

INTERAKSI *Thielaviopsis paradoxa* DENGAN KALUS *Aquilaria* spp.

@Hak cipta milik IPB University

ROSEU ROSTIKA



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
1998



RINGKASAN

ROSEU ROSTIKA. Interaksi *Thielaviopsis paradoxa* dengan kalus *Aquilaria* spp. (*Thielaviopsis paradoxa* with *Aquilaria* spp. calli interaction). Dibimbing oleh GAYUH RAHAYU, M. IRENE. J. UMBOH dan HILMAN AFFANDI.

Aquilaria spp. adalah tanaman hutan yang dapat menghasilkan komoditas non kayu, yaitu gaharu. Senyawa gaharu merupakan resin yang mudah menguap dari senyawa-senyawa sesquiterpenoid atau turunan chromone. Gaharu terbentuk sebagai reaksi pertahanan *Aquilaria* terhadap serangan mikroorganisme. *Thielaviopsis paradoxa* adalah salah satu mikroorganisme yang berasosiasi dengan gumpalan gaharu. Bentuk interaksi antara inang dengan cendawan patogen dapat dilihat dari hasil interaksi kultur ganda kalus inang dengan koloni cendawan, dan dari pembentukan senyawa-senyawa baru dalam kalus yang diberi elisitor cendawan.

Pada interaksi kultur ganda, pertumbuhan koloni dan perubahan dalam penampakan kalus diamati. Kalus tersebut diekstraksi dengan eter setelah diinkubasi, kemudian senyawa gaharunya dianalisis dengan GLC. Senyawa gaharu pada kalus dibandingkan dengan senyawa gaharu pada standar. Pada kalus yang diinduksi oleh substansi ekstraseluler (elisitor) *T. paradoxa*, kalus diekstraksi dengan eter dan aseton, kemudian dianalisis kandungan senyawa gaharunya setelah diinkubasi selama 48 jam.

Pertumbuhan koloni *T. paradoxa* terhambat dengan adanya kalus, sedangkan kalus mengeluarkan cairan berwarna putih keruh sebagai reaksi pertahannya terhadap *T. paradoxa*. Beberapa senyawa gaharu terbentuk dalam kalus yang dikulturkan bersama koloni *T. paradoxa*, maupun kalus yang ditetesi dengan elisitor. Kandungan senyawa gaharu pada kalus hasil interaksi kultur ganda, *A. filaria* lebih beragam daripada *A. malaccensis* dan *A. crassna*. Pada kalus yang ditetesi elisitor *T. paradoxa*, kalus yang tidak menggumpal (meristematik) menghasilkan tiga senyawa gaharu masing-masing satu senyawa pada *A. malaccensis* dengan ekstraksi aseton, dan dua senyawa pada *A. filaria* dengan ekstraksi eter dan aseton. Dari kalus yang menggumpal (non meristematik) menghasilkan satu senyawa gaharu yaitu hanya pada *A. filaria* dengan ekstraksi aseton.

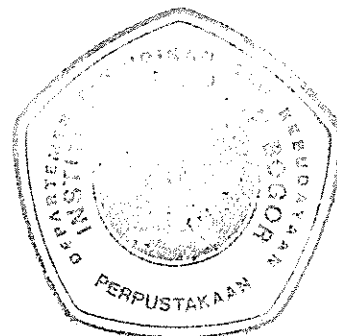
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.





SUMMARY

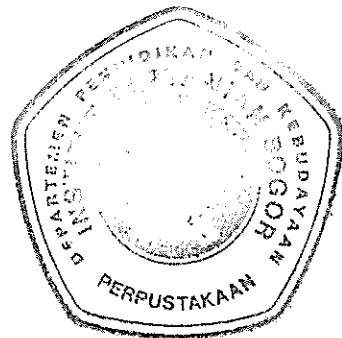
ROSEU ROSTIKA. Interaction between *Thielaviopsis paradoxa* with *Aquilaria* spp. calli. Promoted by GAYUH RAHAYU, M. IRENE. J. UMBOH dan HILMAN AFFANDI

Aquilaria spp. is a forest tree which produce gaharu, a non-wood product. Gaharu is a resinous substance in forms of either sesquiterpenoid or chromone derivatives and is highly volatiled. Gaharu is formed as a defence reaction to the infection of microorganisms. *Thielaviopsis paradoxa* is one amongst microorganisms that associated with gaharu. Interaction between host and its fungal pathogen can be determined by dual cultures method and by analyzing a new compound formed in host calli as a host reaction to elisitors from pathogen.

In dual cultures, growth colony of the fungus and alteration on the calli are observed. Calli are extracted with ether and the gaharu substances were analyzed using GLC. The extracted gaharu substances are identified by comparing them with the gaharu standard. Calli that are wetted with extracellular substance (elisitor) of *T. paradoxa* are also extracted with either ether and acetone after 48 hours incubation. The gaharu substances are also identified qualitatively.

The growth of *T. paradoxa* colony is inhibited by the calli, and the calli exudes a milky matrix, apparently a defence reaction of a calli againsts *T. paradoxa*. Gaharu substances are formed in both calli that grow simultaneously with *T. paradoxa* and calli that wetted with elisitor. The kind of gaharu substances (based in its retention time) that are formed in dual cultured of *A. filaria* and *T. paradoxa* are more varied than that are formed in *A. malaccensis* and *A. crassna*. Calli that are wetted with elisitor also formed three gaharu substance, one substance in *A. malaccensis* calli that are extracted with acetone, and two substances in *A. filaria* calli that are extracted with ether and acetone. Amongst non-meristematic calli, only calli of *A. filaria* that are extracted with acetone produced a gaharu substance.

@Hak cipta milik IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



INTERAKSI *Thielaviopsis paradoxa* DENGAN KALUS *Aquilaria* spp.

ROSEU ROSTIKA

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh Gelar
Sarjana Sains
Pada
Jurusan Biologi

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
1998**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Judul : Interaksi *Thielaviopsis paradoxa* dengan Kalus *Aquilaria* spp.
Nama : Roseu Rostika
NIM : G 30. 1234

Menyetujui

Dr. Ir. Gayuh Rahayu
Pembimbing I

Prof. Dr. M. Irene. J. UMBOH
Pembimbing II

Dr. Hilman Affandi
Pembimbing III

Mengetahui



Dr. Ir. Muhammad Yusuf
Ketua Program studi

Tanggal Lulus : 2 September 1998.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Riwayat Hidup

Penulis dilahirkan di Garut pada tanggal 10 November 1975 sebagai anak kelima dari enam bersaudara, anak dari pasangan Lukman dan Euis. A. Rosyi.

Tahun 1993 penulis lulus dari SMAN Cibatu, Garut dan pada tahun yang sama lulus seleksi masuk IPB melalui jalur Undangan Seleksi Masuk IPB (USMI) di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Selama mengikuti perkuliahan penulis menjadi asisten mata kuliah Biologi Dasar 1 pada tahun ajaran 1996/1997, dan asisten mata kuliah Anatomi dan Morfologi Tumbuhan pada tahun ajaran yang sama.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PRAKATA

Syukur Alhamdulillah, penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan rahmat dan hidayah-NYA sehingga penulis dapat menyelesaikan karya ilmiah yang berjudul "Interaksi *Thielaviopsis paradoxa* dengan kalus *Aquilaria* spp".

