

Propagation of Gaharu Plant *Gyrinops Versteegii* Species Provenant Beringin Throught in Vitro Culture

Aida Muspiah^{1*}, Tri Mulyaningsih¹, Eka Sunarwidhi Prasedya¹

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram-Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

Article History

Received : January 16th, 2023

Revised : February 24th, 2023

Accepted : March 06th, 2023

*Corresponding Author:

Aida Muspiah,

Program Studi Biologi,
Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam, Universitas
Mataram-Mataram, Nusa
Tenggara Barat, Indonesia;
Email: aidamus@unram.ac.id

Abstract: *Gyrinops versteegii* is a non-timber forest product commodity that has a very high economic value. People know this tree as the agarwood tree. In Lombok, the Beringin provenance is one of the leading provenances, so it is very important to conserve its germplasm. This study aims to find alternatives for gaharu development through seed production using in vitro culture techniques. This research was carried out in July 2021 at the Tissue Culture Unit of the Immunobiology Laboratory, University of Mataram. In this experiment there were 8 media treatments with different concentrations of BAP (Ssitokini) and NAA (auxin). The results showed that callus growth occurred on MS 1, MS 3, MS 4, MS 6, and MS 7 media. However, the best growth was obtained in MS 1 treatment with a combination of 1.0 ppm BAP and 0.5 ppm NAA. While most of the samples experienced browning and contamination.

Keywords: callus, culture, *Gyrinops versteegii*, provenance beringin.

Pendahuluan

Gaharu diidentifikasi sebagai kayu karas dari pohon penghasil gaharu yang tumbuh secara alamiah maupun melalui proses budidaya dengan perlakuan infeksi mikroba sehingga mengandung damar wangi. *Gyrinops versteegii* adalah salah satu spesies tumbuhan penghasil gaharu yang ada di pulau Lombok. Sejauh ini teridentifikasi ke dalam 5 varietas, yakni *Gyrinops versteegii* var. *brevistipis* (group Madu), var. *longistipis* (group Pantai), var. *bruneluteolus* (group Buaya), var. *fructioquadratus* (group Beringin), dan var. *tubuliformis* (group Soyun) (Mulyaningsih *et al.*, 2017). Diantara kelima group tersebut *Gyrinops versteegii* provenan Beringin menjadi jenis gaharu unggulan karena memiliki kualitas gaharu terbaik dari varietas lainnya (Mulyaningsih, *et al.*, 2014).

Gyrinops versteegii pada umumnya memiliki habitus perdu sampai pohon dengan tinggi 6-25 m (Susilo *et al.*, 2014). *Gyrinops versteegii* provenan Beringin memiliki warna gubal hitam merata, aromanya wangi lembut dan sel-sel penyusun xilemnya paling rapat

dan padat diantara provenan lainnya. (Mulyaningsih, *et al.*, 2018). Gubal gaharu terbentuk di dalam jaringan kayu pohon gaharu akibat perlukaan (baik oleh serangga, babi hutan, dahan patah atau terbakar) (Mulyaningsih *et al.*, 2015) ataupun terinfeksi oleh jamur seperti *Fusarium solani*, *Aspergillus* sp. dan *Rhizopus* sp (Mega *et al.*, 2012).

Karakteristik gubal gaharu unggul dapat dilihat dari warna gaharu yang lebih gelap (coklat-hitam), berat jenisnya >1 (Mohammed & Lee 2017), kandungan resin antara 20% - 43% (Azah *et al.*, 2013). Tingginya permintaan pasar terhadap gubal gaharu menyebabkan terjadinya eksploitasi secara berlebihan sehingga terjadi penurunan populasi yang drastis di alam. Akibat penurunan tersebut, sejak tahun 2001, tanaman penghasil gaharu masuk dalam daftar CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) APENDIX II atau langka (Millang *et al.*, 2011). Untuk mengatasi penurunan populasi pohon penghasil gaharu, telah dilakukan upaya budidaya dan pembibitan secara generatif dan vegetatif. Namun kedua teknik ini memerlukan waktu yang cukup lama dengan tingkat

keberhasilan yang relatif masih rendah. Salah satu teknik pembibitan pohon penghasil gaharu yang dapat menjadi alternatif adalah metode kultur jaringan tanaman secara *in vitro*.

