



**KARAKTERISASI EKSPRESI GEN EMBRIOGENESIS SELAMA
FASE REGENERASI DENGAN PERLAKUAN KOMBINASI
HORMON AUKSIN DAN SITOKININ PADA
KULTUR KAPAS (*Gossypium hirsutum* L.)**

*diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan memperoleh gelar Sarjana, pada
program studi Agroteknologi*

SKRIPSI

Oleh

**Mitha Aprilia Mufadilah
201510501126**

**KEMETERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS PERTANIAN
PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
JEMBER
2023**

PERSEMBAHAN

Puji syukur atas rahmat Allah SWT, skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Kedua orang tua saya, Ibu Jazlah dan Bapak Murjito yang senantiasa mendoakan dan memberikan dukungan, sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini tanpa kendala yang berarti;
2. Mitha Aprilia Mufadilah, semoga skripsi ini dapat menjadi pengingat akan semua langkah yang telah dilalui dan menjadi penyemangat untuk melanjutkan langkah-langkah berikutnya;
3. Kakak-kakak saya (Mas Arifin, Mba Evi, Mba Chalis, Mba Intan, Mira) dan keponakan (Avicenna dan Rayyan) tersayang yang selalu mendukung, menginspirasi dan memberikan motivasi dalam hidup saya untuk terus berkembang;
4. Teman-teman saya, yang selalu menemani dan kebersamai dalam setiap langkah dan proses yang saya tempuh;
5. Fakultas Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا

For indeed, with every hardship there is relief

(QS 94:5)

Flowers need time to bloom and so do you



PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Mitha Aprilia Mufadilah

NIM : 201510501126

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: *Karakterisasi Ekspresi Gen Embriogenesis selama Fase Regenerasi dengan Perlakuan Hormon Auksin dan Sitokinin pada Kultur Kapas (Gossypium hirsutum L)* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan skripsi ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 19 Juni 2023

Yang menyatakan,
(Meterai Rp 10.000,00)

Mitha Aprilia Mufadilah

NIM 201510501126

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi berjudul *Karaktertisasi Ekspresi Gen Embriogenesis selama Fase Regenerasi dengan Perlakuan Hormon Auksin dan Sitokinin pada Kultur Kapas (Gossypium hirsutum L.)* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian Universitas Jember pada:

Hari : Rabu

Tanggal : 31 Mei 2023

Tempat : Ruang Sidang B Fakultas Pertanian Universitas Jember

Pembimbing

Tanda Tangan

1. Pembimbing Utama

Nama : Mohammad Ubaidillah, S.Si. M.Agr., Ph.D.(.....)

NIP : 198612112019031008

Penguji

1. Penguji Utama

Nama : Wahyu Indra Duwi Fanata, SP., M.Sc., PhD.(.....)

NIP : 198102042015041001

2. Penguji Anggota 1

Nama : Ummi Sholikhah, S.P., M.P. (.....)

NIP : 197811302008122001

ABSTRACT

Exogenous hormones can be used within media to meet the high efficiency on plant regeneration during somatic embryogenesis. In Indonesian cotton plants, the efficiency of regeneration media as indicated by the morphological response of cotton plants and the expression of embryogenesis genes needs to be studied. The aims of this study were to determine the effect of 2,4-D and IBA hormones on the morphology and induction of cotton callus; to determine the effect of regeneration media with the different combination of auxin and cytokinin on the morphology and gene expression of cotton plant during embryogenesis. This research was conducted by inducing cotton callus on MS0 medium, MS Basal + 0.1 mg/L 2,4-D and MS Basal + 0.1 mg/L IBA. The best callus induction results were regenerated on regeneration media M1 (MS Vitamin + 0.01 ppm 2,4-D + 0.3 ppm IBA + 0.5 ppm Kinetin), M2 (MS Vitamin + 0.01 ppm 2,4-D + 0.5 ppm IBA + 0.5 ppm Kinetin), M3 (MS Vitamin + 0.00 ppm 2,4-D + 0.3 ppm IBA + 0.5 ppm Kinetin), and M4 (MS Vitamin + 0, 00 ppm 2,4-D + 0.5 ppm IBA + 0.5 ppm Kinetin). Embryogenesis gene expression was observed through RNA isolation, cDNA synthesis, PCR, and visualization methods. The best morphological results for callus induction were obtained on MS Basal + 0.1 mg/L 2,4-D medium with a compact and white callus texture character that indicates high embryogenic and regeneration ability. In the regeneration phase, the highest percentage of regenerated callus parameters was found in M2 media. Several embryogenesis genes were expressed such as GhSERK1, GhSERK2, LEC, GhWUS, and GhWOX11. The best regeneration media with morphological parameters and embryogenesis gene expression was obtained on M2 media.

Keywords: *gene expression, hormone, regeneration efficiency, somatic embryogenesis*

RINGKASAN

Karakterisasi Ekspresi Gen Embriogenesis selama Fase Regenerasi dengan Perlakuan Hormon Auksin dan Sitokinin pada Kultur Kapas (*Gossypium hirsutum* L.); Mitha Aprilia Mufadilah; 201510501126; 2023; 43 Halaman; Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Tingkat efisiensi media regenerasi yang tinggi dengan adanya penambahan hormon dapat dimanfaatkan dalam embriogenesis somatik. Embrio somatik yang berdiferensiasi pada regenerasi diregulasi oleh adanya ekspresi gen tertentu yang berkaitan dengan proses embriogenesis. Pada tanaman kapas di Indonesia, efisiensi media regenerasi yang ditandai dengan respon morfologi tanaman kapas dan ekspresi gen embriogenesis perlu dikaji. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh hormon 2,4-D dan IBA terhadap morfologi dan induksi kalus kapas serta untuk mengetahui pengaruh beberapa media regenerasi terhadap morfologi dan ekspresi gen embriogenesis tanaman kapas. Penelitian ini dilakukan dengan menginduksi kalus kapas pada media MS0, MS Basal + 0.1 mg/L 2,4-D dan MS Basal + 0.1 mg/L IBA. Hasil induksi kalus terbaik diregenerasikan pada media regenerasi M1 (MS Vitamin + 0,01 ppm 2,4-D + 0,3 ppm IBA + 0,5 ppm Kinetin), M2 (MS Vitamin + 0,01 ppm 2,4-D + 0,5 ppm IBA + 0,5 ppm Kinetin), M3 (MS Vitamin + 0,00 ppm 2,4-D + 0,3 ppm IBA + 0,5 ppm Kinetin), dan M4 (MS Vitamin + 0,00 ppm 2,4-D + 0,5 ppm IBA + 0,5 ppm Kinetin). Ekspresi gen embriogenesis diamati melalui metode isolasi RNA, sintesis cDNA, PCR, dan visualisasi. Variabel yang diamati antara lain persentase induksi kalus, diameter kalus, morfologi kalus, persentase regenerasi tanaman, serta visualisasi hasil ekspresi gen. Hasil morfologi pada induksi kalus terbaik didapatkan pada media MS Basal + 0.1 mg/L 2,4-D dengan karakter tekstur kalus yang kompak dan berwarna putih. Pada fase regenerasi, persentase tertinggi untuk parameter kalus beregenerasi tertinggi didapatkan pada media M2. Beberapa gen embriogenesis terekspresi seperti *GhSERK1*, *GhSERK2*, *LEC*, *GhWUS*, dan *GhWOX11*. Media regenerasi terbaik dengan parameter morfologi dan ekspresi gen embriogenesis didapatkan pada media M2.

SUMMARY

Characterization of Embryogenic Gene Expression during the Regeneration Phase with Auxin and Cytokinin Hormone Combination Treatment in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Culture; Mitha Aprilia Mufadilah; 201510501126; 2023; 43 Pages; Department of Agrotechnology Faculty of Agriculture University of Jember.

The high efficiency of regeneration media with the addition of hormones can be implemented in somatic embryogenesis. The differentiation of somatic embryos are regulated by the expression of certain genes related to embryogenesis process. In cotton plants in Indonesia, the efficiency of regeneration media which is characterized by the morphological response and the expression of cotton embryogenesis genes needs to be studied. The aims of this study were to determine the effect of 2,4-D and IBA hormones on the morphology and induction of cotton callus; to determine the effect of several regeneration media on the morphology and gene expression of cotton embryogenesis. This research was conducted by inducing cotton callus on MS0 medium, MS Basal + 0.1 mg/L 2,4-D and MS Basal + 0.1 mg/L IBA. The best callus induction results were regenerated on regeneration media M1 (MS Vitamin + 0.01 ppm 2,4-D + 0.3 ppm IBA + 0.5 ppm Kinetin), M2 (MS Vitamin + 0.01 ppm 2,4-D + 0.5 ppm IBA + 0.5 ppm Kinetin), M3 (MS Vitamin + 0.00 ppm 2,4-D + 0.3 ppm IBA + 0.5 ppm Kinetin), and M4 (MS Vitamin + 0, 00 ppm 2,4-D + 0.5 ppm IBA + 0.5 ppm Kinetin). Embryogenesis gene expression was observed through RNA isolation, cDNA synthesis, PCR, and visualization. Variables in this research such as the percentage of callus induction, callus diameter, callus morphology, percentage of plant regeneration, and visualization of gene expression results were observed. The best morphological results for callus induction were obtained on MS Basal + 0.1 mg/L 2,4-D medium with a compact and white callus texture character. In the regeneration phase, the highest percentage of regenerated callus parameters was found in M2 media. Several embryogenesis genes were expressed such as *GhSERK1*, *GhSERK2*, *LEC*, *GhWUS*, and *GhWOX11*. The best regeneration media with morphological parameters and embryogenesis gene expression was obtained on M2 media.

PRAKATA

Puji syukur atas rahmat Allah SWT sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Karakterisasi Ekspresi Gen Embriogenesis selama Fase Regenerasi dengan Perlakuan Hormon Auksin dan Sitokinin pada Kultur Kapas (*Gossypium hirsutum* L.)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Soetriono, M.P., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember;
2. Drs. Yagus Wijayanto, MA., Ph.D. selaku Koordinator Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember;
3. Mohammad Ubaidillah, S.Si., M.Agr., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Skripsi yang telah memberi bimbingan, saran, dan masukan untuk menyempurnakan penulisan skripsi ini;
4. Wahyu Indra Duwi Fanata, S.P., M.Sc., Ph.D., selaku Dosen Penguji 1 yang telah memberi evaluasi, bimbingan, saran, serta masukan dalam penyempurnaan penulisan skripsi ini;
5. Ummi Sholikhah, S.P., M.P., selaku Dosen Penguji 2 yang telah memberi evaluasi, bimbingan, saran, serta masukan dalam penyempurnaan penulisan skripsi ini;
6. Tri Wahyu Saputra, S.T.P, M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa membimbing dan memberikan dukungan selama proses perkuliahan dan penulisan tugas akhir sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini
7. Segenap dosen Fakultas Pertanian yang telah memberikan ilmu dan bimbingannya selama perkuliahan;

8. Kedua orang tua tercinta, atas segala kasih sayang, cinta, dukungan moril maupun materil serta doa yang selalu diberikan selama perkuliahan hingga terselesainya skripsi ini;
9. Kedua kakak saya, Arifin Ashari dan Intan Mar Atus Sholihah dan kembaran saya, Mira Aprilia Nur Fadilah yang selalu memberikan doa, inspirasi, dan selalu memotivasi saya untuk menyelesaikan skripsi dan segenap keluarga besar yang senantiasa memberikan doa dan dukungan;
10. Rekan penelitian Nurhaliza Thamrin, Isnina Tasya, Noor Rozzita, Rendryana Aulia Nur Khofifah, Fadia Intan, Dewi Kusuma, Aliyatun Niswah atas suka, duka, kerja keras, bantuan, motivasi, dan masukan ide-ide penulisan, serta kerja samanya dalam menyelesaikan skripsi ini;
11. Mba Nabila Nur Aisyah Al Ayyubi yang senantiasa memberikan bantuan, bimbingan, semangat dan motivasi selama penelitian hingga selesainya
12. Teman-teman alih jenjang yang selalu menemani, kebersamai, membantu, menghibur dalam setiap hal dan selalu bisa bersabar dalam menghadapi saya selama ini;
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu lainnya yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Demikian yang dapat penulis sampaikan, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 19 Juni 2023

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERSEMBAHAN	ii
MOTTO	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PERSETUJUAN	v
ABSTRACT	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	2
1.4 Manfaat.....	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Tanaman Kapas (<i>Gossypium hirsutum</i> L. Var. Kanesia 15).....	3
2.2 Kultur Jaringan Tanaman Kapas (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	4
2.3 Hormon Auksin (2,4-D dan IBA) dan Sitokinin (Kinetin).....	5
2.4 Regulasi Gen Embriogenesis dan Pengaruh Hormon	6
2.5 Hipotesis	8
BAB 3. METODE PENELITIAN	9
3.1 Waktu dan Tempat	9
3.2 Alat dan Bahan	9
3.2.1 Alat	9
3.2.2 Bahan.....	9
3.3 Rancangan Percobaan.....	10
3.4 Pelaksanaan Penelitian	11
3.4.1 Prosedur Pelaksanaan Penelitian	11
3.5 Variabel Pengamatan.....	15
3.6 Analisis Data	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Hasil	17
4.1.1 Induksi Kalus	17