Karya ilmiah ini merupakan hasil penelitian yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Forest Biotechnology BIOTROP, Bogor dari bulan Desember 1997 sampai Agustus 1998, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Biologi FMIPA IPB.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar besarnya kepada Dr. Ir. Gayuh Rahayu, Prof. Dr. M. Irene. J. UMBOH dan Dr. Hilman Affandi selaku dosen Pembimbing yang telah memberikan perhatian, saran, bimbingan, pengarahan dan bantuan yang berarti bagi penulis selama melaksanakan penelitian hingga tersusunnya skripsi ini. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada Mbak Yupi, pak Syamsul, Mbak Erina, pak Joner beserta staf dan teknisi Biotechnology BIOTROP, mas Arif, mbak Santi atas segala bantuan teknis selama penelitian, Ina, Sasa, dan warga Cikabuyutan IA atas bantuan dan kerjasamanya.

Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada Ayahanda, Ibunda, kakak dan Adikku tersayang yang senantiasa memberi dukungan dalam kasih sayang dan Do'a yang tak ternilai.

Semoga Skripsi ini bermanfaat.

Bogor, Agustus 1998

Roseu Rostika



DAFTAR ISI

Haikaman

DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
PENDAHULUAN	
Latar Belakang	1
Tujuan	2
BAHAN DAN METODE	
Waktu dan Tempat	2
Bahan	2
Metode	
Pembentukan Kalus <i>Aquilaria</i> spp	2
Persiapan inokulum Cendawan	2
Interaksi Kultur Ganda <i>T. paradoxa</i> dengan <i>Aquilaria</i> spp	2
Produksi Elisitor	2
Produksi Senyawa Gaharu	3
Ekstraksi Senyawa Gaharu	3
Identifikasi Senyawa Gaharu	3
HASIL DAN PEMBAHASAN	
Pertumbuhan Kalus <i>Aquilaria</i> spp	3
Interaksi Kultur Ganda	
- Pertumbuhan Koloni <i>T. paradoxa</i>	5
- Aktivitas Kalus <i>Aquilaria</i> spp	6
- Senyawa Gaharu pada Kalus	6
- Senyawa Gaharu Hasil Induksi Elisitor	7
- Ekstraksi Eter	7
- Ekstraksi Aseton	8
KESIMPULAN	9
SARAN	9
DAFTAR PUSTAKA	9
LAMPIRAN	12

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mempublikasikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR TABEL

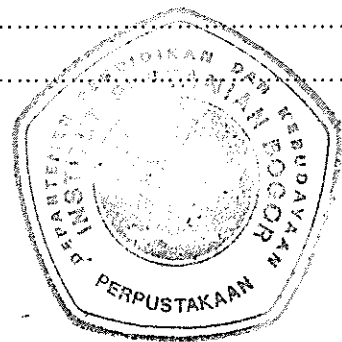
	Halaman
1. Waktu Retensi (RT) senyawa gaharu ekstraksi eter dari kalus hasil interaksi	7
2. Waktu Retensi (RT) dengan ekstraksi eter	8
3. Waktu Retensi (RT) dengan ekstraksi aseton	9

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Hubungan antara diameter kalus <i>A. malaccensis</i> , <i>A. filaria</i> dan <i>A. crassna</i> dengan bobotnya	4
2. Ra koloni <i>T. paradoxa</i> yang ditumbuhkan bersama-sama dengan kalus-kalus <i>A. malaccensis</i> , <i>A. filaria</i> dan <i>A. crassna</i> pada hari ke-2 dan ke-4 inkubasi.	5
3. Kalus (dari kiri) <i>A. malaccensis</i> , <i>A. filaria</i> (atas) <i>A. crassna</i> (bawah) yang ditumbuhkan bersama-sama dengan <i>T. paradoxa</i> dan kontrol dengan	5
4. Jari-jari koloni cendawan (rk dan rs) yang berinteraksi dengan kalus pada hari ke-2 dan ke-4 inkubasi.....	6
5. Pertumbuhan lanjut <i>T. paradoxa</i> satu hari setelah kalus (dari kiri) <i>A. malaccensis</i> <i>A. filaria</i> , dan <i>A. crassna</i> diangkai	6
6. Gumpalan (tanda panah) yang terbentuk pada kalus setelah diinkubasi selama 48 jam P- (atas) PE (bawah)	8

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Media dasar Murashige & Skoog's (MS)	12
2. Media MS yang dimodifikasi	12
3. Media MS0	13



PENDAHULUAN

Latar Belakang

Hutan selain sebagai sumber komoditas kayu, juga dikenal sebagai komoditas non kayu. Salah satu diantaranya adalah gubal gaharu. Gubal gaharu atau biasanya disebut dengan gaharu mempunyai nilai ekonomi karena merupakan komoditas ekspor dengan nilai jual yang tinggi, dan merupakan bahan mentah dalam pembuatan parfum, kosmetik serta obat-obatan (Santoso, 1996). Menurut Burkill (1935), Suhartono & Mardiana (1997) gaharu terbentuk sebagai akibat infeksi patogen terhadap pohon gaharu. Gaharu pada batang pohon yang terinfeksi terlihat sebagai gumpalan padat, berwarna coklat kehitam-hitaman dan berbau harum apabila dibakar (Scuitemaker, 1933). Pohon yang dapat menghasilkan gaharu diantaranya *Aquilaria malaccensis*, *A. crassna*, dan *A. filaria* termasuk suku Thymelaeaceae. Dari ketiga pohon gaharu tersebut *A. crassna* merupakan tanaman asli Kamboja, sedangkan *A. malaccensis* tanaman asli Indonesia yang ada di Sumatera dan Kalimantan dan *A. filaria* terdapat di bagian timur Indonesia (Hou, 1960).

Beberapa cendawan berasosiasi dengan gejala-gejala terbentuknya gaharu antara lain luka pada batang, ranting dan bagian pohon lainnya (Rahayu, komunikasi pribadi). Cendawan patogen dapat digunakan sebagai salah satu elisitor biotik yang dapat merangsang reaksi inang untuk mempertahankan diri. Elisitor yang berasal dari cendawan patogen dapat merupakan biomassa cendawan itu sendiri atau dapat merupakan substansi yang dikeluarkan cendawan. Substansi elisitor akan merangsang sel-sel kalus atau tanaman bereaksi mengeluarkan senyawa-senyawa pertahanan berupa enzim hidrolitik dan substansi fitoaleksin lainnya. Pada tanaman hidup (inang), substansi fitoaleksin biasanya diproduksi dan diakumulasi di daerah sekitar infeksi (Bailey, 1982). Pada dasarnya senyawa-senyawa fitoaleksin bersifat senyawa yang mudah menguap. Golongan senyawa kimia yang telah dilaporkan ada dalam gaharu antara lain senyawa sesquiterpen dan senyawa turunan choromone (Iwagoe *et al.* 1987 dan Naf *et al.* 1993).

Harga jual gaharu kualitas tinggi (istilah dagang "gubal gaharu") sangat mahal yaitu US \$ 400.00 per kg, serta banyak diminati oleh bangsa Arab, India dan Cina. Beberapa tahun terakhir ini

ekspor gaharu dari Indonesia tidak bisa mencapai quota ekspor menurut ketentuan CITES (hasil konferensi Badan Dunia di Florida, November 1994) sejumlah 250 ton per tahun (Umboh *dkk.* 1987). Hal ini disebabkan jenis-jenis pohon gaharu terutama yang termasuk genus *Aquilaria* sudah menjadi pohon langka di hutan alam saat ini. Agar produksi gubal gaharu dapat dipertahankan perlu dilakukan penelitian tentang pembudidayaan dan pemuliaan pohon gaharu dengan aplikasi teknik-teknik bioteknologi, diantaranya dengan cara teknik perbanyakan tanaman secara *in vitro* dan teknik peningkatan produksi gaharu melalui induksi kalus.