Kultur jaringan adalah teknik menumbuhkan kembangkan bagian tanaman baik berupa sel, jaringan, organ ataupun protoplas yang dilakukan secara *in vitro* dalam kondisi steril dan bersifat meristematic (Lestari, 2011). Sel, jaringan dan organ dari tanaman pada kondisi steril dapat dipelihara secara terus menerus tanpa batas dengan cara melakukan subkultur secara periodik dalam media tumbuh yang sesuai (Wahyuni *et al.*, 2020). Diharapkan dengan berbagai rancangan media pada percobaan ini dapat memberikan pengaruh yang baik untuk mendukung pertumbuhan eksplan daun *Grynops verstegii* provenan beringin, sehingga bisa menjadi alternatif dalam upaya penyediaan bibit yang berkualitas dan terprogram.

Bahan dan Metode

Rancangan perlakuan

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2021 di unit kultur jaringan Laboratorium Imunobiologi Universitas Mataram. Penelitian diawali dengan menyiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan, kemudian dicuci dan disterilkan dengan autoclave. Penelitian ini menggunakan 8 rancangan percobaan yang dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rancangan percobaan pada penelitian

Kode	Kons. BAP	Kons. NAA
MS 1	1,0 ppm	0,5 ppm
MS 2	1,5 ppm	0,5 ppm
MS 3	2,0 ppm	0,5 ppm
MS 4	1,0 ppm	1,0 ppm
MS 5	1,5 ppm	1,0 ppm
MS 6	2,0 ppm	1,0 ppm
MS 7	1,0 ppm	0 ppm
MS 8	0 ppm	1,0 ppm

Pembuatan media

Pembuatan media dilakukan dengan mencampur 4,43 gram MS dan 30 gram gula dalam Erlenmeyer 1000 ml. kemudian ditambahkan 500 ml aquades dan diaduk rata. Lalu ditambahkan lagi aquades sampai volume 1000 ml dan dipanaskan sambil diaduk dengan

magnetic stirrer. Ketika sudah mendidih larutan media dibagi ke dalam 8 erlenmeyer 250 ml dan ditambahkan masing-masing 1 gram agar, BAP dan NAA dengan konsentrasi sesuai rancangan percobaan yang ada. Kemudian dipanaskan lagi dan dicek cek pH media pada skala 5,8. Kemudian larutan media dibagi ke dalam botol kultur, ditutup dengan aluminium foil dan diberi kode perlakuan.

Sterilisasi media

Media yang sudah terisi di botol kultur dan diberi label kemudian dimasukkan ke dalam autoclave bersama aquades, pinset, scalpel dan cawan petri untuk disterilkan pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm (Widiyastusi dan Deviyanti, 2018).

Sterilisasi sampel daun

Sebelum dikultur daun uji akan disterilkan dengan dicuci pada air mengalir sampai bersih. Kemudian daun dipilih yang kondisi bagus dan tidak terkena penyakit. Daun yang sudah dipilih kemudian direndam dalam larutan klorox 10% dan detergen selama 5 menit sambil diaduk. Kemudian daun dibilas kembali dengan aquades steril beberapa kali sampai busa sabun menghilang.

Kultur sampel

Setelah daun disterilkan kemudian daun dipindahkan cawan petri yang telah diberi kertas saring. Kemudian dipotong bagian midrib daun dan daun dipotong dengan posisi melintang kira-kira 1 cm. potongan daun kemudian ditempatkan pada botol kultur dengan posisi bagian bawah daun menghadap atas. Kemudian botol kultur ditutup dengan aluminium foil.

Inkubasi

Botol kultur yang telah berisi eksplan daun kemudian disusun di rak kultur pada ruang inkubasi dan dilakukan penyemprotan dengan alcohol 70% secara berkala dan dilakukan pengamatan.