4.1.2 Regenerasi Tanaman.....	18
4.1.3 Ekspresi Gen Embriogenesis Kapas pada Beberapa Media Regenerasi.....	22
4.2 Pembahasan.....	23
BAB 5. PENUTUP.....	27
DAFTAR PUSTAKA.....	28
LAMPIRAN.....	36



DAFTAR GAMBAR

Gambar 4. 1 Karakteristik kalus kapas hasil induksi 2 MST dan 4 MST	18
Gambar 4. 2 Diameter kalus pada fase regenerasi	19
Gambar 4. 3 Morfologi kalus pada fase regenerasi.....	20
Gambar 4. 4 Formasi globular (a) dan koleoptilar (b) tanaman kapas.....	21
Gambar 4. 5 Planlet kapas yang didapatkan selama 2 minggu pada media MS0.	21
Gambar 4. 6 Ekspresi gen embriogenesis pada tanaman kapas di berbagai media regenerasi.....	22



DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Primer sekuen untuk analisis gen.....	14
Tabel 4. 1 Persentase induksi, bobot dan ukuran kalus kapas	17
Tabel 4. 2 Morfologi kalus kapas hasil induksi	18
Tabel 4. 3 Persentase <i>green spot</i> , globular, koleoptilar, dan regenerasi tanaman. 20	



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Media regenerasi dalam kultur jaringan merupakan hal pokok yang perlu diperhatikan dalam implementasi perbanyakan secara *in vitro*. Keberhasilan kultur *in vitro* bergantung pada komposisi media regenerasi. Kebutuhan nutrisi setiap tanaman untuk tumbuh optimal sangat bervariasi dan disesuaikan dengan tujuan kultur (Sudheer *et al.*, 2022). Salah satu upaya untuk meningkatkan efisiensi media regenerasi dilakukan dengan penambahan hormon eksogen. Media regenerasi dengan tingkat efisiensi yang baik dapat dimanfaatkan untuk perbanyakan tanaman menggunakan sel-sel somatik (embriogenesis somatik) (Hesami *et al.*, 2020).

Embriogenesis somatik merupakan perbanyakan menggunakan sel-sel somatik tanaman pada media regenerasi tertentu secara *in vitro*. Embrio yang dihasilkan pada embriogenesis somatik berasal dari sel-sel somatik yang berdiferensiasi. Diferensiasi sel somatik diregulasi oleh adanya ekspresi gen tertentu. Beberapa gen yang biasanya terkespresi pada embriogenesis antara lain *WOX*, *WUS*, *SERK*, *baby boom* (BBM), *LEC* (Yang & Zhang, 2010). Penambahan hormon eksogen pada media regenerasi dapat menyebabkan adanya ekspresi gen pertumbuhan yang berbeda. Hal ini berkaitan dengan adanya tingkat transkripsi yang tinggi dari gen yang diekspresikan secara berbeda yang mendorong diferensiasi dan rediferensiasi sel (Xue *et al.*, 2022). Diferensiasi sel selalu disertai dengan adanya perubahan pola ekspresi gen yang terlibat, terutama pada saat induksi kalus dan embriogenesis somatik (Liu *et al.*, 2018). Informasi terkait beberapa gen embriogenesis yang terkespresi penting diketahui, terutama dalam upaya pengembangan tanaman potensial melalui pendekatan bioteknologi.

Salah satu tanaman potensial yang masih belum banyak dikaji di Indonesia terkait ekspresi gen embriogenesisnya adalah tanaman kapas. Pada penelitian sebelumnya, beberapa gen embriogenesis telah terkonfirmasi terekspresi pada beberapa kapas di Cina dan Brazil, seperti *GhSERK1* (Shi *et al.*, 2012; da Cunha Soares *et al.*, 2018), *GhSERK2* (Liu *et al.*, 2018), *GhWUS* (Xiao *et al.*, 2018). Wei *et al.* (2022) menyatakan bahwa pemberian auksin menghasilkan ekspresi berbeda

pada gen *GhWOX11* dan *GhWOX12* yang mengontrol formasi pertumbuhan kalus tanaman kapas. Beberapa gen embriogenesis kapas lainnya juga diketahui terekspresi melalui perbanyakan secara embriogenesis somatik pada media dengan hormon auksin dan sitokinin yang berupa kinetin (Wu *et al.*, 2009).

Gen-gen yang meregulasi embriogenesis tanaman kapas Indonesia belum banyak diketahui. Informasi mengenai regulasi gen embriogenesis pada tanaman kapas di Indonesia dapat menjadi sumber berharga terkait kemampuan regenerasi kapas dan pengembangan rekayasa genetik tanaman kapas di masa depan. Penelitian ini dilakukan guna mengkaji pengaruh media regenerasi terhadap ekspresi gen-gen embriogenesis pada tanaman kapas di Indonesia. Adapun tanaman kapas yang dikaji adalah *Gossypium hirsutum* L. Var. Kanesia 15.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Bagaimana pengaruh hormon 2,4-D dan IBA terhadap morfologi dan induksi kalus?
2. Bagaimana pengaruh perbedaan media regenerasi terhadap morfologi dan ekspresi gen embriogenesis pada tanaman kapas (*Gossypium hirsutum* L.)?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh hormon 2,4-D dan IBA pada induksi kalus kapas serta untuk mengetahui respon morfologi dan ekspresi gen embriogenesis tanaman kapas (*Gossypium hirsutum* L.) pada berbagai media regenerasi.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian bagi akademis adalah dapat memberikan informasi terkait ekspresi gen embriogenesis yang terekspresi pada tanaman kapas (*Gossypium hirsutum* L.) dalam upaya pengembangan tanaman kapas serta memberikan informasi terkait efisiensi media regenerasi terbaik dalam embriogenesis somatik tanaman kapas.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kapas (*Gossypium hirsutum* L. Var. Kanesia 15)

Tanaman kapas dikenal sebagai tanaman penghasil serat alami yang penting di dunia. (Salimath *et al.*, 2021; Aslam *et al.*, 2022). Lebih dari 80% pemanfaatan tanaman kapas adalah untuk diambil seratnya, sedangkan biji kapas digunakan untuk minyak dan pakan (Hernandez, 2016). Tanaman kapas (*Gossypium* spp.) merupakan spesies yang berasal dari genus *Gossypium*, suku *Gossypieae* yang biasanya tumbuh di daerah kering dan semi kering. Tanaman kapas termasuk dalam tanaman herbasius, semak, dan memiliki tinggi 3 sampai 40 kaki. Jenis komersial utama dari tanaman kapas antara lain *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum*, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, (Wendel *et al.*, 2010). Salah satu spesies kapas yang dibudidayakan di Indonesia adalah spesies *Gossypium hirsutum* L.

Gossypium hirsutum L. merupakan spesies kapas *allotetraploid* yang telah lama dibudidayakan di seluruh dunia untuk dimanfaatkan sebagai serat tekstil alami (Wang *et al.*, 2019). Adapun klasifikasi kapas (*Gossypium hirsutum* L) adalah sebagai berikut.

Kingdom : Plantae
Filum : Spermatophyta
Sub filum : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Malvales
Famili : Malvaceae
Genus : *Gossypium*
Spesies : *Gossypium hirsutum*
(Anonim a., 2019).

Salah satu varietas kapas yang ada di Indonesia adalah Varietas Kanesia 15. *Gossypium hirsutum* L. Var. Kanesia 15 merupakan varietas kapas yang toleran terhadap kekeringan, tahan terhadap wereng kapas (*Amrasca biguttula*), memiliki

kekuatan serat 32,16 g/tex dengan keseragaman serat 86,46%. Produktivitas kapas Varietas Kanesia 15 pada kondisi keterbatasan air adalah 962-2237 kg kapas berbiji/ha, sedangkan produktivitas pada pengairan optimal adalah 1617-3617 kg kapas berbiji/ha. Varietas Kanesia 15 sesuai untuk dibudidayakan di wilayah Jawa Timur, Sulawesi Selatan dan Nusa Tenggara Barat (Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat, 2014).

2.2 Kultur Jaringan Tanaman Kapas (*Gossypium hirsutum* L.)

Kultur jaringan tanaman merupakan suatu metode dalam memelihara sel, jaringan, maupun organ tanaman tertentu pada lingkungan yang buatan guna menghasilkan bahan tanam yang seragam dalam jumlah besar (Haque *et al.*, 2022). Kultur jaringan bertumpu pada konsep totipotensi sel, yaitu kemampuan sel dan jaringan tanaman untuk berkembang menjadi satu individu baru (Kolakar *et al.*, 2018). Prinsip utama perbanyakan secara *in vitro* adalah dengan menggunakan bagian tanaman yang ditanam pada jenis media tanam tertentu di lingkungan steril (Basri, 2016). Bagian tanaman yang dipilih dalam perbanyakan kapas melalui kultur jaringan adalah bagian tanaman yang sel-selnya masih aktif membelah. Gamborg *et al.* (1976) menyatakan bahwa faktor utama yang menentukan keberhasilan kultur jaringan adalah asal eksplan dan media kultur. Adapun faktor-faktor lain yang mendukung keberhasilan kultur *in vitro* antara lain genotipe tanaman, lingkungan tumbuh, dan kondisi eksplan yang diperbanyak.

Eksplan merupakan bahan untuk inisiasi dalam suatu kultur. Penanaman eksplan pada media tepat dapat beregenerasi melalui proses embriogenesis maupun organogenesis (Gunawan, 1988). Pada dasarnya semua bagian tanaman dapat digunakan sebagai eksplan dalam kultur *in vitro*, terutama jaringan muda yang mengandung sel-sel yang aktif membelah. Pada kultur *in vitro* tanaman kapas, bagian kotiledon, hipokotil, tunas apikal meristem biasanya digunakan sebagai eksplan untuk tujuan organogenesis langsung (Yasin dan Yasmin, 2019). Bagian kotiledon maupun hipokotil juga dapat digunakan sebagai eksplan dalam menginduksi kalus pada kultur *in vitro* kapas (Kumar dkk., 2015). Eksplan kapas

dapat diperoleh dari hasil perkecambahan benih kapas yang berumur 5-7 hari (Huihui *et al.*, 2019; Ke *et al.*, 2021).

Keberhasilan pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro* kapas sangat bergantung pada media kultur yang digunakan. Sumber nutrisi bagi tanaman harus tersedia pada media kultur yang digunakan. Di sisi lain, komposisi media bagi setiap jenis tanaman perlu disesuaikan. Umumnya, media kultur harus memiliki sumber karbohidrat, nutrisi makro, nutrisi mikro dan vitamin yang mampu mengoptimalkan pertumbuhan tanaman. Hal ini sesuai dengan pernyataan (Saad dan Elshahed., 2012) bahwa komponen utama dalam media kultur antara lain makronutrien, mikronutrien, vitamin, asam amino, nitrogen, karbon, bahan organik dan bahan pemat. Pada implementasi regenerasi kapas melalui kultur jaringan, hormon pertumbuhan memegang peran penting dalam tahap induksi dan perkembangan tanaman. Pada kajian embriogenesis somatik kapas teridentifikasi adanya aktivitas auksin dan sitokinin endogen yang mendasari diferensiasi dan rediferensiasi sel (Duarte-Aké dan De-la-Peña, 2016). Penambahan *plant growth regulator* (PGR) seperti jenis auksin dan sitokinin pada media kultur jaringan mampu memicu pertumbuhan eksplan sesuai tujuan kultur yang diinginkan. Lestari (2011) menyatakan jenis auksin antara lain IAA, NAA, IBA, 2,4-D, PIC. Adapun jenis sitokinin yang biasa digunakan pada media kultur antara lain Kinetin, BAP (*6-benzylaminopurine*), TDZ (*Thidiazuron*) (Restanto dkk., 2018), dan sebagainya.

2.3 Hormon Auksin (2,4-D dan IBA) dan Sitokinin (Kinetin)

Zat pengatur tumbuh dalam perbanyakan tanaman merupakan suatu hormon yang dapat memacu perkembangan dan pertumbuhan tanaman. Zhao *et al.* (2021) menyatakan bahwa hormon auksin dan sitokinin yang seimbang mampu mengontrol organogenesis pada kultur *in vitro*. Pertimbangan penggunaan jenis dan konsentrasi auksin maupun sitokinin diperlukan untuk menyesuaikan tujuan kultur dan fungsi hormon dalam meregulasi pertumbuhan tanaman pada perbanyakan *in vitro*.