Sehubungan dengan pentingnya gaharu dalam peranannya sebagai sumber devisa, maka dirasakan perlu untuk melakukan penelitian "interaksi mikroorganisme penyebab gaharu dengan kalus *Aquilaria* spp." Interaksi antara cendawan patogen dengan sel-sel kalus diduga dapat memberikan gambaran sifat dari interaksi alamiah antara keduanya.

Salah satu cendawan patogen yang berasosiasi dalam pembentukan gubal gaharu adalah *Thielaviopsis paradoxa* (Rahayu komunikasi pribadi). Di Indonesia terdapat beberapa spesies *Thielaviopsis* dan cendawan ini memiliki beragam inang. *Thielaviopsis paradoxa* dilaporkan sebagai penyebab penyakit busuk pada nenas dan salak (Hamzah *dkk.* 1993). Sedangkan spesies lainnya, seperti *T. fimbriata* merupakan pengkolonisasi utama bidang sadapan pada pohon karet (Rao, 1975) dan *T. basicola* yang termasuk cendawan tular tanah yang banyak menyerang akar tanaman tembakau dan beberapa tumbuhan lain (Patrick *et al.* 1965).

Pada percobaan Peters *et al.* (1998) tentang interaksi kultur ganda cendawan endofitik dengan kalus yang berasal dari tanaman inang dan yang bukan dari tanaman inangnya, pertumbuhan koloni cendawan tidak dipengaruhi atau dirangsang oleh kalus inang, tetapi pertumbuhan koloni cendawan dapat dihambat atau dirangsang oleh kalus bukan inang. Substansi yang dikeluarkan kalus berpengaruh terhadap cendawan dan cendawanpun mengeluarkan metabolit ke dalam medium. Substansi tersebut dapat bersifat racun atau malah merangsang pertumbuhan kalus bergantung dari inangnya. Jaringan sel-sel yang belum

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

berdiferensiasi (kalus) dapat membentuk reaksi fitoaleksin jika diasosiasikan dengan cendawan patogen. Hal ini telah dicoba pada kalus sejenis pohon Elm (*Ulmus* spp), elisitor *Ophistoma ulmi* dapat menginduksi terbentuknya fitoaleksin berupa mansonone (Yang *et al.* 1989).

Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pembentukan senyawa gaharu hasil interaksi antara sel-sel kalus *A. malaccensis*, *A. filaria*, dan *A. crassna* dengan *T. paradoxa*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Desember 1997 sampai dengan Agustus 1998 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Forest Biotechnology BIOTROP Bogor.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah *Thielaviopsis paradoxa* nomor 23 koleksi laboratorium Mikrobiologi BIOTROP, dan pohon gaharu *A. malaccensis*, *A. filaria* dan *A. crassna* koleksi laboratorium Forest Biotechnology & Tree Improvent BIOTROP sebagai sumber eksplan untuk pembentukan kalus.

Metode

Pembentukan Kalus *Aquilaria*

Tunas aksiler dari *Aquilaria malaccensis* (*Am*), *A. filaria* (*Af*) dan *A. crassna* (*Ac*) berukuran kurang lebih 2-5 mm diambil dan ditanam pada media induksi kalus yaitu media dasar MS yang dimodifikasi (Lampiran 1), selama 10 – 12 minggu. Kalus-kalus yang telah tumbuh membesar, diperbanyak dengan menumbuhkan kembali pada media yang sama. Hasil dari perbanyakan tersebut dipelihara selama 6-8 minggu dan digunakan sebagai sumber kalus. Sebanyak 50 kalus diukur diameternya, lalu ditimbang. Kemudian dibuat kurva hubungan antara diameter dan bobot kalus.

Sebagian kalus tersebut disubkulturkan kembali dengan cara memisahkan kalus menjadi dua bagian yaitu kalus meristematik yang ditandai dengan pertumbuhannya cepat tidak menggumpal dan kalus non meristematik yang ditandai dengan pertumbuhannya yang lambat dengan tekstur menggumpal agak keras. Media induksi yang

digunakan untuk perbanyakan kalus meristematik adalah media dasar MS yang dimodifikasi. Sedangkan media yang digunakan untuk kalus non meristematik, adalah media MS nol (Lampiran 1).

Persiapan Inokulum Cendawan

Inokulum diperoleh dari hasil peremajaan biakan *T. paradoxa* pada media PDA dengan suhu inkubasi 28^o C selama 7 hari.

Interaksi Kultur Ganda *T. paradoxa* dengan *Aquilaria* spp.

Kalus yang telah berumur 6-8 minggu ditumbuhkan secara bersamaan dengan koloni biakan cendawan yang berumur 7 hari. Kalus dikulturkan sebanyak 2.0-2.5 g per cawan dan sepotong inokulum diinokulasikan (5 x 5 mm) yang diambil dari tepi koloni ditanam dengan jarak tanam 4.5 cm dari kalus pada media induksi kalus MS dasar yang dimodifikasi. Media yang diinokulasikan dengan biakan cendawan saja digunakan sebagai kontrol. Pertumbuhan cendawan diamati setiap 2 hari dengan mengukur diameter cendawan ke arah kalus (d_k) dan diameter tegak lurus (d_s). Pengukuran dihentikan ketika koloni cendawan sudah bersentuhan dengan kalus. Interaksi dinyatakan dalam radius koloni cendawan dan senyawa gaharu dalam kalus diidentifikasi. Rata rata radius (R_a) dihitung dengan persamaan:

$$R_a = \frac{d_k + d_s}{4} \text{ atau } R = \frac{(d_k - 2) + d_s}{3} \text{ apabila}$$

$d_k > 4\text{cm}$ (Peters *et al.* 1998). Kandungan senyawa gaharu yang dihasilkan sel-sel kalus diekstraksi dengan eter dan dianalisis dengan Kromatografi Gas Cair (GLC).

Produksi Elisitor

Inokulum berukuran sekitar 5 x 5mm diambil dari tepi koloni dan dipindahkan ke dalam erlenmeyer (250 ml) yang berisi 50 ml ekstrak kentang yang berasal dari 400 gram kentang per liter ditambahkan 0,4% dekstrosa (Takzi and Richard, 1978). Kultur diinkubasi selama 12 hari dalam kondisi gelap pada mesin penggoyang dengan kecepatan 120 rpm.



Biakan yang didapat kemudian disaring dengan kertas Whatman no 1, lalu filtrat biakan disentrifugasi dengan kecepatan 11 000 rpm pada suhu 4° C selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan dipisahkan dengan evaporator berputar sampai menjadi 1/20 volume asal. Supernatan pekat ini disterilisasi dengan milipor 0,2 µm dan digunakan sebagai sumber elisitor.

Produksi Senyawa Gaharu

Dengan bantuan pipet, elisitor diteteskan sebanyak 0,4 mg per gram kalus atau 200 µl per gram kalus. Kalus kemudian diinkubasi selama 48 jam. Cawan-cawan Petri yang masing-masing berisi kalus yang diberi elisitor (PE) dan yang hanya ditetesi media produksi elisitor (PP) serta yang berisi kalus tanpa perlakuan penetesan apapun (P-) diinkubasi dengan waktu yang sama (48 jam). Kalus (PP) dan (P-) digunakan sebagai pembandingan. Setiap perlakuan disertai dengan dua ulangan.