Hasil dan Pembahasan

Kontaminasi Media

Penanaman eksplan dilakukan 1 hari setelah media kultur disterilisasi atau pada saat media telah dingin setelah melalui proses

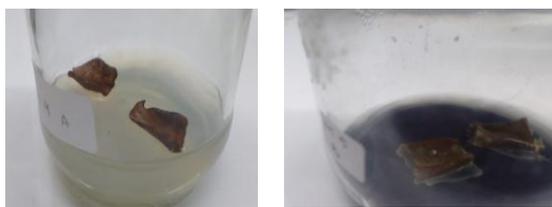
sterilisasi. Media yang digunakan adalah media yang bagus dan tidak mengalami gejala kontaminasi sehingga diyakini kontaminasi bukan berasal dari media. Satu sampai dua minggu setelah eksplan dikultur, tampak pada beberapa botol sampel terjadi kontaminasi terutama oleh jamur. Kontaminasi ini diduga berasal dari proses penanaman eksplan, baik dari proses kerja maupun dari eksplan itu sendiri.



Gambar 1. Sampel yang mengalami kontaminasi

Pencoklatan/browning eksplan

Hambatan pada proses ini adalah terjadinya pencoklatan. Beberapa sampel eksplan tampak terjadi perubahan warna eksplan menjadi coklat kemudian mengering. Hal ini disebabkan adanya metabolisme senyawa fenol pada jaringan yang bersifat toksik (Thomy, 2012). Pencoklatan atau browning merupakan gejala kerusakan fisiologis eksplan. Selain menandakan terjadinya sintesis senyawa fenol, warna coklat juga menandakan ketidakmampuan jaringan untuk bertahan hidup pada media baru (Nadeak, 2015).



Gambar 2. Sampel yang mengalami pencoklatan

Pertumbuhan Kalus

Pengamatan pada minggu kedua menunjukkan hasil yang berbeda. Beberapa perlakuan mulai terbentuk gumpalan atau pembengkakan masa sel terutama pada daerah perlukaan. Hal ini diduga merupakan respon eksplan untuk menutup luka dengan membentuk

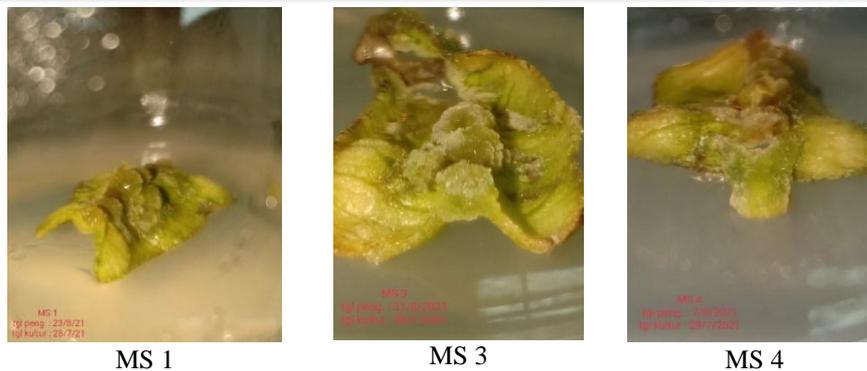
jaringan baru. Sejauh ini pertumbuhan kalus ini belum menunjukkan arah pertumbuhan tertentu. Diduga kalus ini hanya merupakan kumpulan sel meristematic yang terus membelah tanpa terjadi diferensiasi sel.

Tabel 2. Data kemunculan kalus

Kode Perlakuan	Jumlah yang Bertahan	Pertumbuhan Kalus
MS 1	2	+++++
MS 2	-	-
MS 3	2	++++
MS 4	2	++
MS 5	-	-
MS 6	2	+++
MS 7	2	+
MS 8	-	-
MS 6	2	+++
MS 7	2	+
MS 8	-	-

Hal ini sebagaimana diungkapkan Suryowinoto (1996) terbentuknya kalus pada eksplan disebabkan sel-sel yang kontak dengan medium terdorong menjadi meristematic yang aktif membelah namun tidak berdiferensiasi. Pertumbuhan terbaik ditandai dengan munculnya gumpalan sel tercepat dan paling banyak yang tampak pada media dengan perlakuan MS 1 dengan perpaduan BAP 1,0 ppm dan NAA 0,5 ppm. Menurut Patma (2013) penggunaan auksin sintetik bekerja dengan pengaktifan pompa ion pada plasma membrane sehingga akan mendorong terjadinya pembelahan, pembesaran dan pemanjangan sel.

