meristematik akan lebih mudah menghasilkan kalus. Semakin tua organ tanaman eksplan, maka proses pembelahan dan regenerasi sel cenderung menurun, oleh karena itu jaringan yang masih muda lebih baik digunakan karena pada umumnya jaringan tersebut masih berproliferasi daripada jaringan yang berkayu atau yang sudah tua.

Keunggulan dari teknik kultur jaringan yaitu dapat memproduksi bibit secara massal dalam waktu yang singkat, tidak terbatas oleh musim karena bisa diproduksi kapan saja, menghasilkan tanaman yang memiliki sifat yang sama dengan induknya, membuat tanaman bebas dari penyakit karena dilakukan secara aseptik, dan stok ketersediaan bibit akan selalu tersedia.

### 2.1.3. Zat Pengatur Tumbuh

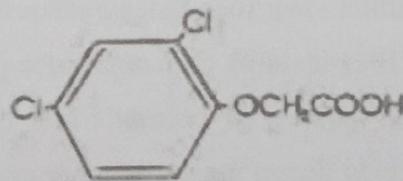
Zat Pengatur Tumbuh (ZPT/Plant Growth Regulator) merupakan senyawa organik non nutrisi pada tumbuhan yang aktif bekerja dalam merangsang, menghambat atau mengubah pertumbuhan dan perkembangan dari suatu tumbuhan pada konsentrasi yang rendah. Pertumbuhan serta perkembangan tersebut bisa secara kualitatif maupun secara kuantitatif. ZPT bisa dihasilkan langsung dari tanaman (endogen) ataupun diberikan dari luar berupa sintetik (eksogen) (Asra *et al.*, 2020). Asra *et al.*, (2020) juga mengemukakan bahwa ahli botani telah menemukan 5 jenis ZPT utama diantaranya adalah auksin, sitokinin, giberelin, etilen serta asam absisat.

Peranan penting ZPT dalam kultur jaringan yaitu mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis pada kultur sel, jaringan, maupun organ. Interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang diberikan mempengaruhi dalam media yang diproduksi oleh sel secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur (Sulistiyorini, Ibrahim, dan Syafaruddin, 2012). Auksin dan sitokinin yang cukup dan seimbang dibutuhkan dalam kultur jaringan atau *in vitro* karena

auksin seperti 2,4-D dapat meningkatkan daya aktivitas dalam memacu pembelahan sel.

a. 2,4-D (*2,4 Dikhlorofenoksiasetat*)

2,4-D merupakan auksin sintetik terbaik dari berbagai jenis auksin sintetik lainnya. 2,4-D merupakan senyawa aktif seperti IAA dan memiliki gugus asam asetat tetapi tidak memiliki ciri indol. 2,4-D dapat digunakan sebagai herbisida, dan dalam dosis rendah dapat menginduksi pembentukan kalus sebab aktivasi tinggi yang dimiliki oleh 2,4-D. 2,4-D juga secara langsung dapat mempengaruhi proses embriogenesis pada sel-sel somatik (Asra *et al.*, 2020). Hormon auksin 2,4-D dengan rumus molekul  $C_8H_6Cl_2O_3$  (Gambar 2) memiliki kemampuan untuk merangsang pembentukan sel. Mahadi, Syafi'i dan Sari (2016) menyatakan konsentrasi yang rendah  $<5$  mg/L hormon 2,4-D pada tanaman dikotil dapat merangsang induksi kalus.



Gambar 2 . Struktur Kimia 2,4-D  
Sumber : George, Hall, Klerk (2008)

b. Air kelapa

Air kelapa merupakan salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai pengganti zat pengatur tumbuh sintetis. Menurut Dwi, Waenati, Muslimin, dan Suwastika (2012) air kelapa dapat berfungsi sebagai buffer atau larutan penyangga selain sebagai sumber nutrisi. George and Sherington (1984) dalam Sulistiyorini *et al.*, (2012) menjelaskan bahwa air kelapa merupakan endosperm (cadangan makanan) sebagai sumber energi yang kaya akan unsur-unsur hara. Air kelapa juga mengandung beberapa zat yang penting untuk pertumbuhan kultur selain auksin

dan sitokinin (dominan), yaitu asam amino, asam nukleat, purin, asam organik, gula, vitamin dan mineral.