Aplikasi hormon auksin pada media regenerasi memicu pembentukan kalus dan menekan morfogenesis tanaman (Rasud dan Bustaman, 2020). Beberapa

macam hormon auksin yang biasa digunakan dalam kultur jaringan antara lain adalah IAA, NAA, IBA, dan 2,4-D. Umumnya IAA, NAA, dan IBA digunakan pada multiplikasi tunas dan akar, sedangkan 2,4-D digunakan untuk menstimulasi pembentukan kalus dan proliferasi sel (Phillips & Garda, 2019). 2,4-D (2,4-*dichlorophenoxyacetic acid*) merupakan jenis hormon auksin sintetis. Aplikasi 2,4-D pada kultur jaringan digunakan pada konsentrasi yang umumnya lebih rendah daripada IAA, NAA, dan IBA. Penggunaan 2,4-D pada dosis rendah mampu memacu pertumbuhan tanaman, namun dalam dosis tinggi dapat mempengaruhi sintesis protein dan mengubah plastisitas dinding sel (Tiwari *et al.*, 2019).

Jenis hormon auksin lain yang biasa digunakan dalam kultur *in vitro* adalah IBA (*Indole-3-butyric-acid*). IBA (*Indole-3-butyric-acid*) merupakan asam butanoat yang memiliki peran sebagai hormon tanaman, metabolit tanaman dan auksin. IBA dapat ditemukan pada *Pisum sativum*, *Tropaeolum majus*, *Zea mays*, dan *Nicotiana tabacum* (NCBI, 2022). Hormon IBA (*Indole-3 butyric acid*) pada konsentrasi yang berbeda mampu menstimulasi pertumbuhan akar maupun tunas. Šípošová *et al.* (2019) menyatakan bahwa pada konsentrasi yang lebih rendah, IBA mampu menstimulasi pertumbuhan akar, sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi dapat memicu pertumbuhan tunas.

Selain auksin, sitokinin merupakan salah satu hormon tanaman yang penting dalam mendorong pembelahan sel (Wang *et al.*, 2021). Jenis zat pengatur tumbuh sitokinin antara lain BA, Zeatin, Kinetin dan sebagainya. Peran zat pengatur tumbuh sitokinin dalam kultur *in vitro* erat kaitannya dengan inisiasi tunas. Yuniati dkk. (2018) menyatakan inisiasi tunas dalam kultur jaringan tanaman dipengaruhi oleh konsentrasi optimum sitokinin pada media kultur.

2.4 Regulasi Gen Embriogenesis dan Pengaruh Hormon

Embriogenesis somatik merupakan proses pembentukan embrio yang berasal dari sel-sel somatik. Wang *et al.* (2022) menyatakan embriogenesis somatik merupakan salah satu klasifikasi embriogenesis non-zigotik atau perkembangan embrio tanpa adanya fertilisasi. Terdapat beberapa jalur dalam menginisiasi embriogenesis somatik. Fehér, *et al.* (2016) menyatakan bahwa pada beberapa

percobaan, pembentukan embrio somatik tidak terjadi secara langsung melalui sel-sel somatik, melainkan melalui intervensi fase kalus. Kalus merupakan massa yang tidak teroganisir dari sel-sel yang terdiferensiasi. Tahap diferensiasi sel tidak lepas dari regulasi gen terkait. Cetz-Chel dan Loyola-Vargas (2016) menyatakan bahwa faktor transkripsi pada embriogenesis somatik tidak langsung diinduksi oleh overekspresi gen *BABY BOOM (BBM)*, *WUSCHEL (WUS)* pada sel-sel vegetatif. (Gulzar *et al.*, 2020) juga menyatakan bahwa beberapa gen telah diketahui berhubungan secara langsung dengan embriogenesis somatik, seperti *Somatic Embryogenesis Like Receptor Kinase (SERK)*, *Leafy Cotyledon (LEC)*, *BABY BOOM (BBM)*.

Gen *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase (SERK)* merupakan reseptor transmembran yang terlibat dalam memicu embriogenesis dan telah terdeteksi terekspresi pada embrio somatik yang berkembang. *Leafy Cotyledon (LEC)* adalah gen yang memiliki kelebihan komplementer dan parsial dalam menginduksi embriogenesis somatik. *LEC1* meregulasi perkembangan embrio, sedangkan *LEC2* menginisiasi proliferasi, produksi kalus, pembentukan struktur kotiledon pada embriogenesis somatik. *Baby Boom (BBM)* merupakan faktor transkripsi yang terlibat dalam proliferasi sel dan morfogenesis selama pembentukan embrio (embriogenesis). *WUSCHELL (WUS)* mengkode faktor transkripsi yang secara langsung meregulasi gen-gen lain. Fungsi *WUSCHELL (WUS)* adalah untuk mempertahankan keadaan sel yang tidak berdiferensiasi. Sedangkan gen *WOX* mampu menstimulasi pembentukan embrio pada kondisi ada maupun tidak adanya auksin (Duarte-Aké dan De-la-Peña, 2016).

Aktivasi gen-gen embriogenesis diregulasi oleh keberadaan hormon dalam tanaman. Level auksin endogen maupun eksogen mampu mempengaruhi perkembangan sel-sel somatik yang disebabkan oleh aktivasi gen embriogenesis (da Cunha Soares *et al.*, 2018). Pada tanaman, area yang terakumulasi auksin pada zona periferal mampu membentuk primordia tanaman (Pandey dan Chaudary, 2014). Pengaruh hormon selain auksin terhadap regulasi gen embriogenesis ditemukan pula pada jenis sitokinin. Sitokinin merupakan jenis hormon tanaman yang mampu meregulasi pembentukan perakaran lateral dan pertumbuhan tanaman

(Chang *et al.*, 2015). Sitokinin juga bertindak dalam mengatur kapasitas sintesis protein dan status pertumbuhan sel. Ghorbel dan Brini (2021) menyatakan bahwa sitokinin telah dikaji berperan sebagai inisiator pertumbuhan kalus, perkembangan klorofil dan perkembangan xylem. Salah satu jenis sitokinin, yaitu kinetin yang diberikan secara eksogen mempengaruhi transkripsi rRNA pada *Arabidopsis thaliana* (Barciszewski *et al.*, 2007).

2.5 Hipotesis

1. Pemberian hormon auksin berupa 2,4-D dan IBA pada media induksi kalus berpengaruh pada pertumbuhan kalus kapas (*Gossypium hirsutum* L.) secara *in vitro*.
2. Pemberian kombinasi hormon auksin dan sitokinin pada media regenerasi berpengaruh terhadap morfologi dan ekspresi gen embriogenesis dalam regenerasi sel kalus kapas (*Gossypium hirsutum* L.).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian Karakterisasi Ekspresi Gen Embriogenesis selama Fase Regenerasi dengan Perlakuan Kombinasi Hormon Auksin dan Sitokinin pada Kultur Kapas (*Gossypium hirsutum* L.) dilakukan di Laboratorium Agrobioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember. Penelitian ini dilakukan pada bulan November sampai selesai.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain *laminar air flow cabinet*, autoklaf, *glass ware* (gelas ukur, erlenmeyer, petridish, *beaker glass*, *test tube*), scalpel, pinset, gunting, pipet tetes, mikropipet, pH meter, *vortex mixer*, *centrifuge*, mesin PCR, elektroforesis, *UV-transiluminator*, *power supply*, lemari pendingin, *milipore*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah benih kapas lokal (*Gossypium hisutum* L. Var. Kanesia 15), media MS Vitamin (NH₄NO₃ 1650 mg/l, H₃BO₃ 6,2 mg/l, CaCl₂, CoCl₃.6H₂O 0,025 mg/l, CuSO₄.5H₂O 0,025 mg/l, Na₂EDTH.2H₂O 37,26 mg/l, FeSO₄.7H₂O 27,8 mg/l, MgSO₄ 180,7 mg/l, MnSO₄.H₂O 16,9 mg/l, MoO₃.H₂O 0,25 mg/l, KI 0,83 mg/l. KNO₃ 1900 mg/l, ZnSO₄ 8,6 mg/l, KH₂PO₃ 170 mg/l. myo-Inositol 100 mg/l, glycine 2 mg/l, Nicotinic acid 0,5 mg/l, Pyridoxine.HCl 0,5 mg/l, Thiamine.HCl 0,1 mg.l), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), IBA, kinetin, gelrite, sukrosa, alcohol 70%, alcohol 96%, aquades, HCl 0,2 M, NaOH 0,1 M, alcohol 96%, alcohol 70%. Bahan yang diperlukan dalam ekstraksi DNA antara lain tanaman kapas (*Gossypium hirsutum* L.) hasil regenerasi mikrotube, nitrogen cair, buffer RPL, buffer RBW, buffer RNW, primer, *Nuclease-free water*, *green master mix 2X*, *4x DN Master mix*, *DNase 1.5x RT Master mix II*, dan *greenstar*.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal. Faktor percobaan yang digunakan pada fase induksi kalus adalah hormon auksin dengan 3 taraf perlakuan dan diulang sebanyak 6 kali. Adapun taraf perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut.

- K1 = Media MS0
 K2 = Media MS Vitamin + 0,1 ppm 2,4-D
 K3 = Media MS Vitamin + 0,1 ppm IBA

Denah pengacakan rancangan pada fase induksi kalus adalah sebagai berikut.

K1U6	K3U1	K1U2
K3U4	K2U2	K2U1
K2U5	K2U4	K3U5
K3U6	K1U5	K3U2
K1U3	K1U4	K1U1
K2U6	K2U3	K3U3

Faktor percobaan yang digunakan adalah faktor kombinasi hormon pertumbuhan berupa auksin dan sitokinin. Adapun penelitian ini terdapat 4 taraf perlakuan hormon dan diulang sebanyak 6 ulangan, antara lain sebagai berikut.

- M1 = MS Vitamin + 0,01 ppm 2,4-D + 0,3 ppm IBA + 0,5 ppm Kinetin
 M2 = MS Vitamin + 0,01 ppm 2,4-D + 0,5 ppm IBA + 0,5 ppm Kinetin
 M3 = MS Vitamin + 0,00 ppm 2,4-D + 0,3 ppm IBA + 0,5 ppm Kinetin
 M4 = MS Vitamin + 0,00 ppm 2,4-D + 0,5 ppm IBA + 0,5 ppm Kinetin

Adapun denah pengacakan rancangan adalah sebagai berikut.

M3U1	M3U3	M3U2	M4U4
M1U1	M1U3	M1U4	M2U3
M2U1	M1U5	M3U5	M1U2
M4U2	M3U4	M4U5	M2U4
M2U2	M2U5	M4U3	M4U1

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ekspresi gen-gen embriogenesis pada kultur jaringan tanaman kapas (*Gossypium hirsutum* L. Var. Kanesia 15) dengan berbagai media regenerasi. Penelitian ini dilakukan melalui beberapa prosedur pelaksanaan antara lain sebagai berikut.

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Gelas ukur, erlenmeyer, *petridish*, *beaker glass*, *test tube*, *scalpel*, pinset, gunting dicuci dan dibungkus dengan aluminium foil. Alat disterilisasi pada autoklaf selama kurang lebih 30 menit pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi. Alat yang telah disterilisasi disimpan pada oven.

2. Pembuatan Media

Media kultur *in vitro* yang diperlukan dalam penelitian ini adalah media perkecambahan, media induksi kalus dan media regenerasi. Pembuatan media perkecambahan dilakukan dengan menimbang 4,3 g/L media MS, 6 g/L gelrite, dan 30 g/L sukrosa. Pembuatan media induksi kalus dilakukan dengan menimbang 4,3 g/L media MS vitamin, 6 g/L gelrite, dan 30 g/L sukrosa, 2,4-D 0,1 mg/L dan IBA 0,1 mg/L. Pembuatan media regenerasi dilakukan dengan menimbang 4,3 g/L media MS vitamin, 6 g/L gelrite, dan 30 g/L sukrosa, 2,4-D 0,01 mg/L, IBA 0,3 mg/L dan 0,5 mg/L, dan Kinetin 0,5 mg/L.

Bahan yang telah ditimbang kemudian dilarutkan menjadi 1000 ml larutan media dan diaduk hingga homogen. pH larutan diukur hingga mencapai nilai 5,8 (penambahan 0,1 M NaOH dilakukan apabila pH < 5,8 dan penambahan 0,2 M HCl dilakukan apabila pH larutan di atas 5,8). Larutan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan aluminium foil kemudian diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 30 menit. Media yang telah diautoklaf dituang pada *test tube* (media perkecambahan) dan *petridish* (media induksi kalus dan regenerasi) di dalam *laminar air flow* (LAF).

3. Sterilisasi *Laminar Air Flow* (LAF)

Laminar Air Flow (LAF) disterilkan dengan alkohol 70% pada bagian lantai dan dinding laminar. Lampu UV diaktifkan selama 30 menit untuk memastikan

tidak ada mikroorganisme yang berpotensi mengontaminasi eksplan selama proses penanaman dilakukan.