Pertumbuhan kalus juga tampak pada perlakuan MS 3 BAP 2,0 ppm dan NAA 0,5 ppm, MS 6 BAP 2,0 ppm dan NAA 1,0 ppm, MS 4 BAP 1,0 ppm dan NAA 1,0 ppm dan MS 7 BAP 1,0 ppm dan NAA 0 ppm. Sedangkan pada perlakuan MS 2, MS 5 dan MS 8 tidak terjadi pertumbuhan kalus karena sebelum kemunculan kalus, eksplan lebih dulu terkontaminasi oleh jamur dan terjadi browning atau pencoklatan. Hormon BAP (6-benzylaminopurin) mempunyai sifat yang mudah ditranslokasikan, aktif merangsang pertumbuhan kalus, dan aktif dalam meregenerasi kalus maupun tunas (Ayuningrum *et al.*, 2015).



Gambar 3. Eksplan yang mengalami Pengkalusan

Hasil penelitian pada Gambar 3 menunjukkan konsentrasi BAP 1,0 ppm yang dikombinasikan dengan NAA 0,5 ppm menunjukkan reaksi pembentukan kalus yang cukup baik. Perpaduan kedua konsentrasi ZPT ini jika dilihat dari kalus yang terbentuk dapat dikatakan masih merupakan perbandingan yang standar (intermediet) untuk pembentukan kalus meskipun konsentrasi BAP lebih tinggi. Jika perbandingan NAA (auxin) yang lebih tinggi dari BAP (sitokinin) maka kecenderungan pertumbuhan akan mengarah ke pembentukan kalus. Sebagaimana yang dikatakan Thomy (2012) bahwa penambahan auxin pada konsentrasi tinggi dapat memacu pertumbuhan kalus dan jika auxin lebih rendah dari sitokinin kecenderungan pertumbuhan akan ke akar. Namun pada semua perlakuan termasuk pada penggunaan BAP 2 ppm belum menunjukkan tanda-tanda akan terbentuknya akar atau tunas.

Justru kecenderungan pada semua konsentrasi adalah terbentuknya kalus. Hal ini mengindikasikan bahwa pengaruh dari NAA lebih dominan daripada pengaruh BAP pada semua perlakuan. Reaksi pertumbuhan dari pemberian ZPT auxin dan giberelin akan bervariasi tergantung pada jenis eksplan yang digunakan. Pada penelitian Ramdan (2014) konsentrasi sitokinin yang rendah 0,5 mg/L sudah mampu menginduksi kalus *Citrus rootstock* pada umur 8 hari setelah kultur.

Proses pertumbuhannya terdapat beberapa faktor penghambat yang sangat berpengaruh pada kemunculan kalus yakni kontaminasi dan browning. Kontaminasi terjadi secara merata pada semua perlakuan. Hanya sebagian kecil yang tidak terkontaminasi dan tumbuh membentuk kalus. Proses kontaminasi tidak terjadi secara serentak namun terjadi bertahap

pada masing-masing waktu pengamatan. Penanganan sampel yang kontaminasi dilakukan dengan memindahkan sampel tersebut kemudian melakukan penyemprotan dengan alcohol pada botol kultur dan lingkungan sekitar ruang inkubasi. Faktor kedua yang menjadi kendala adalah terjadinya browning atau pencoklatan. Browning merupakan gejala eksplan mengalami pencoklatan yang disebabkan oleh aktivitas senyawa fenolik dalam jaringan terutama pada bagian-bagian akibat perlukaan.