Air kelapa muda mengandung kinetin sebanyak 273,62 mg/L dan zeatin sebanyak 290,47 mg/L (Kristina dan Syahid, 2012). Air kelapa juga mengandung senyawa cyclitols. Jenis cyclitols yang dikandungnya adalah suelonositol dan myoinositol yang jumlahnya cukup tinggi. Salah satu jenis senyawa cyclitols yang terkenal adalah inositol. Perpaduan antara fraksi yang terdapat di dalam air kelapa dengan inositol mampu mendorong pertumbuhan kalus dari wortel dan beberapa spesies tanaman lain. Selain bekerjasama dengan fraksi yang terdapat di dalam air kelapa. Inositol juga dapat bekerjasama dengan fitohormon lain seperti auksin, sitokinin (jenis kinetin) dalam menginduksi kalus tanaman. Selain itu, inositol juga memiliki peran dalam proses seperti dalam hal pembelahan sitokinesis. Inositol juga dapat mengubah glukosa menjadi asam galakturonat dan glukaronat. Dimana dinding sel primer pada tanaman disusun oleh kedua jenis asam tersebut.

#### 2.1.4. Kultur kalus

Kultur kalus merupakan salah satu jenis kultur jaringan. Kalus merupakan massa sel yang belum terdiferensiasi. Silalahi (2015) menuturkan bahwa kultur kalus merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk mendapatkan bibit tanaman khususnya yang terancam punah atau yang susah dibiakkan secara alami. Kalus dirancang membentuk individu baru melalui embriogenesis somatis. Embriogenesis somatis merupakan pembentukan embrio tanaman yang dirangsang dari kalus atau sel-sel yang belum mengalami diferensiasi. Menurut Lestari (2008) tujuan kultur kalus adalah untuk memperoleh kalus dari eksplan yang dipisahkan dari induknya yang ditumbuhkan dalam lingkungan yang sesuai.

Kalus adalah suatu kumpulan sel yang bersifat embrioid (meristematik) dan tidak terorganisasi (Prasetyorini, 2019). Sel penyusun kalus adalah sel-sel parenkim yang mempunyai ikatan yang renggang dengan ikatan lain. Kalus dapat dihasilkan dari organ tanaman seperti daun, batang, hipokotil, kotiledon, dan embrio zigotik, yang ditumbuhkan dalam media yang mengandung auksin dan sitokinin (Lestari, 2008).

### 2.1.5. Interaksi zat auksin dan sitokinin terhadap induksi kalus

Dalam kultur jaringan terdapat 2 golongan ZPT yaitu auksin dan sitokinin. Auksin pada umumnya memiliki peran untuk merangsang pertumbuhan kalus, suspensi sel, dan organ, namun pada konsentrasi tertentu auksin mampu merangsang pembentukan akar dan kuncup. ZPT Auksin diantaranya yaitu, IAA, NAA, IBA, 2,4-D, dan Pikloram. Setiap ZPT Auksin tersebut memiliki karakteristik tersendiri dalam pengaplikasiannya, sebagai contoh 2,4-D yang sering digunakan dalam menginduksi kalus.

Hormon sitokinin memiliki fungsi dalam pembelahan sel dan morfogenesis, seperti pertumbuhan ranting pada area buku atau ruas batang tanaman. Hormon sitokinin diantaranya yaitu, BAP (*Benzyl Amino Purine*), TDZ (*Thidiazuron*), 2-iP (*2-Isopentenyl Adenine*), dan Kinetin. Secara alami zat pengatur tumbuh atau hormon dapat diperoleh dari alam seperti air kelapa, ekstrak jus tomat, pisang dan sebagainya (Sulistiyorini *et al.*, 2012).

Peran fitohormon dalam kultur jaringan tanaman terutama induksi kalus seperti auksin dan sitokinin dalam media menyebabkan terjadinya interaksi antara kedua hormon tersebut sehingga terjadi perimbangan antara hormon eksogen dengan hormon endogen yang terdapat dalam tanaman yang menentukan kecepatan dan arah perkembangan suatu kultur. Menurut Reddy *et al.*, (2008) auksin dan sitokinin eksogen yang ditambahkan akan berinteraksi dengan hormon endogen tanaman dan jaringan akan menanggapi aplikasi hormon eksogen tersebut. Auksin memiliki pengaruh yang kuat pada proses-proses seperti ekspansi pertumbuhan sel, pengasaman dinding sel, dan mempercepat diferensiasi vaskular. Staden, Zazimalova, dan George (2008) menjelaskan bahwa fungsi sitokinin bersama dengan auksin memiliki efek stimulasi pada pembentukan kalus, pertumbuhan dan regenerasi. Menurut Hogue *et al.*, (2006) sitokinin mempengaruhi pembentukan kalus dengan menurunkan lignifikasi dinding sel sehingga meningkatkan inisiasi dan perkembangan kalus secara *in vitro*. Interaksi antara sitokinin dan auksin mengontrol pertumbuhan sel, diferensiasi sel, dan organogenesis dalam kultur jaringan.