4. Penanaman Benih Kapas pada Media Perkecambahan

Eksplan benih kapas (*Gossypium hirsutum* L. Var. Kanesia 15) disterilisasi pada larutan kloroks 10% selama 8 menit dan dibilas menggunakan aquades steril sebanyak 3 kali. Benih kapas yang telah steril ditanam pada media MS.

5. Induksi Kalus

Benih kapas yang telah berkecambah pada umur 7 sampai 14 HST diambil bagian meristemiknya untuk dikaluskan. Proses induksi kalus dilakukan dengan cara *thin layer culture*, yaitu dengan memotong bagian tunas muda (bagian meristem) sepanjang ± 1 mm dan ditanam pada 3 media induksi kalus yang berbeda. Kalus diinduksi selama 4 minggu pada media induksi dan morfologi kalus diamati pada minggu kedua dan keempat.

6. Regenerasi Kalus Tanaman Kapas

Hasil induksi kalus terbaik diregenerasikan pada media regenerasi dengan kombinasi hormon auksin dan sitokinin yang berbeda. Kalus disubkultur setiap dua minggu. Kalus diregenerasikan selama 10 minggu untuk mendapatkan hasil regenerasi tanaman kapas. Hasil regenerasi kalus kapas pada umur 10 MST dipindahkan ke media MS0 untuk mengetahui jumlah planlet yang didapatkan.

7. Ekspresi Gen Embriogenesis Tanaman Kapas (*Gossypium hirsutum* L.)

Ekspresi gen yang akan diamati adalah gen *GhSERK1*, *GhSERK2*, *GhWOX11*, *GhWUSS*, *LEC (Leafy Cotyledon)*, dan *BBM (Baby Boom)*. Pengambilan sampel dilakukan pada minggu kedua dan keempat setelah penanaman pada media regenerasi. Tahapan dalam ekspresi gen yaitu isolasi RNA, sintesis cDNA dan PCR.

a) Isolasi RNA

Kalus embriogenik tanaman kapas sebanyak 100 mg diambil dan digerus dengan menambahkan nitrogen cair sampai halus. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml dan ditambahkan 350 μ l buffer RPL. Larutan buffer dan hasil gerusan kalus dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi selama 3 menit. Sampel dipindahkan ke dalam filter EzPure™

yang berada dalam tube koleksi dan disentrifuge selama 30 detik dengan kecepatan 12000 rpm. Supernatan yang tersaring dipindahkan ke *microcentrifuge tube* 1.5 ml yang baru.

Pada tahap pengikatan RNA, sampel ditambahkan dengan 300 µl ethanol 70% untuk memurnikan sampel kemudian dilakukan *swirling*. Sampel dipindahkan ke dalam kolom RNeasy yang berada dalam tube koleksi (Rb Geneid) dengan segera. Sampel disentrifuge selama 30 detik dengan kecepatan 12000 rpm. Larutan yang tersaring dibuang dan kolom RNeasy diletakkan kembali ke *tube* koleksi.

RNA yang didapatkan dicuci dengan menambahkan 500 µl buffer RBW pada bagian tengah kolom RNeasy dan disentrifuge selama 30 detik dengan kecepatan 12000 rpm. Larutan yang tersaring dibuang dan kolom RNeasy diletakkan kembali ke tube koleksi. 70 µl DNase ditambahkan pada bagian tengah kolom RNeasy dan diinkubasi selama 10 menit. Kemudian 500 µl buffer RBW ditambahkan pada 70 µl DNase lalu inkubasi selama 2 menit dan disentrifuge kembali selama 30 detik dengan kecepatan 12000 rpm. Larutan yang tersaring dibuang dan diletakkan kembali kolom RNeasy ke tube koleksi.

Selanjutnya 500 µl buffer RNW ditambahkan pada bagian tengah kolom RNeasy ke *tube* koleksi dan disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 12000 rpm, lalu larutan yang tersaring dibuang dan kolom RNeasy diletakkan kembali ke tube koleksi. Tahapan ini diulang sebanyak dua kali. Sampel RNA selanjutnya dielusi dan kolom RNeasy diletakkan pada *tube* 1,5 ml yang baru. 50 µl Nuclease-free Water (H₂O steril) ditambahkan pada bagian tengah matrik kolom RNeasy dan disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 12000 rpm untuk mengelusi RNA purifikasi. RNA yang didapat selanjutnya dihitung konsentrasinya dengan menggunakan nanodrop, kemurnian RNA dapat dilihat dari nilai perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

b) Sintesis cDNA

Transkripsi balik dilakukan untuk mengubah sampel RNA menjadi bentuk cDNA. Larutan RNA diinkubasi pada suhu 65°C dengan durasi 5 menit

kemudian disimpan dalam es. Larutan reaksi Dnase I disiapkan dengan total volume 8 µl yaitu 4x DN Master Mix 2 µl, RNA template 0,5 µg – 0,5 µg, dan Nuclease-free Water X µl. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 5 menit. Larutan *reverse transcription* disiapkan dengan total volume 10 µl yaitu larutan reaksi DNase I 8 µl dan 5x RT Master Mix II 2 µl. Siklus dalam PCR dilakukan sebanyak 2 siklus. Siklus pertama, sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit dan pada suhu 50°C selama 5 menit. Siklus kedua, sampel dipanaskan pada suhu 98°C selama 5 menit.

c) PCR

PCR dilakukan dengan volume reaksi 10 µl yang terdiri dari komponen-komponen yaitu: Green Master Mix, 2X 5 µl, 1 µl (10 µM) dari setiap primer *Forward* (F) dan *Reverse* (R) (Tabel 3.1), 1 µl cDNA template, dan 2 µl Nuclease-Free Water. Pemrograman PCR adalah satu siklus awal 95°C selama 2 menit dan 30 siklus: 95°C selama 30 detik untuk denaturasi, 50°C selama 30 detik untuk annealing, 72°C selama 1 menit untuk *extension*, dan satu siklus akhir 72°C selama 5 menit. Produk PCR yang diamplifikasi menjadi sasaran elektroforesis dalam agarose gel 2% yang diwarnai dengan *Greenstar* kemudian divisualisasi dengan *UV transilluminator*.

Tabel 3. 1 Primer sekuen untuk analisis gen

Gen	Primer	Sumber
<i>GhSERK1</i>	F 5' GCATGATCATTGTAACCCCAAG 3' R 5' GGTATTCAGGGGCTATATGACC 3'	(da Cunha Soares, 2018)
<i>GhSERK2</i>	F 5' CGGTTATGGTGTATGCTTCT 3' R 5'GCTCCAATTCTTCGTCTATGT 3'	(Liu <i>et al.</i> , 2018)
<i>GhWOX11</i>	F 5' AAAACCGGCGTTCTAGGTCTCG 3' R 5' GTATACTGCTTGGGCTTGGGGG 3'	(Wei <i>et al.</i> , 2022)
<i>GhWUS</i>	F 5' CTGATATTCTCCCCATGCAAACA 3' R 5' CGAGCAATCCCTAAACTCTTCT 3'	(Xiao <i>et al.</i> , 2018)
<i>LEC</i>	F 5' CGT CGG TGG GAT GCT CAA GTC 3' R 5' GGT GCT CGA AGT TGA CGG TCT 3'	(Haryadi <i>et al.</i> , 2023)
<i>BBM</i>	F 5' CGA TTT ACC GTG GCG TGA CA 3' R 5'CGT GAA GAG CAT CCT GGA CA 3'	(Adnan <i>et al.</i> , 2022)
<i>Actin</i>	F 5' TCC ATC TTG GCA TCT CTC AG 3' R 5' GTA CCC GCA TCA GGC ATC TG 3'	(Haryadi <i>et al.</i> , 2023)

3.5 Variabel Pengamatan

1. Induksi Kalus

a. Persentase Induksi Kalus

Persentase induksi kalus didapatkan dengan menghitung jumlah eksplan yang membentuk kalus. Perhitungan persentase induksi kalus dilakukan pada eksplan yang berumur 2 minggu pada media induksi dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Persentase induksi kalus} = \frac{\text{Jumlah total kalus}}{\text{Jumlah eksplan}} \times 100\%$$

b. Diameter Kalus

Diameter kalus diamati pada kalus yang berumur 2 minggu dan 4 minggu menggunakan pengukur diameter. Diameter kalus terbaik digunakan sebagai bahan tanam regenerasi.

c. Morfologi Kalus

Pengamatan morfologi kalus dilakukan menggunakan mikroskop dan data mengenai bentuk kalus, warna kalus, struktur dan bentuk kalus diambil pada minggu kedua dan keempat pada media kultur.

2. Regenerasi Tanaman

a. *Green Spot*

Pengamatan dilakukan untuk mengetahui terjadinya pembentukan *green spot* pada kalus pada minggu kedua. Persentase *green spot* pada kalus dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase green spot} = \frac{\text{Jumlah green spot pada kalus}}{\text{Jumlah eksplan}} \times 100\%$$

b. Persentase Jumlah Kalus pada Fase Embriogenesis Somatik

Banyaknya kalus yang membentuk fase globular dan koleoptilar pada minggu kedua dan keempat tahap regenerasi tanaman diamati. Persentase akhir jumlah kalus pada fase embriogenesis somatik dihitung pada minggu keempat fase regenerasi.

c. Persentase Regenerasi Tanaman

Pengamatan persentase regenerasi tanaman berdasarkan Mostafiz dan Wagiran (2018) dilakukan dengan rumus:

$$\text{Persentase regenerasi} = \frac{\text{Jumlah kalus yang beregenerasi}}{\text{Jumlah kalus yang diinduksi}} \times 100\%$$

d. Visualisasi Hasil Elektroforesis DNA

Pengamatan visualisasi hasil elektroforesis DNA dilakukan dengan mengamati tebal tipisnya ukuran pita DNA yang didapatkan.

3.6 Analisis Data

Data pengamatan yang didapatkan pada tahap induksi kalus diolah menggunakan analisis keragaman (ANOVA). Data yang berbeda nyata dilakukan uji lanjut menggunakan Tukey untuk mengetahui faktor perlakuan yang paling baik dalam pembentukan kalus. Pada tahap regenerasi tanaman, data hasil pengamatan dianalisis menggunakan analisis keragaman (ANOVA). Data yang berbeda nyata dilakukan uji lanjut DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*). Ekspresi gen embriogenesis dianalisis secara deskriptif dengan penyajian data secara visual.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

Pada penelitian ini, didapatkan data morfologi kalus selama induksi, karakterisasi embriogenesis pada kultur kapas selama fase regenerasi, serta ekspresi gen embriogenesis.

4.1.1 Induksi Kalus

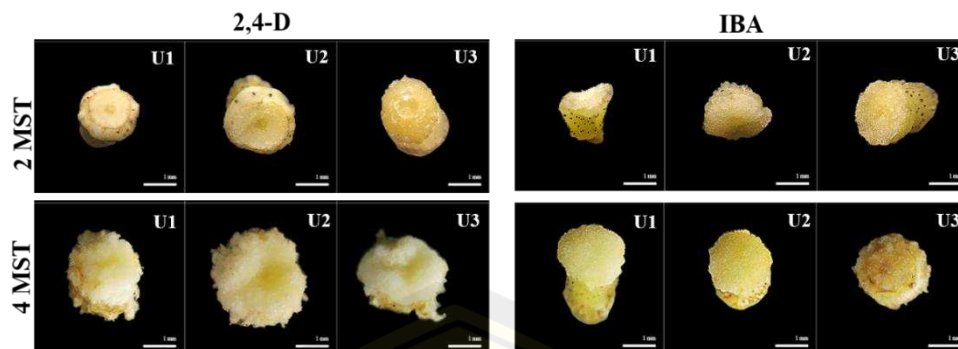
Hasil induksi kalus kapas pada tiga jenis media induksi yang berbeda dikategorikan ke dalam hasil ukuran kalus dan morfologi kalus. Induksi kalus kapas menunjukkan perbedaan yang signifikan pada ukuran kalus. Penggunaan media MS basal dengan hormon auksin yang berbeda, yaitu IBA dan 2,4-D mampu menginduksi kalus kapas yang berasal dari eksplan hipokotil dengan rata-rata ukuran kalus terbaik diperoleh pada media MS Basal + 0.1 mg/L 2,4-D (Tabel 4.1).

Tabel 4. 1 Persentase induksi, bobot dan ukuran kalus kapas

Perlakuan Media	Persentase Induksi Kalus (%)	Bobot Kalus (mg)	Diameter kalus (mm)	
			2 MST	4 MST
MS0	0	-	-	-
MS Basal + 0,1 mg/L IBA	100	4,8 ± 1,31	1,26 ± 0,11 ^a	1,66 ± 0,17 ^a
MS Basal + 0,1 mg/L 2,4-D	100	5,9 ± 3,68	1,31 ± 0,12 ^b	2,03 ± 0,07 ^b

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji Tukey 5%; MST: minggu setelah tanam

Secara visual, pada umur 2 MST induksi kalus melalui eksplan hipokotil belum menunjukkan adanya pembentukan kalus yang jelas. Pada umur 4 MST, karakter morfologi kalus yang didapatkan pada tahap induksi kalus dihasilkan pada media dengan hormon 2,4-D memiliki warna kalus putih sedangkan kalus dari media induksi dengan hormon IBA berwarna putih kekuningan (Gambar 4.1).