Ekstraksi-senyawa Gaharu

Kalus diekstraksi dengan dua jenis pelarut, yaitu eter dan aseton. Pada ekstraksi dengan pelarut eter evaporasi hanya dilakukan satu kali, sedangkan dengan pelarut aseton evaporasi dilakukan dalam dua tahap.

Kalus-kalus yang mendapat perlakuan seperti di atas, digerus dengan menggunakan mortar sampai agak halus. Kalus yang telah digerus diekstraksi dengan pelarut eter sebanyak 20-30 ml. Ekstraksi senyawa gaharu berlangsung selama 15-30 menit dengan cara dikocok. Suspensi disaring dengan kertas Watman no1 untuk mendapatkan ekstrak kasar yang larut dalam eter. Ekstrak kasar tersebut disaring kembali dengan kertas saring yang telah dibubuhi dengan sedikit Natrium sulfat (Na_2SO_4) anhidros dan diuapkan pada suhu kamar di dalam ruangan asam.

Sedangkan pada ekstraksi aseton, kalus yang telah digerus diberi pelarut aseton sebanyak 30 ml. Ekstraksi senyawa gaharu berlangsung selama kurang lebih 15 sampai dengan 30 menit dengan cara dikocok dengan alat magnetik stirer. Setelah ekstraksi selesai, hasilnya dipisahkan dengan evaporator sampai memperoleh ekstrak kasar ± 1/6 volume asal. Ekstrak kasar disaring dengan kertas Whatman no 1 yang telah berisi (Na_2SO_4) kemudian kertas saring dibilas dengan etanol absolut. Hasil penyaringan diuapkan kembali

dengan evaporator untuk mendapatkan ekstrak kasar murni tanpa kandungan air.

Identifikasi Senyawa Gaharu

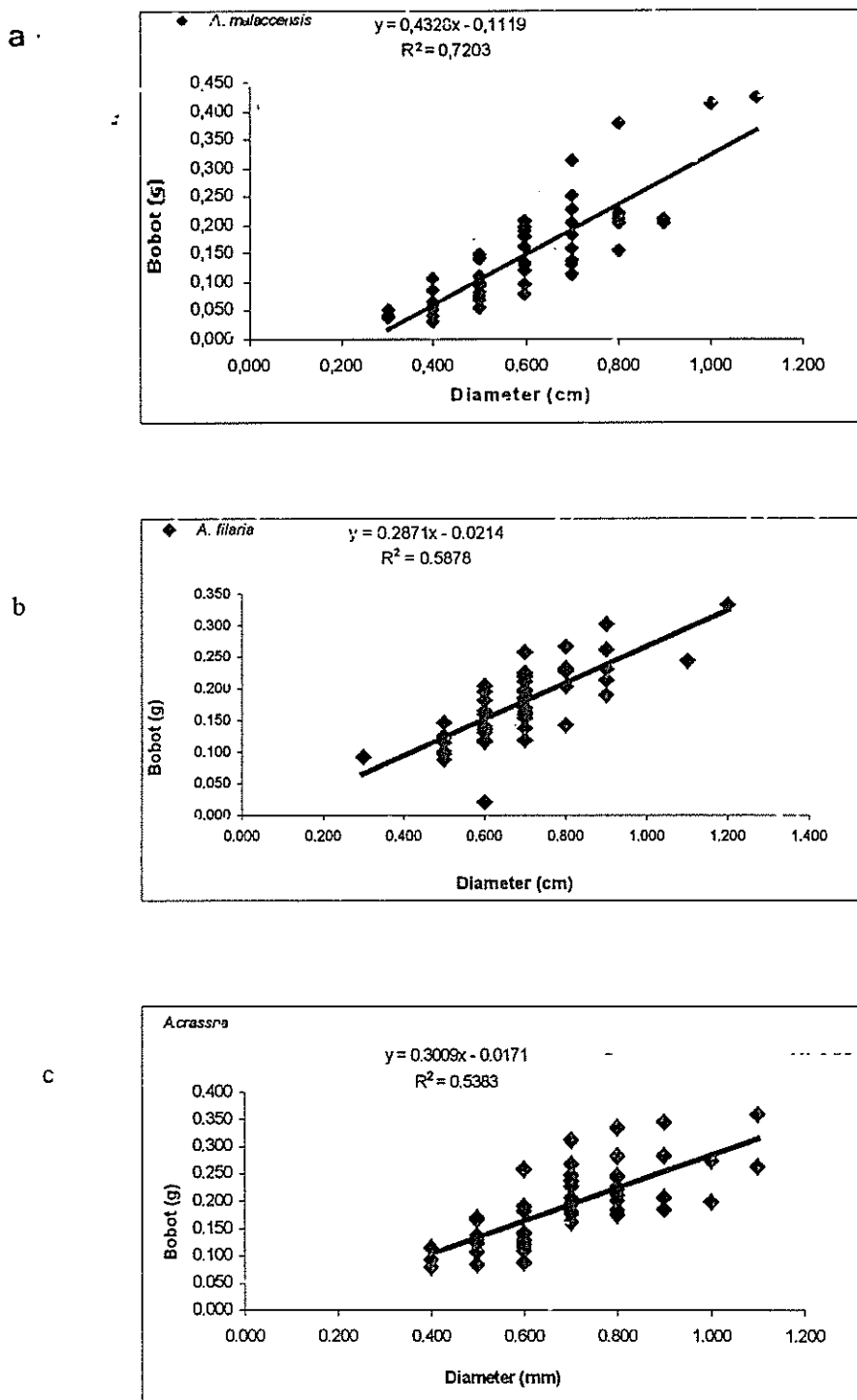
Senyawa gaharu diidentifikasi secara kualitatif dengan gas kromatografi. Ekstrak kasar dianalisis dengan gas kromatografi *packed column carbowax 20 on chromosob* BMAW 80/100 mesh pada temperatur injektor 230 °C gas pembawa N_2 ; kecepatan udara 0.55kg/cm² ; kecepatan aliran H_2O 0.50kg/cm²; dan detektor FID (Sugiarto, 1992). Sebelum alat dipergunakan, alat dikalibrasi dengan cara penyuntikkan berturut-turut pelarut (etanol), larutan standar kemudian bahan yang akan dianalisis. Larutan standar merupakan fraksi netral (bebas asam dan basa) dari hasil ekstraksi senyawa gaharu dengan pelarut aseton.

Grafik hasil analisis kandungan senyawa gaharu pada ketiga jenis kalus gaharu, dibandingkan dengan grafik standar dan grafik pembandingan (PP dan P-). Tinggi tinggi puncak yang terbentuk tiap kolomnya pada waktu retensinya (RT) yang sama dibandingkan. Puncak disini adalah titik tertinggi dari suatu grafik yang memiliki luas area. Sedangkan RT merupakan suatu istilah untuk senyawa yang tertahan pada fase diam sehingga dibentuk puncak-puncak pada waktu waktu tertentu. Suatu senyawa pada ekstraksi kalus dianggap sama dengan senyawa pada standar jika RT senyawa pada kalus tersebut berbeda dalam kisaran ±0.1 dari RT standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Kalus

Kalus-kalus *Am*, *Af*, dan *Ac* dapat tumbuh baik pada media dasar MS yang dimodifikasi. Peningkatan diameter kalus yang diikuti dengan peningkatan bobotnya (Gambar 1a, b dan c). Namun koefisien korelasi (r) pada persamaan hubungan diameter dan bobot kalus dari masing-masing spesies lebih kecil dari 0.9, sehingga diameter kalus tidak selalu dapat dijadikan penduga bobotnya. Biasanya r dapat dipercaya apabila r berada pada selang $0.9 \leq r \leq 1$. Pada MS modifikasi dihasilkan kalus dengan bobot per diameternya yang tidak berbeda jauh 0.2579g/cm, 0.2609 g/cm dan 0.2747 g/cm untuk berturut-turut *Am*, *Af* dan *Ac*.