Konsentrasi auksin dan sitokinin baik endogen maupun eksogen, berperan dalam pembentukan kalus pada berbagai spesies tumbuhan. Secara umum, persentase seimbang auksin dan sitokinin mampu menginduksi kalus, sedangkan persentase yang tinggi dari auksin ke sitokinin atau sitokinin ke auksin masing-masing berperan dalam merangsang pembaruan akar dan tunas (Dar *et al.*, 2021). Pada beberapa tanaman pemberian persentase yang tinggi dari auksin ke sitokinin mampu menginduksi kalus, hal ini persis seperti yang dikatakan oleh Ariani, Anggraito, dan Rahayu (2016) bahwa waktu terbentuknya kalus cenderung lebih cepat ketika konsentrasi 2,4-D meningkat dalam pembentukan kalus dari eksplan setengah biji koro benguk (*Mucuna pruriens* L.).

Auksin merupakan hormon penting untuk menginduksi kalus. Menetapkan konsentrasi auksin dalam sel tumbuhan selama fase induksi embriogenesis somatik sangat penting untuk memulai dediferensiasi dan pembelahan sel (Astutik *et al.*, 2022). Pada beberapa penelitian konsentrasi auksin yang tinggi justru menjadi penghambat atau menghambat pertumbuhan dan perkembangan kalus. Menurut Suprpto (2004) pada konsentrasi yang tinggi, auksin lebih bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan, hal ini dikarenakan konsentrasi auksin yang lebih tinggi hampir selalu meningkatkan produksi etilen. Staden *et al.*, (2008) menjelaskan bahwa etilen yang terakumulasi dalam pembuluh kultur jaringan kemudian dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman yang ditanam dengan kultur jaringan.

Perbandingan relatif konsentrasi ZPT golongan auksin dan sitokinin dapat mengatur proses diferensiasi secara *in vitro*. Perbandingan konsentrasi auksin yang lebih tinggi dari sitokinin dapat menyebabkan terangsangnya pembentukan akar, sebaliknya bila konsentrasi sitokinin lebih tinggi dari auksin, maka akan terbentuk pucuk (Karjadi dan Buchory, 2008). Kemudian untuk membentuk kalus diperlukan konsentrasi yang seimbang antara auksin dan sitokinin.

## 2.2. Kerangka pemikiran

Induksi kalus dalam teknik kultur jaringan tanaman dimaksudkan untuk memunculkan keragaman sel somatik di dalam kultur *in vitro* dan meregenerasikan sel tersebut menjadi embrio somatik. Pembentukan kalus dalam kultur jaringan dipengaruhi oleh konsentrasi ZPT yang digunakan. Jika konsentrasi auksin lebih tinggi daripada konsentrasi sitokinin maka kalus akan terbentuk, sedangkan jika konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi daripada konsentrasi auksin maka yang terbentuk adalah shoot (Silalahi 2015).

Dalam induksi kalus hormon auksin 2,4-D merupakan hormon auksin sintetik yang memiliki aktifitas yang tertinggi sehingga lebih mudah diserap oleh tanaman dan berfungsi mendorong aktivitas morfogenik. 2,4-D juga secara langsung dapat mempengaruhi proses embriogenesis pada sel-sel somatik (Asra *et al.*, 2020). Setiawati *et al.*, (2021), menyatakan air kelapa merupakan sumber sitokinin alami yang banyak digunakan dalam kultur jaringan. Menurut Renvilla, Bintoro, dan Riniarti (2016) air kelapa mempunyai aktivitas sitokinin untuk pembelahan sel dan mendorong pembentukan organ. Zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin tidak bekerja sendiri-sendiri, tetapi kedua ZPT tersebut bekerja secara berinteraksi dalam mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan bahan tanaman (Karjadi dan Buchory, 2008). Sitokinin merangsang pembelahan sel tanaman berinteraksi dengan auksin dalam menentukan arah diferensiasi sel (Asra *et al.*, 2020).