Keterangan: MST: minggu setelah tanam; U1: Ulangan 1; U2: Ulangan 2; U3: Ulangan 3
Gambar 4. 1 Karakteristik kalus kapas hasil induksi 2 MST dan 4 MST (*scale bars* = 1 mm).

Berdasarkan gambar di atas dapat diketahui adanya perbedaan karakter morfologi kalus baik secara ukuran, warna, maupun tekstur kalus. Kalus yang diinduksi pada media 2,4-D memiliki kemampuan regenerasi yang tinggi dibandingkan dengan kalus yang diinduksi pada media IBA (Tabel 4.2).

Tabel 4. 2 Morfologi kalus kapas hasil induksi

Perlakuan Media	Tekstur Kalus	Warna Kalus	Kategori Kalus	Kemampuan Embriogenesis / Regenerasi
MS0	-	-	-	
MS Basal + 0,1 mg/L 2,4-D	<i>Compact</i>	<i>White</i>	K2	HER
MS Basal + 0,1 mg/L IBA	<i>Friable</i>	<i>White-yellowish</i>	K3	HENR

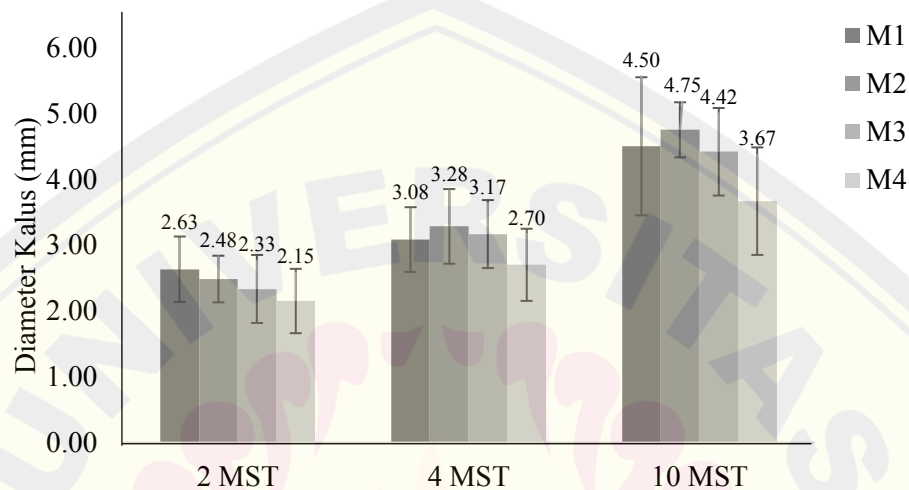
Keterangan: HER (*High Embryogenic and Regeneration Ability*); HENR (*High Embryogenic but No Regeneration Ability*); K2: *compact white callus*; K3: *friable callus* (Downey *et al.*, 2019)

Induksi kalus embriogenik pada kultur kapas diperlukan sebagai dasar pemilihan media induksi terbaik sebelum kalus diregenerasikan. Kalus embriogenik terbaik yang didapatkan, yaitu kalus pada media MS + 0.1 mg/L 2,4-D dipilih untuk diregenerasikan pada media regenerasi dengan kombinasi hormon auksin dan sitokinin yang berbeda.

4.1.2 Regenerasi Tanaman

Regenerasi tanaman kapas dilakukan selama 12 minggu pada 4 media regenerasi dengan kombinasi hormon auksin dan sitokinin yang berbeda. Selama fase regenerasi, ukuran kalus (Gambar 4.2) diamati pada minggu kedua, keempat,

dan kesepuluh untuk mengetahui pertumbuhan kalus selama berada di media regenerasi. Ukuran kalus terbaik didapatkan pada media regenerasi M2 yaitu media MS Vitamin + 0,01 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L IBA + 0,5 mg/L Kinetin.



Keterangan: M1: media regenerasi 1; M2: media regenerasi 2; M3: media regenerasi 3; M4: media regenerasi 4; MST: minggu setelah tanam

Gambar 4. 2 Diameter kalus pada fase regenerasi

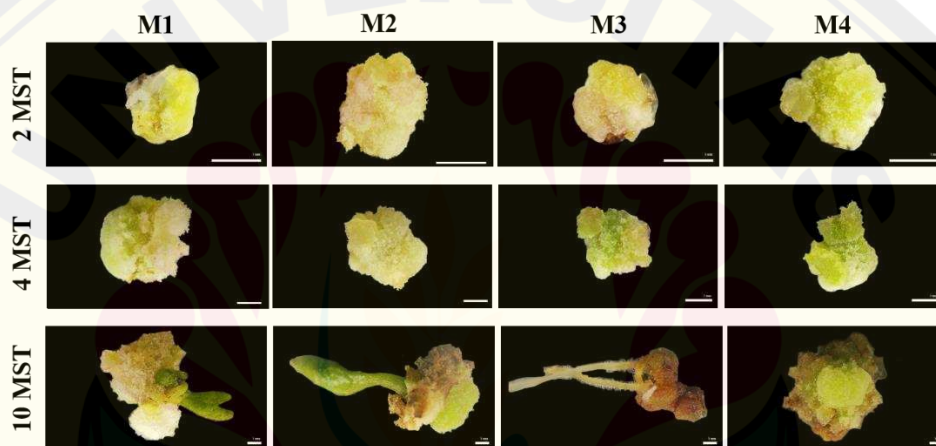
Adapun persentase regenerasi kapas dikategorikan dalam beberapa parameter regenerasi (Tabel 4.3). Rata-rata persentase koleoptilar terbaik didapatkan pada media M1, namun berbeda tidak nyata dengan media M2. Persentasi regenerasi kalus pada media M1 dan M2 menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan persentase terbaik didapatkan pada media regenerasi M2. Kalus yang diregenerasikan pada media M3 dan M4 tidak menunjukkan adanya respon pada regenerasi tanaman.

Tabel 4. 3 Persentase *green spot*, globular, koleoptilar, dan regenerasi tanaman

Perlakuan Media	<i>Green spot</i> (%)	Globular (%)	Koleoptilar (%)	Kalus yang Beregenerasi (%)
M1	100 ± 0,00	100 ± 0,00	25,00 ± 9,13 ^c	33,33 ± 10,53 ^c
M2	100 ± 0,00	100 ± 0,00	16,67 ± 10,54 ^{bc}	50,00 ± 14,91 ^d
M3	100 ± 0,00	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^{ab}
M4	100 ± 0,00	100 ± 0,00	16,67 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^a

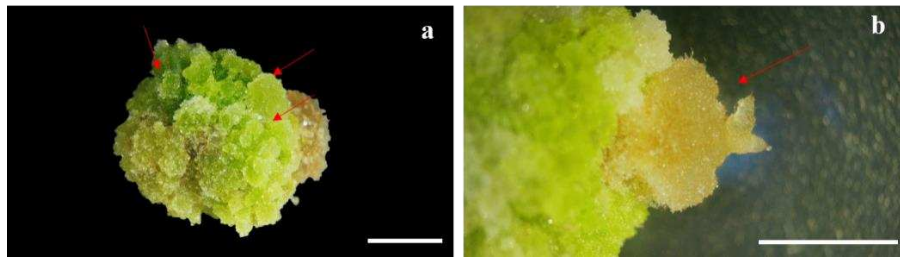
Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata pada uji DMRT 5%; M1: media regenerasi 1; M2: media regenerasi 2; M3: media regenerasi 3; M4: media regenerasi 4

Respon morfologi regenerasi kapas pada 4 media yang berbeda menunjukkan hasil yang beragam (Gambar 4.3).

Gambar 4. 3 Morfologi kalus pada fase regenerasi (*scale bars* = 1 mm)

Keterangan: M1: media regenerasi 1; M2: media regenerasi 2; M3: media regenerasi 3; M4: media regenerasi 4; MST: minggu setelah tanam

Pada minggu kedua, kalus yang diregenerasikan pada semua media regenerasi telah menunjukkan adanya *green spot* dan telah memasuki fase globular sebagai salah satu ciri dari terjadinya proses regenerasi (Gambar 4.4a). Jumlah kalus yang memasuki fase koleoptilar dihitung pada minggu keempat, namun pada umur 2 MST, telah terdapat kalus yang mulai memasuki fase koleoptilar, yaitu kalus pada media regenerasi M2 (Gambar 4.3b).



Keterangan: tanda panah merah menunjukkan fase globular (a) dan fase koleoptilar (b)
Gambar 4. 4 Formasi globular (a) dan koleoptilar (b) tanaman kapas (*scale bars* = 1 mm).

Regenerasi kalus yang diamati selama 10 minggu pada media yang berbeda menunjukkan bahwa kalus dengan kombinasi media 2,4-D, IBA dan Kinetin (M1 dan M2) menghasilkan kalus yang mampu menghasilkan tunas pada minggu ke 10. Hal tersebut menunjukkan karakteristik morfogenesis ke arah pembentukan planlet (Gambar 4.5). Jumlah tunas terbanyak didapatkan pada media regenerasi M2 dengan persentase 50%. Sedangkan regenerasi kalus pada media tanpa hormon 2,4-D (M3 dan M4) menghasilkan “*rooty callus*” dan secara berwarna kecoklatan yang mengindikasikan kalus mengalami *browning*.



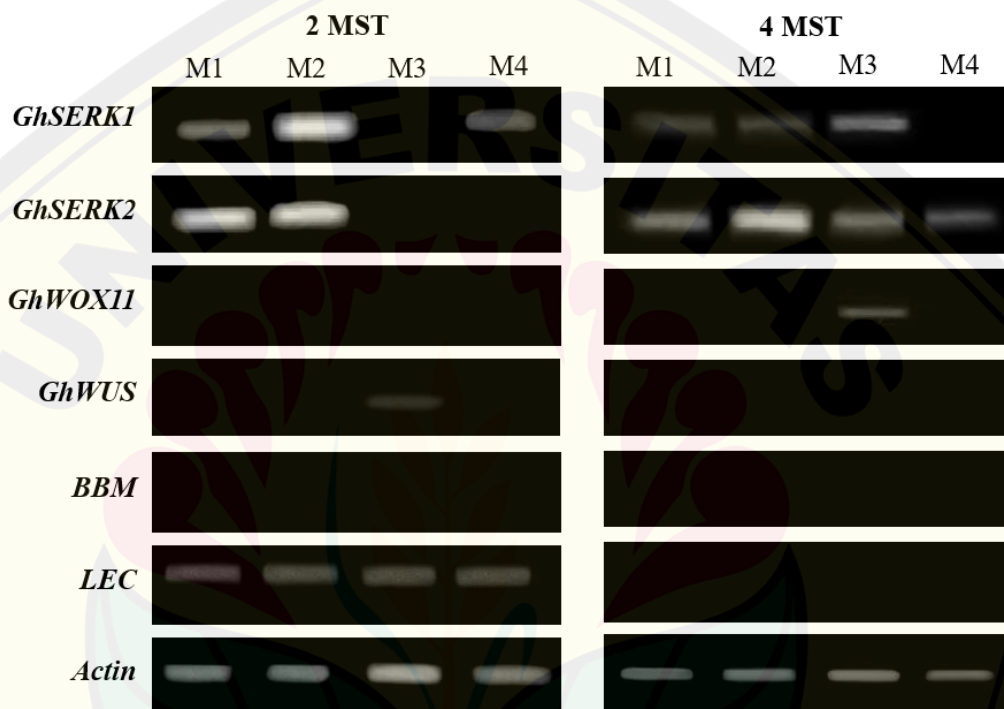
Keterangan: M1: media regenerasi 1; M2: media regenerasi 2; M3: media regenerasi 3; M4: media regenerasi 4

Gambar 4. 5 Planlet kapas yang didapatkan selama 2 minggu pada media MS0 (*scale bars* = 1 mm).

Kalus hasil regenerasi yang berusia 10 minggu dipindahkan pada media MS0. Regenerasi kalus pada media M1 dan M2 menghasilkan planlet kapas setelah disubkultur pada media MS0 selama 2 minggu. Jumlah planlet kapas terbaik didapatkan pada kapas yang diregenerasikan di media M2 dengan persentase 50%. Kalus yang diregenerasikan pada media M3 dan M4 tidak menunjukkan adanya arah perkembangan menjadi planlet dan kalus mengalami *browning*.

4.1.3 Ekspresi Gen Embriogenesis Kapas pada Beberapa Media Regenerasi

Ekspresi gen *GhSERK1*, *GhSERK2*, *GhWOX11*, *GhWUSS*, *BBM* dan *LEC* digunakan sebagai parameter penelitian untuk mengetahui adanya respon aktivitas gen embriogenesis tanaman kapas pada media regenerasi yang berbeda. Berdasarkan hasil visualisasi menggunakan elektroforesis (Gambar 4.6), beberapa gen embriogenesis terkekspresi pada berbagai perlakuan media regenerasi yang digunakan baik pada umur 2 MST maupun 4 MST.