Gambar 1. Hubungan antara diameter kalus a) *A. malaccensis*, b) *A. filaria* dan c) *A. crassna* dengan bobotnya.

Selain penyesuaian kondisi di atas, perbedaan media untuk menumbuhkan kaus meristematik dan non meristematik ikut menentukan keberhasilan dan menambah pembendaharaan aturan komposisi media dari setiap spesies *Aquilaria* yang ditumbuhkan pada media awal. Kalus-kalus yang tadinya berbeda tipe dan ditumbuhkan pada media yang berbeda, berubah tipenya menjadi kalus-kalus mirip. Setelah ditumbuhkan selama 6–8 minggu, kalus yang non meristematik berkembang seperti kalus yang bertipe meristematik. Di bagian permukaan kalus terdapat pertumbuhan baru yang meristematik (tidak menggumpal), sehingga kalus ini masih dianggap sebagai kalus non meristematik.

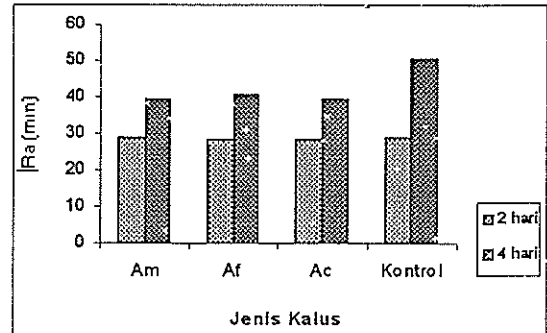
Interaksi Kultur Ganda Pertumbuhan koloni *T. paradoxa*

Pada interaksi kultur ganda antara kalus dengan cendawan, pengukuran R_n biasanya dihentikan apabila koloni cendawan telah bersentuhan dengan kalus (Peters *et al.* 1998). Hal ini terjadi apabila pertumbuhan koloni cendawan dirangsang oleh adanya kalus. Sebaliknya jika pertumbuhan koloni ke arah kalus terhambat, pengukuran dihentikan ketika d_s telah mencapai maksimum.

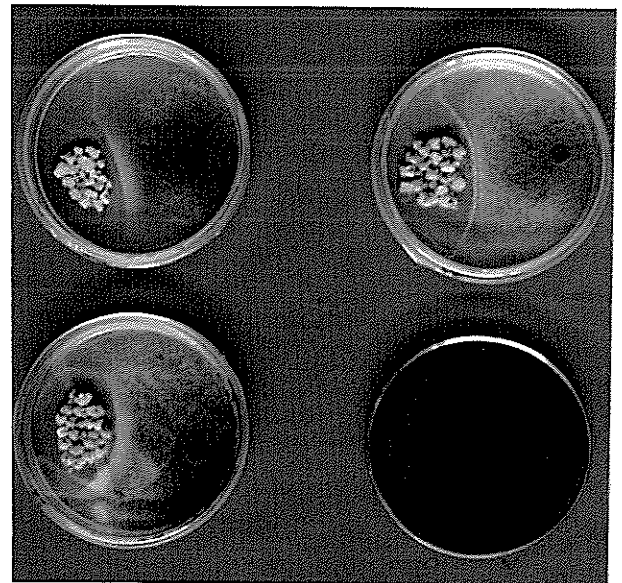
R_n koloni *T. paradoxa* yang berinteraksi dengan kalus *Aquilaria* spp sedikit berbeda dari kontrol pada hari ke-2 inkubasi, perbedaan ini semakin besar pada hari ke-4 inkubasi (Gambar 2). Pertumbuhan koloni cendawan mulai hari ke-2 sampai ke-4 inkubasi dihambat oleh kalus. Penghambatan ini semakin nyata pada hari ke-4 inkubasi. Kalus mungkin mempengaruhi pertumbuhan koloni cendawan. Aktivitas penghambatan akan semakin jelas jika d_s semua koloni *T. paradoxa* yang berinteraksi dengan kalus telah mencapai maksimum, tetapi d_k -nya belum maksimum. Pada hari yang sama diameter koloni *T. paradoxa* pada kontrol telah mencapai maksimum, sehingga dapat dikatakan d_k koloni *T. paradoxa* mendapat tekanan pertumbuhannya oleh adanya kalus. Aktivitas Penghambatan dapat dilihat dengan terbentuknya zona lengkungan mengelilingi kalus (Gambar 3).

Aktivitas penghambatan juga diperjelas dengan melihat pertumbuhan satu arah saja dari koloni *T. paradoxa* dan membandingkan antara jari-jari ke arah kalus (r_k) dengan jari-jari ke arah

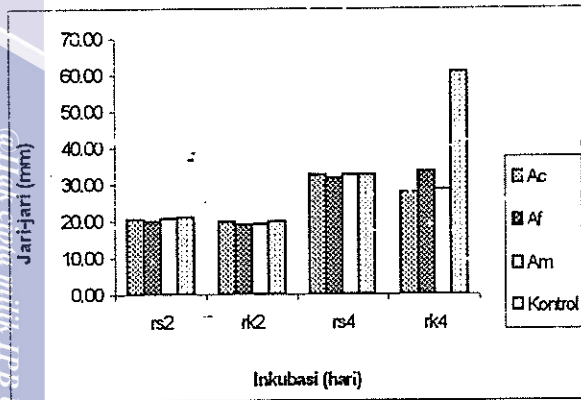
tegak lurus (r_s). Jika diinteraksikan dengan *A. malaccensis*, r_s koloni cendawan lebih besar dari pada r_k . Demikian pula dengan *A. filaria* dan *A. crassna*. Sedangkan untuk kontrol hari ke-4 inkubasi, r_k lebih tinggi r_s yang telah maksimum (Gambar 4). Kejadian ini berbeda dengan yang dilakukan Peters *et al.* (1998), adanya kalus dan cairan yang dikelurkan kalus dapat menghambat aktivitas pertumbuhan koloni *T. paradoxa*.



Gambar 2. R_n koloni *T. paradoxa* yang ditumbuhkan bersama-sama dengan kalus-kalus *A. malaccensis*, *A. filaria* dan *A. crassna* pada hari ke-2 dan ke-4 inkubasi.



Gambar 3. Kalus (dari kiri) *A. malaccensis*, *A. filaria* (atas) *A. crassna* (bawah) yang ditumbuhkan bersama-sama dengan *T. paradoxa*

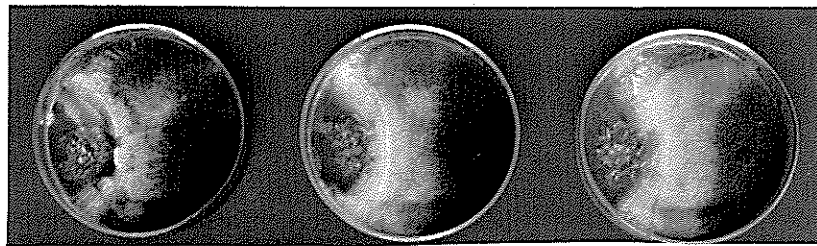


Gambar 4. Jari-jari koloni cendawan (r_s dan r_k) yang berinteraksi dengan kalus pada hari ke-2 dan ke-4 inkubasi

Aktivitas Kalus *Aquilaria* spp.