Kesimpulan

Pemberian ZPT eksogen berupa BAP (sitokinin) dan NAA (auxin) pada beragam konsentrasi hanya berpengaruh pada pembentukan kalus *Gynops verstegii* provenan Beringin secara in vitro. Konsentrasi BAP dan NAA yang paling dominan mempengaruhi pertumbuhan kalus adalah pada perlakuan MS 1 dengan kombinasi 1,0 ppm BAP dan 0,5 ppm NAA.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Dekan fakultas MIPA Universitas Mataram. Ketua program studi biologi fakultas MIPA Universitas Mataram. Ketua laboratorium imunobiologi dan staf analis. Dosen dan stakeholder yang terlibat. LPPM Universitas Mataram

Referensi

Ayuningrum, K., Budisantoso, I., & Kamsinah (2015). Pemberian Hormon 2,4-D dan BAP Terhadap Pertumbuhan Subkultur

- Kalus Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) Secara *In Vitro*. *Biosfera*, 32(1): 59-65.
- Azah, Ma. N., S. S. Husni, J Mailina, L Sahrim, J A. Majid & Z M. Faridz (2013). Classification of Agarwood (Gaharu) by Resin Content. *Journal of Tropical Forest Science* 25(2): 213–219.
- Lestari, E. G. (2011). Peranan Zat Pengatur Tumbuh Dalam Perbanyakkan Tanaman Melalui Kultur Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, *Jurnal Agrobiogen*, Bogor, 7(1) : 63-68.
- Mega, D.A. & Swastini (2012). Screening phytochemical and free antiradical activity of methanol leaf extract of gaharu (*Gyrinops versteegii*). *Journal of Chemistry* 4 (2): 187-192.
- Millang S., Bachtiar B., & Makmur A. (2011). Awal pertumbuhan pohon gaharu (*Gyrinops* sp) asal Nusa Tenggara Barat di hutan pendidikan Universitas Hasanudin. *Hutan dan Masyarakat* 6(2): 117-124.
- Mohamed, R. & Shiou Lee. (2017). Keeping Up Appearances: Agarwood Grades and Quality. Chapter 10. <https://www.researchgate.net/publication/303729688>.
- Mulyaningsih T, Muspiah A, & Aryanti E. (2018). Keanekaragaman morfologi *Gyrinops versteegii* (Thymelaceae) di NTB. Laporan Penelitian Universitas Mataram, Mataram.
- Mulyaningsih, T., D. Marsono, Sumardi & I. Yamada (2014). Selection of Superior Breeding Intraspecies Gaharu of *Gyrinops versteegii* (Gilg) Domke, *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 4: 485-92.
- Mulyaningsih, T., D. Marsono, Sumardi & I. Yamada (2015). Community of Eaglewood *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke. and the Diversity of Plant Species Associated in Western Lombok Forest. Paper of International Seminar on The Tropical Natural Resources 2015. Url: <https://www.researchgate.net/publication/301301497>, 2 Juni 2016.
- Mulyaningsih, T., D. Marsono, Sumardi & I. Yamada (2017). Keragaman Intraspesifik Gaharu *Gyrinops Versteegii* (Gilg.) Domke di Pulau Lombok Bagian Barat. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*. 14(1): 1-10
- Nadeak, Romasli, Nelly, A., & Edy B. (2015). Respon Eskplan Biji Gaharu (*Aquilaria Malaccencis* Lamk.) Terhadap Pemberian NAA dan IBA Secara *In Vitro*, Program Studi Kehutanan, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara.
- Patma, Utri. (2013). Respon Media Tanam Dan Pemberian Auksin Asam Asetat Naftalen Pada Pembibitan Aren (*Arenga pinnata* Merr), *Jurnal Online Agroekoteknologi*, 1(2).
- Susilo, A., Kalima, T., & Santoso, E., (2014). Panduan Lapangan Pengenalan Jenis Pohon Penghasil Gaharu *Gyrinops* Spp, di Indonesia. Bogor, Indonesia: Kementerian Kehutanan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Pusat Penelitian dan Pengembangan Konservasi dan Rehabilitasi - International Tropical Timber Organization (Itto).
- Thomy, Z., (2012), Effect of Plant Growth Regulator 2,4-D and BAP on callus Growth of Plants Producing Gaharu, Prasiding Seminar Hasil Nasional Biologi, Medan.
- Wahyuni A., Satria B., & Zainal A. (2020). Induksi kalus gaharu dengan NAA dan BAP secara in vitro. *Agrosains: Jurnal Penelitian Agronomi* 22 (1): 39-4
- Widyastuti, N., & Deviyanti, J., (2018). Kultur Jaringan Teori dan Praktik Perbanyakkan Tanaman Secara In Vitro, penerbit ANDI, Yogyakarta.