(M1: media regenerasi 1; M2: media regenerasi 2; M3: media regenerasi 3; M4: media regenerasi 4; MST: minggu setelah tanam)

Gambar 4. 6 Ekspresi gen embriogenesis pada tanaman kapas di berbagai media regenerasi.

Di antara gen yang diamati, gen *BBM* tidak terkekspresi pada semua perlakuan baik di umur 2 MST maupun 4 MST. Selain itu, gen *GhWOX11* dan *GhWUSS* hanya terekspresi pada media regenerasi M3. Adapun ekspresi gen embriogenesis terbanyak dengan tingkat ekspresi yang tinggi didapatkan pada perlakuan media regenerasi M1 dan M2. Tingkat ekspresi gen *GhSERK1* dan *GhSERK2* pada media regenerasi M2 menunjukkan tingkat ekspresi yang lebih tinggi dibandingkan dengan media M1.

4.2 Pembahasan

Induksi kalus dilakukan sebagai salah satu cara dalam mendapatkan dediferensiasi sel yang berpotensi menjadi suatu embrio. Pembentukan kalus sangat bergantung pada ketersediaan dan jumlah auksin eksogen pada media. Pada penelitian ini, pemberian auksin jenis 2,4-D pada konsentrasi yang sama dengan IBA memberikan hasil induksi dan morfologi kalus yang terbaik. Keberhasilan induksi kalus pada media 2,4-D juga terkonfirmasi pada tanaman anggrek lilin (*Aerides odorata* Lour.) (Khalida dkk., 2019), *Barringtonia racemosa* (Dalila *et al.*, 2013). Pemberian auksin eksogen pada tanaman kapas menunjukkan kemampuan induksi kalus yang tinggi pada 2,4-D dan menengah pada hormon IBA (Hui-hui *et al.*, 2019). Hormon IBA dalam hal ini tidak lebih baik dibandingkan 2,4-D dalam menginduksi kalus tanaman kapas. Penggunaan IBA dalam pembentukan kalus pada dediferensiasi sel juga belum banyak diaplikasikan dan pada penelitian lain seringkali digunakan untuk organogenesis pembentukan akar (Babashpour-Asl, 2012; Fattorini *et al.*, 2017; Justamante *et al.*, 2022).

Keberadaan auksin pada jaringan tanaman mempengaruhi adanya perbedaan formasi dan morfologi kalus (Bano *et al.*, 2022). Berdasarkan karakter morfologinya, terdapat dua tipe karakter kalus yang didapatkan pada penggunaan hormon 2,4-D dan IBA pada induksi kalus. Kategori kalus K2 didapatkan pada media 2,4-D dan kategori kalus K3 didapatkan pada media IBA. Induksi kalus dalam media dengan 2,4-D menunjukkan karakteristik kalus yang embriogenik dan memiliki kemampuan regenerasi yang tinggi menurut Downey *et al.* (2019).

Morfologi kalus yang diamati secara visual melalui warna kalus dapat menunjukkan aktivitas pembelahan sel yang terjadi pada kalus. Kalus yang berwarna putih, putih-kekuningan maupun kuning mengindikasikan bahwa pembelahan sel masih terjadi, sedangkan kalus yang berwarna kecoklatan menandakan bahwa sel-sel kalus mengalami penuaan (Astutik dkk., 2021). Kalus yang dihasilkan pada media 2,4-D ditandai dengan bentuk yang kompak dan berwarna putih mengindikasikan aktifnya jaringan meristematik (Klimek-Chodacka *et al.*, 2020). Pada penelitian ini, hormon 2,4-D mampu menginduksi

tanaman kapas dengan hasil terbaik, namun penggunaan konsentrasi 2,4-D perlu dikonfirmasi lebih lanjut pada penelitian selanjutnya.

Tahapan regenerasi dalam perbanyakan secara embriogenesis somatik ditandai dengan beberapa fase perkembangan tanaman. Regenerasi kalus embriogenik pada empat kombinasi media yang berbeda menghasilkan data yang tidak signifikan pada semua parameter yang diamati. Pada penelitian ini, *greenspot* teramati pada umur 2 MST di semua media regenerasi (Tabel 4.3). Adanya *green spot* mengindikasikan bahwa kalus yang diregenerasikan bersifat embriogenik (Noor et al., 2022). Selain *greenspot*, fase globular (Gambar 4.4a) teramati pada semua media regenerasi dan fase koleoptilar teramati pada media M2 di umur 2 MST (Gambar 4.4b). Jenis hormon sangat mempengaruhi arah regenerasi tanaman kapas yang diperbanyak secara *in vitro*.

Peran auksin dan sitokinin pada tahap regenerasi kalus kapas menentukan arah regenerasi kapas. Auksin dan sitokinin memiliki peran antagonis pada fase diferensiasi tanaman, namun keduanya saling memiliki ketergantungan satu sama lain (Chandler & Werr, 2015). Pada penelitian ini, kombinasi media 2,4-D, IBA, dan kinetin pada konsentrasi yang berbeda (M1 dan M2) menghasilkan hasil regenerasi kapas hingga menjadi planlet. Kombinasi 2,4-D, IBA, dan Kinetin pada media regenerasi dengan konsentrasi kinetin 0.1 ppm juga terkonfirmasi menghasilkan embrio somatik terbaik pada *Gossypium arboreum* (Ke et al., 2021). Pada penelitian ini, kombinasi media IBA dan Kinetin tidak dapat menghasilkan regenerasi kapas ke arah yang diinginkan.

Pada tingkat molekular, regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik tidak terlepas dari regulasi gen-gen embriogenesis terkait sebagai salah satu parameter regenerasi. Gen *GhSERK1* terekspresi pada umur 2 dan 4 MST di media regenerasi M1 dan M2 dan hanya terekspresi pada M4 di minggu kedua dan M3 di minggu keempat. Dalam penelitian ini, ekspresi *GhSERK1* pada media regenerasi M1 dan M2 berbanding lurus dengan hasil regenerasi yang diinginkan. Regulasi positif *GhSERK1* pada tanaman kapas terjadi pada kalus yang bersifat embriogenik (da Cunha Soares, 2018). Regulasi positif *SERK* pada kalus yang embriogenik juga

terkonfirmasi pada *Araucaria angustifolia*, *Trifolium nigrescens* dan *Cattleya maxima* (Steiner *et al.*, 2012; Pilarska *et al.*, 2016; Cueva-Agila *et al.*, 2020).

Selain *GhSERK1*, *GhSERK2* termasuk ke dalam keluarga SERK yang berfungsi dan berasosiasi dengan embriogenesis somatik maupun zigotik. Pada regenerasi kapas yang dilakukan, *GhSERK2* hanya terekspresi pada media regenerasi M1 dan M2 umur 2 MST. Namun, pada umur 4 MST *GhSERK2* terekspresi pada semua media regenerasi dengan tingkat ekspresi yang berbeda. Perbedaan kandungan hormon auksin pada tingkat kinetin yang sama di media regenerasi mempengaruhi waktu terekspresinya gen *GhSERK2*. Dalam penelitian ini, level ekspresi gen *SERK* yang tinggi terjadi pada fase globular. Ekspresi *GhSERK2* yang tinggi juga teridentifikasi pada fase globular pada spesies *Brassica napus*, *Cocos nucifera*, *Momordica charantia* (Ahmadi, *et al.*, 2016; Rajesh *et al.*, 2016; Talapatra *et al.*, 2014). Ekspresi gen *SERK* diregulasi secara positif (*up-regulated*) oleh adanya auksin dan sitokinin pada tanaman (Porras-Murillo *et al.*, 2018). Tingkat ekspresi *GhSERK2* yang tinggi dipicu oleh hormon 2,4-D pada fase awal embriogenesis somatik pada tanaman kapas (Liu, *et al.*, 2018).

BBM (THE BABY BOOM) termasuk dalam faktor transkripsi yang memiliki peran esensial dalam proses embriogenesis dan proliferasi. Ekspresi *BBM* tidak terkonfirmasi baik pada regenerasi 2 MST maupun 4 MST pada penelitian ini. Tidak terekspresinya gen ini menunjukkan bahwa tidak adanya aktivitas gen *BBM* pada fase yang diamati. Pada penelitian lain, ekspresi gen *BBM* pada *Arabidopsis thaliana* (Lutz *et al.*, 2015), *Glycine max* L. (Ouakfaoui *et al.*, 2010), *Theobroma cacao* (Florez *et al.*, 2015) mengaktifkan jalur sinyal transduksi yang mengarah pada pembentukan embrio somatik (Ja & Kumar, 2018). Pada *Arabidopsis thaliana*, *BBM* menjadi faktor transkripsi atas ekspresi gen *LEC* dalam proses embriogenesis somatik (Horstman *et al.*, 2017). Sebagai faktor transkripsi, ekspresi gen *BBM* pada fase tertentu dalam embriogenesis somatik tanaman kapas perlu dikonfirmasi lebih lanjut.

Gen lain yang memiliki fungsi dalam embriogenesis somatik adalah *LEC*. Ekspresi *LEC* diidentifikasi pada 2 MST regenerasi menunjukkan bahwa terdapat aktivitas *LEC* yang berkaitan dengan proses embriogenesis somatik pada tanaman

kapas di awal fase regenerasi. Ekspresi *LEC* pada *Arabidopsis thaliana* (Horstman *et al.*, 2017) merupakan faktor transkripsi yang menginduksi pembentukan embrio somatik pada fase *seedling*. Pada spesies *Gossypium hirsutum* dan *Gossypium barbadense*, *LEC* terekspresi pada fase zigotik hingga fase globular, sedangkan pada tahap perkembangan tanaman ekspresinya akan terbatas (Wang *et al.*, 2022).

Pada penelitian ini ekspresi *GhWOX11* dan *GhWUSS* hanya terkonfirmasi pada media M3. Secara morfologi, kalus yang diregenerasikan pada media M3 tidak menunjukkan arah regenerasi yang diinginkan. Ekspresi *GhWOX11* yang terkonfirmasi pada *Gossypium hirsutum* L. dipengaruhi oleh keberadaan auksin berupa 2,4-D dan menunjukkan tingkat ekspresi yang tinggi pada hipokotil (Wei *et al.*, 2022). Selain, *GhWOX11*, ekspresi *WUS* pada media regenerasi M3 tidak menunjukkan hasil regenerasi ke arah yang diinginkan. Pada penelitian Xiao *et al.* (2018), ekspresi *GhWUSS* teridentifikasi pada meristem tunas dan bunga pada spesies *Gossypium hirsutum* L.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan

1. Media induksi kalus terbaik didapatkan pada media MS Basal + 0,1 mg/L 2,4-D dengan hasil morfologi kalus kapas yang kompak, berwarna putih dan memiliki tingkat embriogenesis dan regenerasi yang tinggi.
2. Kombinasi media regenerasi mempengaruhi karakteristik morfologi dan ekspresi gen embriogenesis tanaman kapas pada kultur *in vitro*. Gen embriogenesis yang terlibat dalam embriogenesis somatik terkespresi pada media maupun waktu yang berbeda. Secara keseluruhan gen embriogenesis yang terekspresi adalah *GhSERK1*, *GhSERK2*, *GhWUS*, *GhWOX11* dan *OsLEC*. Media regenerasi M2 (media regenerasi dengan kombinasi hormon 2,4-D 0,01 mg/L, IBA 0,5 mg/L, dan Kinetin 0,5 mg/L) menghasilkan jumlah tanaman beregenerasi dan jumlah ekspresi gen terbaik dengan tingkat ekspresi yang paling tinggi. Adapun gen yang terekspresi pada media M2 adalah *GhSERK1*, *GhSERK2*, dan *OsLEC*.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan, apabila dilakukan penelitian serupa, penggunaan media MS0 sebagai kontrol pada induksi kalus tidak perlu dilakukan. Penelitian lebih lanjut dengan menambahkan variabel penelitian lain untuk mendukung data penelitian yang telah dilakukan seperti daya induksi kalus dan keragaman somaklonal diperlukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, M. R., D. M. A. I. Buqori, K. M. Kim, M. N. Khuluq, & M. Ubaidillah. 2022. Response of morphogenesis and cell proliferation to allelopathic compounds on rice germplasm. *The Eurasia Proceedings of Health, Environment and Life Sciences*, 8 (14-27).
- Ahmadi B, F. Masoomi-Aladizgeh, & M. E. Shariatpanahi. (2016). Molecular characterization and expression analysis of *SERK1* and *SERK2* in *Brassica napus* L.: implication for microspore embryogenesis and plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 35: 185–193.
- Anonim a. (2019). *Gossypium hirsutum* (Bourbon Cotton). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/25797#top-page>. [Diakses pada 7 Oktober 2022].
- Aslam, M. Q., R. Z. Naqvi, S. S. A. Zaidi, M. Asif, K. P. Akhter, B. E. Scheffler, J. A. Scheffler, S. S. Liu, I. Amin, & S. Mansoor. (2022). Analysis of a tetraploid cotton line Mac7 transcriptome reveals mechanisms underlying resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Gene*, 820.
- Astutik, M., B. Suhartanto, N. Umami, N. Suseno, M.S. Haq. (2021). Auxin and cytokinin effect on in vitro callus induction of maize (*Zea mays* L.) *Srikandi Putih*. *Advances in Biological Sciences Research*, 21 (1-5).
- Babashpour-Asl, M. (2012). Effect of indole-3-butyric acid on rooting ability of semi-hardwood *Bougainvillea* sp. Cuttings. *Modern Applied Science*, 6(5): 121-123).
- Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat [BALITTAS]. (2014). Kanesia 15. <http://siserat.balittas.or.id/index.php/varietas/spesifikasiVarietas/kanesia+15> [Diakses pada 5 Oktober 2022].
- Bano, A. S., A.M. Khattak, A. Basit, S.T. Shah, N. Ahmad, S.A.Q. Gilani, I. Ullah, S. Anwar, H.I. Mohamed. (2022). Callus induction, proliferation, enhanced secondary metabolites production and antioxidants activity of *Salvia moorcroftiana* L. as influenced by combinations of auxin, cytokinin and melatonin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65 (1-6).
- Barciszewski, J. & F. Massino, B. F. C. Clark. (2007). Kinetin-A multiactive molecule. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40 (2007): 182-192.
- Basri, A. H. H. (2016). Kajian pemanfaatan kultur jaringan dalam perbanyakan tanaman bebas virus. *Agrica Ekstensi*, 10(1): 64-73.