Mulai hari ke-2 sampai ke-4 inkubasi, kalus mengeluarkan suatu cairan berwarna putih keruh. Cairan tersebut mungkin merupakan bentuk reaksi pertahanannya terhadap cendawan. Meskipun pada hari ke-2 inkubasi reaksi pertahanan kalus sudah terlihat tetapi koloni cendawan memperlihatkan pertumbuhan yang normal dan baru pada hari ke-4 inkubasi pertumbuhan koloninya terhambat.

Setelah kalus diangkat untuk dianalisis senyawa gaharunya, koloni cendawan dibiarkan tumbuh dan koloni cendawan tumbuh kembali dengan cepat (Gambar 5). Jelaslah bahwa substansi yang dikandung dan dikeluarkan kalus benar-benar menghambat pertumbuhan koloni cendawan.



Gambar 5. Pertumbuhan lanjut *T. paradoxa* satu hari setelah kalus (dari kiri) *A. malaccensis*, *A. filaria* dan *A. crassia* diangkat.

Senyawa Gaharu pada Kalus

Hasil analisis GLC dari kalus hasil interaksi tersebut, menunjukkan bahwa senyawa gaharu terbentuk pada semua kalus yang diinteraksikan (Tabel 1). Pada kalus *Am* ada tiga senyawa yang memiliki RT yang mendekati RT senyawa gaharu standar.

Pada *Af* terdapat empat senyawa dan pada *Ac* terdapat dua senyawa. Diantara semua senyawa gaharu yang terbentuk pada kalus *Aquilaria* spp., hanya satu senyawa yang terdapat pada dua jenis *Aquilaria* (*Am* dan *Af*) yaitu senyawa dengan RT (14.49) dan (14.50). Senyawa gaharu lainnya memiliki RT yang berbeda-beda. Selain itu ada satu senyawa gaharu yang terdapat pada pada kontrol masing-masing kalus spesies *Aquilaria*, sehingga senyawa gaharu sudah terbentuk pada kalus tanpa diinteraksikan. Senyawa gaharu pada kontrol *Am* memiliki RT yang mendekati senyawa gaharu pada *Af* dan *Ac*, sehingga senyawa ini dapat dikatakan sebagai senyawa yang sama. Senyawa ini tidak ditemukan pada kalus-kalus yang dipasangkan dengan *T. paradoxa*.

Hilman (komunikasi pribadi) telah menganalisis senyawa gaharu dari tiga macam kualitas gaharu yaitu gubal, kemedangan A dan kemedangan B. Diantara ketiga kualitas gaharu tersebut, setelah dianalisis dengan GLC dengan volume penginjekan yang sama, kualitas terbaik ditandai dengan terbentuknya puncak tertinggi pada RT tertentu. Hal ini terdapat pada gubal, yang ditemukan sebanyak 27 senyawa dan

pada kemedangan A maupun B masing-masing ditemukan 23 senyawa gaharu. Hal ini menunjukkan bahwa kualitas gaharu mempengaruhi jumlah dan bentuk senyawa. Dibandingkan dengan senyawa gaharu pada gaharu standar, yaitu gaharu yang terbentuk secara alami jumlah senyawa gaharu pada kalus hanya sedikit.

Tabel 1. RT Senyawa gaharu ekstraksi eter dari kalus hasil interaksi

Spesies	Perlakuan	Kontrol	Standar
<i>Am</i>	2.19 *	1.68	1.75
	14.50*		2.09
	19.59*		5.67
<i>Af</i>	1.69*	1.70	9.06
	5.68*		14.41
	14.49*		19.68
	23.58*		23.48
	31.58*		28.66
<i>Ac</i>	9.12*	1.71	31.57
	28.75*		

Am: A. malaccensis, Af: A. filaria dan Ac: A. crassna
* senyawa gaharu yang diinduksi oleh *T. paradoxa*.

Senyawa Gaharu Hasil Induksi Elisitor

Kemampuan kalus untuk menerima substansi asing sangat menentukan kalus tersebut untuk dapat beregenerasi (Firdausi, 1998) atau setidaknya mampu bertahan untuk hidup. Salah satu substansi asing yang dapat berinteraksi dengan kalus adalah substansi yang berasal dari bagian ekstraseluler cendawan patogen. Substansi ekstraseluler dari cendawan (elisitor) yang berinteraksi dengan kalus, diharapkan merangsang terbentuknya fitoaleksin. Fitoaleksin berupa produk metabolik sekunder berakumulasi di permukaan kalus seperti gumpalan. Pada gaharu senyawa fitoaleksin banyak mengandung senyawa-senyawa turunan sesqui-terpen dan turunan chromone (Ishihara *et al.* 1991 dan Naf *et al.* 1995) dan terbentuk karena adanya suatu respon pertahanan yang sangat sensitif dari sel kalus tanaman. Menurut Dixon (1986) fitoaleksin dapat berbentuk β 1-3 glukukan, hidroksi prolin, glikoprotein dan lignin yang berupa polimer aromatik dari turunan alkohol.

Gumpalan juga terbentuk pada kalus dari spesies *Am*, *Af* dan *Ac*, yang ditetesi elisitor. Gumpalan terlihat jelas adalah pada *Ac* dan *Af* (Gambar 6). Gumpalan rata rata terjadi setelah 48 jam ditetesi dengan elisitor. Selama perlakuan, kalus-kalus dipisahkan dari media tumbuhnya,

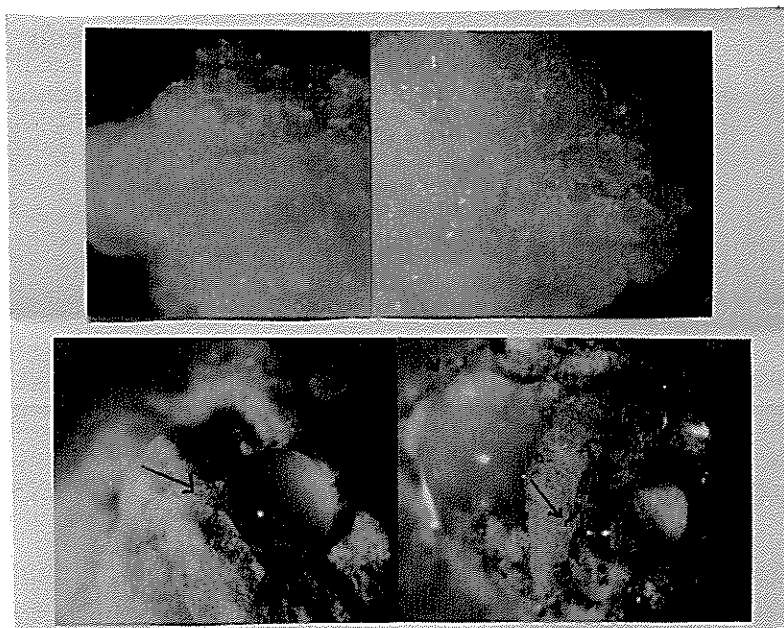
sehingga aktivitas fisiologi normal dari kalus-kalus ini terganggu. Sebagian kalus menunjukkan perubahan warna menjadi kecoklatan pada jam ke-48 inkubasi. Jika masa inkubasi diperpanjang kalus yang kecoklatan ini mungkin mati.