Aziz, Ratnasari, dan Rahayu (2014), menyatakan bahwa kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP berpengaruh terhadap induksi kalus umbi iles-iles dan kombinasi konsentrasi terbaik dalam menginduksi kalus umbi iles-iles adalah 1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BAP dengan rerata waktu induksi 13 hari, rerata biomassa kalus  $567 \pm 413$  mg, rerata pembentangan eksplan  $7,31 \pm 1,70$  mm, dan terbentuk kalus yang kompak dan berwarna putih. Pada penelitian Dwi *et al.* (2012), medium MS dengan pemberian air kelapa 10% dan 2,4-D mampu menginduksi kalus pada tanaman anggur hijau dan media yang paling baik yaitu MS0 + 2,4-D 1,5 ppm + air kelapa 10% dengan merespon saat munculnya kalus pada 11 HST, persentase kalus 76,67%, dengan selnya yang aktif membelah, bertekstur kompak, dan warna kalus hijau kecoklatan

Ulfa (2011), menyatakan bahwa mekanisme kerja 2,4-D dalam pembentukan kalus diawali dengan difusi senyawa ke dalam jaringan tanaman melalui luka. 2,4-D yang diberikan kemudian akan merangsang jaringan eksplan untuk menstimulasi pembelahan sel terutama sel-sel yang berada di sekitar daerah luka. Diperlukan perimbangan auksin dan sitokinin agar kalus dapat berkembang dengan cepat. Menurut Wahyuningtyas, Resmirasi, dan Nashichuddin (2014), ZPT tunggal tidak dapat mengimbangi atau bahkan dapat menghambat hormon endogen dalam eksplan untuk membentuk kalus. Pemberian auksin efektif untuk pembentukan kalus, namun sitokinin sangat dibutuhkan untuk proliferasi kalus. Untari dan Puspitaningtyas (2006), menjelaskan bahwa zat pengatur pertumbuhan yang terdapat di dalam air kelapa mampu menstimulasi proliferasi pada jaringan tumbuhan. Mahfudza, Mukarlina, dan Linda (2018), menyatakan bahwa air kelapa mengandung difenil urea yang mempunyai efektifitas yang menyerupai sitokinin. Kombinasi dari hormon auksin 2,4-D dan hormon sitokinin dalam air kelapa yang tepat dapat memacu pertumbuhan kalus.

Menurut Rivai dan Hendra (2015), 2,4-D memiliki kemampuan dalam merangsang terbentuknya kalus serta dapat meningkatkan rata-rata persentase eksplan pada daun dan internode pada tanaman *Chrysanthemum indicum* yang hingga 89,23%. Rasud, Basri, dan Sahiri (2019), melaporkan bahwa komposisi media yang terbaik untuk induksi kalus daun cengkeh adalah media MS yang ditambahkan 0,5 ppm 2,4-D. Pada komposisi media tersebut diperoleh saat muncul kalus paling cepat, yaitu rata-rata 6,00 MST dengan persentase pembentukan kalus tertinggi mencapai 100% dengan warna dan tekstur kalus yang dihasilkan putih dan remah. Pada penelitian yang lain Rasud dan Bustaman (2020), menjelaskan bahwa jenis dan konsentrasi auksin yang lebih baik untuk induksi kalus daun cengkeh adalah 2,4-D pada konsentrasi 0,75 ppm. Pada jenis dan konsentrasi auksin tersebut diperoleh kecepatan atau saat muncul kalus yang paling cepat, yaitu rata-rata 4,22 minggu setelah tanam (MST) dengan persentase pembentukan kalus mencapai 100%. Umumnya warna kalus berwarna putih, putih kekuningan dan kecokelatan, sedangkan tekstur kalus yang terbentuk adalah remah, kompak, dan intermediet.

Penggunaan air kelapa dalam kultur jaringan sudah banyak dilakukan. Air kelapa dapat berfungsi sebagai *buffer* atau larutan penyangga selain sumber nutrisi. Penambahan air kelapa yang di autoclave pada konsentrasi 15% sebagai substitusi ZPT sintetik Benzyl Adenin menghasilkan multiplikasi tunas temulawak terbaik *in vitro* dengan rata-rata 3,4 tunas dalam waktu 2 bulan.

Penelitian-penelitian di atas menunjukkan bahwa media kultur yang ditambahkan 2,4-D dan air kelapa memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan kalus, namun pada tanaman cengkeh penelitian secara *in vitro* menggunakan 2,4-D dan air kelapa masih perlu dilakukan untuk mengetahui konsentrasi dan kombinasi terbaiknya.

### 2.3. Hipotesis

1. Terdapat interaksi antara hormon auksin 2,4-D dan air kelapa terhadap induksi kalus daun cengkeh.
2. Diperoleh konsentrasi 2,4-D yang optimum, untuk menginduksi kalus eksplan daun cengkeh pada setiap taraf faktor konsentrasi air kelapa.