- Bhatia, S. (2015). *Chapter 5 - Application of Plant Biotechnology*. In S. Bhatia, K. Sharma, R. Dahiya, dan T. Bera (Eds.), *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*. Academic Press.
- Cetz-Chel, J. E. & V. M. Loyola-Vargas. (2016). *Chapter 4 Transcriptome Profile of Somatic Embryogenesis*. In V. M. Loyola-Vargas dan N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Somatic embryogenesis fundamental aspects and applications*. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland.
- Chandler, J. W. & W. Werr. (2015). Cytokinin-auxin crosstalk in cell type specification. *Trends in Plant Science*, 1-10.
- Chang, L., E. Ramireddy, & T. Schmulling. (2015). Cytokinin as a positional cue regulating lateral root spacing in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 66(15): 4759-4768.
- Cueva-Agila, A. Y., N. Alberca-Jaramillo, R. Cella, & L., Concia. (2020). Isolation, phylogenetic analysis and expression of a Somatic Embryogenesis Receptor like Kinase (SERK) gene in *Cattleya maxima* Lindl. *Current Plant Biology*, 21.
- da Cunha Soares, T., C. R. C. da Silva, C. Carvalho, J. M. F., J. J. V Cavalcanti, L. M. de Lima, M. F., P. de Albuquerque Melo Filho, L. S. Severino, & R. C. dos Santos. (2018). Validating a probe from GhSERK1 gene for selection of cotton genotypes with somatic embryogenic capacity. *Journal of Biotechnology*, 270: 44-50.
- Dalila, Z. D., H. Jafar, A. A. Manaf. (2013). Effects of 2,4-D and kinetin on callus induction of *Barringtonia racemosa* leaf and endosperm explants in different types of basal media. *Asian Journal of Plant Science*, 12 (1): 21-27.
- Din, A. R. J. M., F. I. Ahmad, A. Wagiran, A. A. Samad, Z. Rahmat, M. R. Sarmidi. (2015). Improvement of efficient in vitro regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (*Oryza sativa* cv. Panderas). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(S69-S77).
- Duarte-Aké, F. & C. De-la-Peña. (2016). *Chapter 6 Epigenetic Advances in Somatic Embryogenesis in Sequenced Genome Crops*. In V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Somatic embryogenesis fundamental aspects and applications*. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland.
- Fattorini, L., A. Velocchia, F. D. Rovere, S. D'Angeli, G. Falasca, & M. M. Altamura. (2017). Indole-3-butyric acid promotes adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana* thin cell layers by conversion into indole-3-acetic acid and stimulation of anthranilate synthase activity. *BMC Plant Biology*, 2017:17-21.

- Fehér, A., D. Bernula, & K. Gémes. (2016). *Chapter 3 The Many Ways of Somatic Embryo Initiation*. In V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Somatic embryogenesis fundamental aspects and applications*. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland.
- Florez S.L., R. L. Erwin, S. N. Maximova, M. J. Guiltinan, W. R. Curtis. (2015). Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous *BABY BOOM* transcription factor. *BMC Plant Biol*, 15:121
- Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., & Vasil, I. K. 1976. Plant tissue culture media. *In Vitro*, 12(7): 473–478.
- García-González, R., K. Quiroz, B. Carrasco, & P. Caligari. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Cien. Inv. Agr*, 37(3).
- Gulzar, B., A. Mujib, M. Q. Malik, R. Sayeed, J. Mamgain, & B. Ejaz. (2020). Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1).
- Gunawan, L. W. (1988). *Teknik kultur jaringan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Haque, M. I., P. K. Singh, S. Ghuge, A. Kumar, R. Chandra Rai, A. Kumar, & A. Modi. (2022). *Chapter 1 - A General Introduction to and Background of Plant Tissue Culture: Past, Current, And Future Aspects*. In A. Chandra Rai, A. Kumar, A. Modi, & M. Singh (Eds.), *Advances in Plant Tissue Culture*. Academic Press.
- Haryadi, NT., N. A. Sasmita, M. A. Mufadilah, N. Thamrin, N.N.A.A. Ayyubi, N. Dewi, M. Ubaidillah. 2023. The effect of melatonin on the efficiency of regeneration and gene expression during the morphogenesis in rice. *International Journal of Agriculture & Biology*, 29(3): 193-200.
- Hernandez, E. (2016). *Cottonseed*. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00025-1>
- Hesami, M., R. Naderi & M. Tohidfar. (2020). Introducing a hybrid artificial intelligence method for high-throughput modeling and optimizing plant tissue culture processes: the establishment of a new embryogenesis medium for chrysanthemum, as a case study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104:10249-10263.
- Hoque, K. M. A., Azdi, Z. A., & Phordan, S. H. (2013). Development of callus initiation and regeneration system of different indigenous indica rice varieties. *J. Biol*, 1: 46-51.
- Horstman, A., M. Li, I. Heidmann, M. Weemen, B. Chen, J. M. Muino, G. C. Angenent, & K. Boutilier. (2017). The *BABY BOOM* transcription factor

activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 175: 848-857.

Hui-hui, G., W. Jian-fei, C. Cui-xia, W. Hong-mei, Z. Yun-lei, Z. Chao-jun, J. Yin-hua, L. Fang, N. Tang-yuan, C. Zhao-hui, & Z. Fang-chang. (2019). Identification and characterization of cell cultures with various embryogenic/regenerative potential in cotton based on morphological, cytochemical, and cytogenetical assessment. *Journal of Integrative Agriculture*, 18 (1): 1-8.

Jha, P. & V. Kumar. 2018. *BABY BOOM (BBM)*: a candidate transcription factor gene in plant biotechnology. *Biotechnol Lett*, 1-9.

Justamante, M. S., M. Mhimdi, M. Molina-Pérez, A. Albacete, M. A. Moreno, I. Mataix, J. M. Pérez-Pérez. 2022. Effect of auxin (indole-3-butyric acid) on adventitious root formation in peach-based *Prunus* rootstocks. *Plants*, 9(913): 1-18.

Ke, L., Q. Jiang, R. Wang, D. Yu, & Y. Sun. (2021). Plant regeneration via somatic embryogenesis in diploid cultivated cotton (*Gossypium arboreum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 148: 177-188.

Khalida, A., Suwirman, Z. A. Noli. (2019). Induksi kalus anggrek lilin (*Aerides odorata* Lour.) dengan pemberian beberapa konsentrasi 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D). *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 7(2): 109-117.

Klimek-Chodacka, M., D. Kadluczka, A. Lukasiewicz, A. Malec-Pala, R. Baranski, E. Grzebelus. (2020). Effective callus induction and plant regeneration in callus and protoplast cultures of *Nigelle damascena* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143:693-707.

Kolakar, S. S., Bc, C., Hc, N., Kumari, L. D., & Ms, H. (2018). National conference on “Conservation, Cultivation and Utilization of medicinal and Aromatic plants” Role of plant tissue culture in micropropagation, secondary metabolites production and conservation of some endangered medicinal crops. ~ 246 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3, 246–251.

Kumar, G. P., S. Subiramani, S. Govindarajan, V. Sadisivam, V. Manickam, K. Mogilicherla, S. K. Thuryppathu, & J. Narayanasamy. (2015). Evaluation of different carbon sources for high frequency callus culture with reduced phenolic secretion in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv. SVPR-2. *Biotechnology Reports*, 7(2015): 72-80.

Lestari, E. G. (2011). Peranan Zat Pengatur Tumbuh dalam Perbanyak Tanaman secara Kultur Jaringan. *Jurnal Agrobiogen*, 7(1): 63-68.

- Lindsay, D. L., V. K., Sawhney, P. C. Bonham-Smith. 2006. Cytokinin-induced changes in CLAVATA1 and WUSCHEL expression temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 170(2006): 1111-1117.
- Liu, Zheng-jie, Z. Yan-peng, Z. Ling-he, Z. Yuan., W. Yu-mei, & H. Jin-ping. (2018). Characterization of GhSERK2 and its expression associated with somatic embryogenesis and hormones level in Upland cotton. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(3): 517–529.
- Lutz K.A., C. Martin, S. Khairzada, P. Maliga. (2015). Steroid-inducible BABY BOOM system for development of fertile *Arabidopsis thaliana* plants after prolonged tissue culture. *Plant Cell Rep*, 34:1849–1856.
- Mostafiz, S. B., & A. Wagiran. (2018). Efficient callus induction and regeneration in selected *Indica* rice. *Agronomy*, 8(77): 1-18.
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 8617, Indole-3-butyric acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indole-3-butyric-acid>. [diakses pada 9 November 2022]
- Noor, W., R. Lone, A.N. Kamili, A. M. Husaini. (2022). Callus induction and regeneration in high-altitude Himalayan rice genotype SR4 via seed explant. *Biotechnology Reports*, 36: 1-8.
- Ouakfaoui S.E., J. Schnell, A. Abdeen, A. Colville, H. Labbe, S. Han, B. Baum, S. Laberge, & B. Miki. (2010). Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Mol Biol*, 74:313–326.
- Pandey, D. K. & B. Chaudhary. (2014). Role of plant somatic embryogenesis receptor kinases (SERKs) in cell-to-embryo transitional activity: key at novel assorted structural subunits. *American Journal of Plant Sciences*, I: 3177-3193.
- Phillips, G. C., dan M. Garda. (2019). *Plant Tissue Culture Media and Practices: An Overview*. Dalam *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* (Vol. 55, Issue 3, pp. 242–257). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Porrás-Murillo, R., A. Andrade-Torres, & L.Y. Solís-Ramos. (2018). Expression analysis of two somatic embryogenesis receptor like kinase (SERK) genes during in vitro morphogenesis in Spanish cedar (*Cedrela odorata* L.). *Biotech*, 8(11): 1-9.
- Rajesh, M. K., T. P. Fayas, S. Naganeeswaran, K. E. Rachana, U. Bhavyashree, K. K. Sajini, A. Karun. (2016). De novo assembly and characterization of global

transcriptome of coconut palm (*Cocos nucifera* L.) embryogenic calli using Illumina paired-end sequencing. *Protoplasma*, 253: 913–928.

Rasud, Y., & Bustaman, B. (2020). In Vitro Callus Induction from Clove (*Syzigium aromaticum* L.) Leaves on Medium Containing Various Auxin Concentrations. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25(1), 67–72. <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>

Restanto, D.P P., B. Kriswanto, M. N. Khozim, & S. Soeparjono. (2018). Kajian thidiazuron (TDZ) dalam induksi PLB anggrek *Phalaenopsis* sp. secara in vitro. *Agritop*, 16 (1): 176-185.

Saad, I. M. & A. M. Elshahed. (2012). Plant Tissue Culture Media. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. InTech. <https://doi.org/10.5772/50569>

Salimath, S. S., Romsdahl, T. B., Konda, A. R., Zhang, W., Cahoon, E. B., Dowd, M. K., Wedegaertner, T. C., Hake, K. D., & Chapman, K. D. (2021). Production of tocotrienols in seeds of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) enhances oxidative stability and offers nutraceutical potential. *Plant Biotechnology Journal*, 19(6), 1268–1282. <https://doi.org/10.1111/pbi.13557>

Shi, Y.-L., Rui, Z., Wu, X.-P., Meng, Z.-G., & San-Dui, G. (2012). Cloning and Characterization of a Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase Gene in Cotton (*Gossypium hirsutum*). In *Journal of Integrative Agriculture* (Vol. 2012, Issue 6).