Hanya sekitar 30–40% jumlah kalus dapat membentuk gumpalan pada setiap perlakuan. Mungkin tidak semua kalus dapat bertahan terhadap adanya substansi asing. Fitoaleksin tidak terbentuknya karena: (1) Kalus kalus tersebut memberikan respon yang kurang sensitif terhadap molekul-molekul yang diproduksi oleh patogen (cendawan), (Keen *et al.* 1972). (2) Suatu fitoaleksin terbentuk apabila elisitor mengandung molekul yang strukturnya tidak sama atau tidak dikenali oleh inang (Van der Plank, 1978). (3) Ketidakespesifikan inang. (Van der Plank, 1978). Dalam penelitian ini mungkin persentasi molekul yang strukturnya “tidak dikenali” lebih rendah dari molekul yang strukturnya “dikenali”

Menurut Rahman dan Khisa (1980), Rahman dan Khisa (1984), lazimnya pembentukan gaharu terjadi pada pohon yang terinfeksi oleh lebih dari satu jenis mikroorganisme. *Thielaviopsis paradoxa* mungkin akan merangsang pembentukan gumpalan lebih dari 50%, apabila kalus diasosiasikan pula dengan mikroorganisme lain yang telah diidentifikasi sebagai agen pembentuk gubal gaharu bersama-sama dengan *T. paradoxa*.

Ekstraksi Eter

Hasil analisis GLC menunjukkan bahwa senyawa-senyawa dengan RT yang mendekati RT senyawa gaharu standar terbentuk pada kalus baik yang ditetesi elisitor, ditetesi media produksi maupun yang tidak diperlakukan (Tabel 2). Jadi senyawa gaharu mungkin sudah terdapat pada kalus, seperti penemuan sebelumnya. Media produksi (PP) tidak merangsang terbentuknya senyawa gaharu pada semua kalus *Aquilaria*. Diantara kalus-kalus *Aquilaria* yang ditetesi elisitor, hanya kalus *A. filaria* yang membentuk senyawa dengan RT (8.58) yang mendekati RT standar (8.51).



Gambar 6. Gumpalan (tanda panah) yang terbentuk pada kalus setelah diinkubasi selama 48 jam P- (atas) dan PE (bawah)

Tabel 2. Waktu Retensi (RT) dengan ekstraksi eter

Spesies	(PE)	(PP)	(P-)	Standar
<i>Am</i>	1.63	-	1.52 1.68	1.62 8.51
<i>Af</i>	1.66 8.58*	-	1.70	
<i>Ac</i>	1.67	1.62	1.71	-

* Senyawa Gaharu hasil induksi elisitor

Ekstraksi Aseton

Asetonpun dapat mengekstraksi senyawa gaharu pada kalus (Tabel 3). Dengan aseton ragam senyawa gaharu yang dapat diekstraksi lebih banyak daripada ragam senyawa gaharu yang diekstraksi dengan eter. Kalus-kalus yang tidak diberi elisitor mungkin mengandung senyawa gaharu yang berbeda. Ketika ditetesi media produksipun, kalus dari semua jenis *Aquilaria* terinduksi membentuk senyawa gaharu baru. Berarti media produksi dapat berfungsi sebagai elisitor. Ketika ditetesi elisitor berupa substansi ekstraseluler *T. paradoxa*, hanya

kalus *Am* dan *Af* yang membentuk senyawa gaharu baru.

Senyawa-senyawa hasil ekstraksi aseton memiliki RT yang berbeda dengan senyawa hasil ekstraksi eter. Pada ekstraksi aseton, dua senyawa gaharu terbentuk pada kalus meristematik yaitu senyawa dengan RT 1.87 (pada *Am*) dan senyawa dengan RT 3.86 (pada *Af*). Sedangkan pada kalus non meristematik hanya terbentuk satu senyawa yaitu senyawa dengan RT 9.46 (pada *Af*). Kalus meristematik mungkin lebih sensitif terhadap substansi ekstraseluler *T. paradoxa* dari pada kalus non meristematik. Sedangkan *A. crassna* tidak menunjukkan sensitifitas terhadap substansi ekstraseluler *T. paradoxa* seperti pada ekstraksi eter. Padahal *Ac* mampu membentuk senyawa gaharu pada interaksi kultur ganda. Substansi ekstraseluler *T. paradoxa* bukan merupakan elisitor yang menginduksi pembentukan senyawa gaharu pada *Ac*.

Dilihat dari keragaman senyawa gaharu yang ada, pada kalus meristematik dan non meristematik terbentuk senyawa gaharu dalam jumlah yang sama. Kalus-kalus meristematik dan kalus-kalus non meristematik mampu

melakukan reaksi terhadap adanya gangguan. Kalus non meristematik yang digunakan dalam penelitian ini masih memiliki sel-sel meristematik sebanyak 20% dari total pertumbuhan kalus, selain itu sel-sel kalus non meristematik mungkin merupakan sel-sel dewasa yang sudah tidak mampu untuk membelah tetapi tidak dalam keadaan mati. Oleh karena itu kalus non meristematik mampu memberikan respon terhadap (PE) maupun (PP). Honover (1966) menyatakan bahwa oleoresin pada *Pinus monticola* dapat dibentuk pada korteks cabang yang sudah tua maupun yang masih sangat muda. Pemandahan kalus dari media tanamnya

Kandungan senyawa gaharu pada kalus yang interaksi kultur ganda *A. filaria* lebih beragam daripada *A. malaccensis* dan *A. crassna*. Pada kalus yang ditetesi substansi ekstraseluler (elisitor) *T. paradoxa*, kalus yang tidak menggumpal (meristematik) menghasilkan tiga senyawa gaharu masing-masing satu senyawa pada *A. malaccensis* dengan ekstraksi aseton, dua senyawa pada *A. filaria* dengan ekstraksi eter dan aseton. Dan dari kalus yang menggumpal (non meristematik) menghasilkan satu senyawa gaharu hanya pada *A. filaria* dengan ekstraksi aseton.

Tabel 3. Waktu Retensi (RT) dengan ekstraksi aseton

Spesies	(PE) M	(PE) NM	PP	P-	Standar
<i>Am</i>	1.59	1.61	1.69	2.06	1.62
	1.87*		9.50	7.01	1.96
					3.86
<i>Af</i>	1.63	1.55	1.69	1.59	5.63
	3.86*	5.67	16.27	1.91	7.05
		9.46*	22.25	5.60	9.41
					16.17
<i>Ac</i>	1.59	1.52	5.58	1.59	22.32
			5.66	1.60	

*Senyawa Gaharu hasil induksi elisitor
M: Meristematik
NM: Non Meristematik

dengan menggunakan alat (pinset), mungkin menimbulkan luka. Luka dapat menyebabkan kalus memberikan respon terhadap PE dan PP.

Adapun senyawa senyawa lain yang timbul, mungkin merupakan senyawa gaharu yang terdapat dari kalus itu sendiri atau senyawa gaharu yang dirangsang oleh media produksi.

KESIMPULAN

Pengukuran diameter kalus tidak selalu dapat dijadikan untuk menduga bobotnya pada pertumbuhan kalus.

Pertumbuhan *T. paradoxa* terhambat dengan adanya kalus, sedangkan kalus mengeluarkan cairan putih keruh sebagai reaksi pertahanannya terhadap *T. paradoxa*. Beberapa senyawa gaharu terbentuk dalam kalus yang dikulturkan bersama koloni *T. paradoxa* atau yang ditetesi elisitor (substansi ekstraseluler cendawan) *T. paradoxa*.