Šípošová, K., K. Kollárová, D. Lišková, & V. Zuzana. (2019). The effects of IBA on the composition of maize root cell walls. *Journal of Plant Physiology*, 239 (2019): 10-17.

Sudheer, W. N., Praveen, N., Al-Khayri, J. M., & Jain, S. M. (2022). *Chapter 3 - Role of Plant Tissue Culture Medium Components*. In *Advances in Plant Tissue Culture*. Editor A. Chandra Rai, A. Kumar, A. Modi, & M. Singh (Eds.) Academic Press.

Talapatra S, N. Ghoshal & S. S. Raychaudhuri. (2014). Molecular characterization, modeling and expression analysis of a somatic embryogenesis receptor kinase (SERK) gene in *Momordica charantia* L. during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 116: 271–283.

Tiwari, B., S. Kharwar, & D. N. Tiwari. (2019). *Pesticides and Rice Agricultrure*. Dalam Cyanobacteria. Editor A. K. Mishra, D. N. Tiwari, & A. N. Rai. Academic Press.

Wang, F. X., Shang, G. D., & Wang, J. W. (2022). Towards a hierarchical gene regulatory network underlying somatic embryogenesis. *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.06.002>

- Wang, M., Tu, L., Yuan, D., Zhu, D., Shen, C., Li, J., Liu, F., Pei, L., Wang, P., Zhao, G., Ye, Z., Huang, H., Yan, F., Ma, Y., Zhang, L., Liu, M., You, J., Yang, Y., Liu, & Z. Zhang, X. (2019). Reference genome sequences of two cultivated allotetraploid cottons, *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*. *Nature Genetics* 51(2): 224-229.
- Wang, R., L. Liu, Z. Kong, S. Li, L. Lu, N. Kabir, G. Chen, J. Zhang, G. Qanmber, & Z. Liu. 2021. Identification of GhLOG gene family revealed that GhLOG3 is involved in regulating salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 166(2021): 328-340.
- Wei, X., Geng, M., Li, J., Duan, H., Li, F., & Ge, X. (2022). GhWOX11 and GhWOX12 promote cell fate specification during embryogenesis. *Industrial Crops and Products*, 184.
- Wendel, J. F., C. L. Brubaker, & T. Seelanan. (2010). *Chapter 1 The Origin and Evolution of Gossypium*. In J. M. Stewart, D. M. Oosterhuis, J. J. Heitholt, J. R. Mauney (Eds.), *Physiology of cotton*. Heidelberg: Springer Science+Business Media.
- Wu, X., F. Li, C. Zhang, C. Liu, & X. Zhang. (2009). Differential gene expression of cotton cultivar CCR124 during somatic embryogenesis. *Journal of Plant Physiology*, 166 (2009): 1275-1283.
- Xiao, Y., Chen, Y., Ding, Y., Wu, J., Wang, P., Yu, Y., Wei, X., Wang, Y., Zhang, C., Li, F., & Ge, X. (2018). Effects of GhWUS from upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) on somatic embryogenesis and shoot regeneration. *Plant Science*, 270, 157–165.
- Xue, W., Liu, N., Zhang, T., Li, J., Chen, P., Yang, Y., & Chen, S. (2022). Substance metabolism, IAA and CTK signaling pathways regulating the origin of embryogenic callus during dedifferentiation and redifferentiation of cucumber cotyledon nodes. *Scientia Horticulturae*, 293, 110680.
- Yang, X. & X. Zhang. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29:1, 36-57, DOI: 10.1080/07352680903436291
- Yasin, S. & Yasmin, A. (2019). Standarization of genotype independent combination of growth regulators for axenic shoot tip culture of cotton. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 19(2019): 1-8.
- Yuniati, F., S. Haryanti, & E. Prihastanti. (2018). Pengaruh Hormon dan Ukuran Eksplan terhadap Pertumbuhan Mata Tunas Tanaman Pisang (*Musa paradisiaca* var. Raja Bulu) secara In Vitro. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 3(1): 20-28.

Zhao, X., J. Song, Q. Zeng, Y. Ma, H. Fang, L. Yang, B. Deng, J. Liu, J. Fang, L. Zuo, J. Yue. (2021). Auxin and cytokinin mediated regulation involved in vitro organogenesis of papaya. *Journal of Plant Physiology*, 260(2021): 1-13.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Pelaksanaan Penelitian



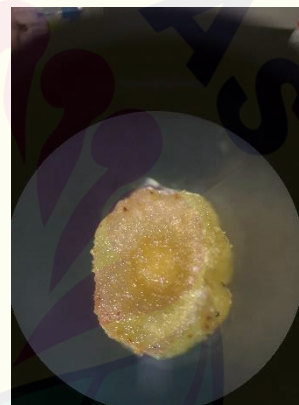
1. Penimbangan bahan media kultur *in vitro*



2. Sterilisasi alat dan media kultur



3. Penanaman eksplan pada media induksi kalus



4. Pengamatan kalus



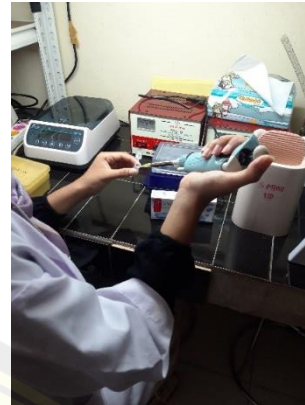
5. Pemandahan kalus pada media regenerasi



6. Pengamatan Kalus pada media regenerasi



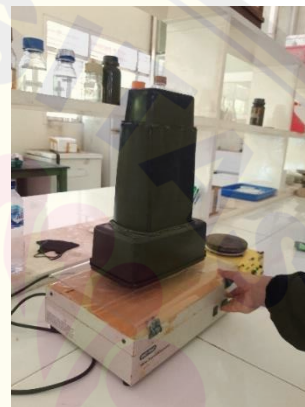
7. Isolasi RNA



8. Sintesis cDNA



9. Elektroforesis



10. Visualisasi hasil ekspresi gen

Lampiran 2. Analisis Data Diameter Kalus pada Fase Induksi Kalus 2 MST

Perlakuan	Ulangan (mm)									Total	Rata-rata	StDev
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
MS0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1,000	0,000
IBA	1,2	1,3	1,3	1,2	1,2	1,1	1,2	1,3	1,5	11,3	1,256	0,113
2,4D	1,3	1,5	1,3	1,3	1,2	1,5	1,2	1,2	1,3	11,8	1,311	0,117
Total	3,5	3,8	3,6	3,5	3,4	3,6	3,4	3,5	3,8			
Rata-rata	1,17	1,27	1,2	1,17	1,13	1,2	1,13	1,17	1,27	32,1	1,1889	

FK	38,163
JK Total	0,707
JK Perlakuan	0,496
JK Galat	0,211

Perhitungan Analisis Keragaman (ANOVA)

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhitung	F tabel 5%	F tabel 1%	Kesimpulan
Perlakuan	2	0,496	0,248	28,168	3,403	5,61	Signifikan
Galat	24	0,211	0,009				
Total	26	0,707					

Uji BNJ

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
MS0	0	
IBA	1.26	a
2,4-D	1.31	b

Lampiran 3. Analisis Data Diameter Kalus pada Fase Induksi Kalus 4 MST

Perlakuan Media	Ulangan (mm)									Total	Rata- rata	StDev
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
MS0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	1,000	0,000
IBA	1,5	1,7	1,8	2	1,6	1,6	1,5	1,7	1,5	14,9	1,656	0,167
2,4D	2	2	2	2	2	2	2	2,2	2,1	18,3	2,033	0,071
Total	4,5	4,7	4,8	5	4,6	4,6	4,5	4,9	4,6	42,2	1,563	
Rata-rata	1,5	1,57	1,6	1,67	1,53	1,53	1,5	1,63	1,53			

FK	65,957
JK Total	5,183
JK Perlakuan	4,921
JK Galat	0,262

Perhitungan Analisis Keragaman

Sumber	db	JK	KT	Fhitung	F table 5%	F Tabel 1%	Kesimpulan
Perlakuan	2	4,921	2,460	225,186	3,403	5,61	**
Galat	24	0,262	0,011				
Total	26	5,183					

UJI BNJ

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
MS0	0	
IBA	1.66	a
2,4-D	2.03	b

Lampiran 4. Diameter Kalus Fase Regenerasi

a. Diameter Kalus 2 MST Regenerasi (mm)

Perlakuan	Ulangan (mm)						Total	Rata-Rata	StDev
	I	II	III	IV	V	VI			
M1	3.50	2.50	2.50	2.00	2.80	2.50	15.80	2.63	0.497
M2	2.50	2.20	3.00	2.50	2.70	2.00	14.90	2.48	0.354
M3	2.50	3.00	2.00	2.50	2.50	1.50	14.00	2.33	0.516
M4	1.70	2.50	2.70	2.50	1.50	2.00	12.90	2.15	0.489
Total	10.20	10.20	10.20	9.50	9.50	8.00	57.60		

Perhitungan ANOVA

Sumber Keragaman	DB	JK	KT	Fhit	Fhit 5%	Fhit 1%	Ket
Perlakuan	3	0.77	0.26	1.17	3.10	4.94	tn
Galat	20	4.39	0.22				
Total	23	5.16					

b. Diameter Kalus 4 MST Regenerasi

Perlakuan	Ulangan (mm)						Total	Rata-Rata	StDev
	I	II	III	IV	V	VI			
M1	4	3	3	2.5	3	3	18.50	3.08	0.492
M2	3	2.7	4	3	3	4	19.70	3.28	0.567
M3	3.5	4	3	2.5	3	3	19.00	3.17	0.516
M4	2	3.2	3	3	3	2	16.20	2.70	0.548
Total	12.50	12.90	13.00	11.00	12.00	12.00	73.40		

Perhitungan ANOVA

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhit	Fhit 5%	Fhit 1%	Ket
Perlakuan	3	1.15	0.38	1.35	3.10	4.94	tn
Galat	20	5.65	0.28				
Total	23	6.80					

c. Diameter Kalus 10 MST Regenerasi

Perlakuan	Ulangan						Total	Rata-Rata	StDev
	I	II	III	IV	V	VI			
M1	5.00	5.00	6.00	4.00	4.00	3.00	27.00	4.50	1.049
M2	5.00	4.00	5.00	5.00	5.00	4.50	28.50	4.75	0.418
M3	5.00	4.00	4.00	3.50	5.00	5.00	26.50	4.42	0.665
M4	3.00	3.00	4.00	4.00	3.00	5.00	22.00	3.67	0.816
Total	18.00	16.00	19.00	16.50	17.00	17.50	104.00		

Perhitungan ANOVA

SK	Db	JK	KT	Fhit	Fhit 5%	Fhit 1%	Ket
Perlakuan	3	3.92	1.31	2.19	3.10	4.94	tn
Galat	20	11.92	0.60				
Total	23	15.83					

Lampiran 5. Analisis data jumlah kalus yang memasuki fase koleoptilar

Perlakuan	Ulangan						Rata-rata	StDev
	1	2	3	4	5	6		
M1	33.33	16.67	33.33	16.67	33.33	16.67	25.000	9.13
M2	0.00	16.67	16.67	16.67	33.33	16.67	16.668	10.54
M3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000	0.00
M4	16.67	16.670	16.67	16.67	16.67	16.67	16.670	0.00

FK	5105.05
JK Total	2951.07
JK Perlakuan	1979,29
JK Galat	971,78

Perhitungan Analisis Keragaman

Sumber	db	JK	KT	Fhitung	F tabel 5%	F Tabel 1%	Kesimpulan
Perlakuan	3	1979,29	659,76	13,58	3,0978	4,938	**
Galat	20	971,78	48,59				
Total	23	2951.07					

Uji DMRT

Perlakuan	Rata-rata	Rata-rata + DMRT	Simbol
M3	0.00	8.395	a
M4	16.67	25.483	b
M2	16.67	25.748	bc
M1	25		c

Lampiran 6. Analisis data jumlah kalus yang beregenerasi

Perlakuan	Ulangan						Total	Rata-rata	StDev
	1	2	3	4	5	6			
M1	33.33	33.33	33.33	33.33	16.67	50	199.99	33.33	10.54
M2	50	33.33	66.67	33.33	50	66.67	300	50	14.91
M3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M4	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FK	10416,25
JK Total	12916,75
JK Perlakuan	11249,75
JK Galat	1667,00

Perhitungan Analisis Keragaman

Sumber	db	JK	KT	Fhitung	F table 5%	F tabel 1%	Kesimpulan
Perlakuan	3	11249,75	3749,917	44,99	3,098	4.938	**
Galat	20	1667,00	83,35				
Total	23	12916,75					

Uji DMRT

Perlakuan	Rata-rata	Rata-rata + DMRT	Simbol
M3	0.00	10.995	a
M4	0	11.543	ab
M1	33.33	45.220	c
M2	50		d