SARAN

Faktor-faktor yang mempengaruhi pembentukan senyawa gaharu pada kalus, seperti kondisi kalus yang sebaiknya tetap berada di media tumbuhnya pada saat pemberian elisitor dan masa inkubasi yang optimum bagi pembentukan senyawa gaharu perlu diteliti lebih lanjut. Metode ekstraksi untuk senyawa gaharu pada kalus perlu dibakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bailey, J. 1982. Phytoalexin production *Pisum sativum* in relation to senescence *Ann. Appl. Biol.* 64: 315 - 324.
- Burkill, I. H. 1935. *A dictionary of the economic product of the malay paninsula.* Vol 1. Government of the strait

settlement and Federated Malay State
London. Hal. 197.

Dixon, R. A. 1986. The Phytoalexin response; elicitation, signalling and control of gene host expressio. *Biol. Rev.* 61: 239-291.

Firdausi, M. P. 1998. Transformasi Genetika pada padi (*oryza sativa* L) kultivar Rajalele (Javanica) melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Skripsi. Jurusan Biologi, FMIPA. IPB.

Hamzah, A., M. Suracman., B. Sunyoto dan A. Maryanto. 1993. *Daftar organisme pengganggu tumbuhan yang dilaporkan telah terdapat di dalam wilayah Republik Indonesia*. Pusat Karantina Pertanian, Jakarta. P. 232.

Hanover. J. W. 1966. Environmental variation in the monoterpenes of *Pinus monticola* dougl. *Phytochemistry* 5: 713-717.

Hou, D. 1960. *Thymeleaeceae*. Dalam Van Steenis, C.G.G.J. (Ed). *Flora Malane-siana* Gronigen vol 1; Walters-Noordhoff Publisng. hal:1-48.

Ishihara, M., T. Tsuneya and K. Uniyama. 1991. Guaiane sesquiterpenes from agar-wood. *Phytochemistry*. 30: 3343-3347.

Iwagoe, K., S. Kodama., T. Konishi., S. Kiyosawa., Y. Fujiwara and Y. Shimada. 1987. The structure of AH₁₅ and AH₁₈, New bi- and tri phenylethyl-chromones from agarwood. *Chem. Pharm. Bull.* 30: 4680-4682.

Keen, N. T. and R. Horsch. 1972. Hydroxyphaseollin production by various soyabean tissues: a warning against the use of unnatural host parasite system. *Phytopathology* 62: 439 - 442.

Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assay with Tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Naf, R., A. Velluz., W. Thommen., R. Brauchli., C. Sigwart and J.M. Gaudin. 1993. New compounds identified in agarwood (*Aquilaria agallocha* Roxb) *Flav. Fragr. J.*, 8. 307-313.

Naf, R., A. Velluz., R. Brauchi and W. Thommen. 1995. Agarwood oil (*Aquilaria agallocha* Roxb.), Its composition and eight new valencane, eremophilane and vetispirane derivatives. *Flav. Fragr. J.* 10: 147-152.

Patrick, Z., T. A. Toussoun and H. J. Thorpe. 1965. Germination of chlamydospores of *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology* 55: 466-467.

Peters, S., S. Draeger., H.j. Aust., B. Schulz. 1998. Interaction dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. *Mycologia* 90: 360-367.

Rahman, M. A. and S.K. Khisa. 1980. Agar prouction in agar tree (*A. agallocha* Roxb) by artificial inoculating and wounding. *Bano Biggyan Patrika* 9: 87-93 (Abstract).

Rahman, M. A. and S. K. Khisa. 1984. Agar production in agar tree (*A. agallocha* Roxb) by artificial inoculation and wounding 2. Further evidences in favour organisasi agar formation. *Bano-Biggyan Patrika* 13: 57-63 (abstract).

Rao, B. S. 1975. *Maladies of Hevea in Malaysia*. Rubber Research Institute of Malaysia. Rajiv. Prenters. Kuala Lumpur. Malaysia IX.

Santoso, E. 1996. Pembentukan gaharu dengan cara inokulasi. *Makalah Diskusi Hasil Penelitian Dalam Menunjang Pemanfaatan Hutan yang Lestari*. Penelitian pada litbang hutan dan konservasi alam. Cisarua 11-12 maret, 1996.

- Scuitemaker, J. F. 1933. Het garoehoet Van west Borneo . *Tectona* XXVII: 851-932.
- Suhartono, T. & A. Mardiana. 1997. The current trade in gaharu in West Kali-mantan. *J. Biodiv. Ind.* 1 (1): 1-14.
- Sugiarto, E. 1992. *Spektroskopi dan Kromatografi*. Divisi Pendidikan Dan Pelatihan Laboratorium Analisis Kimia & Fisika Pusat Universitas Gajah Mada.
- Takzi, S. and Richard. 1978. Cerato-Ulmi, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi*; isolation and some properties of Cerato ulmin from the cultural of *C. ulmi*. *Phytopathology* 91: 129-146.
- Umboh, M. I. J., G. Rahayu dan H. Affandi. 1997. Upaya peningkatan produksi gubal gaharu: Mikropropagasi *Aquilaria malaccensis* Lamk. dan jenis kayu gaharu lainnya serta peningkatan bioproses gubal gaharu. Laporan Riset Unggulan Terpadu (1997-1998). Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi Dewan Riset Nasional.
- Van der Plank, J.E. 1978. *Genetic and Molecular Basis of Plant Pathogenesis*. Spinger Verlag. Barlen. Heilenberg. New. York.
- Yang, D., R. S. Jeng and M. Hubbes. 1989. Mansonone accumulation in elm callus induced by elicitor of *Ophistoma ulmi*, and general properties of elicitor. *Can. J. Bot.* 67: 3490-3497.





@Hak cipta milik IPB University

LAMPIRAN

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Lampiran 1

Media Dasar Murashige and Skoog's (MS Dasar), (Murashige & Skoog's, 1962)

Larutan Makro MS	100 ml
Larutan Mikro MS	10 ml
Fe EDTA	10 ml
Vitamin	2 ml
Sukrosa	20 g
Agar (<i>Phytigel</i>)	2 g
pH	5.7

Larutan stok Makro MS (g/l) :

NH ₄ NO ₃	16.5
KNO ₃	19.0
KH ₂ PO ₄	1.7
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7
CaCl ₂ .H ₂ O	4.4

Larutan Mikro MS (mg/l) :

H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ .H ₂ O	1690
ZnSO ₄ .7H ₂ O	860
KI	83
Na ₂ NiO ₄ .2H ₂ O	25
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.5
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5

FeEDTA (g/l) :

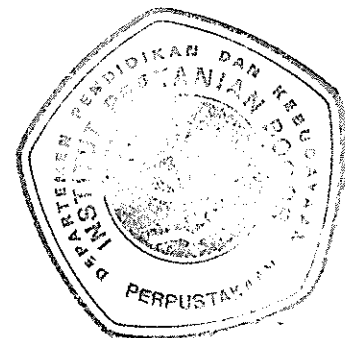
FeSO ₄	2.784
Na ₂ EDTA	3.724

Vitamin (mg/l) :

Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thyamine HCl	0.4

Media MS yang dimodifikasi (untuk 1 liter) :

Makro MS (tanpa NH ₄ NO ₃)	50 ml
Makro MS (75% NH ₄ NO ₃)	50 ml
Mikro MS	10 ml
FeEDTA	10 ml
Vitamin	2 ml
Myo-inositol	100 mg
Casein Hidrolisat	100 mg
BAP	0.5 ml
2.4 D	2.0 ml
Sukrosa	30 g
Agar (<i>phytagel</i>)	2 g
pH	5.7
Glutamin	400 mg



<u>Media MS0</u>	
Makro MS	100 ml
Mikro MS	10 ml
FeEDTA	10 ml
Vitamin	2.0 ml
Myo-inositol	100 mg
Sukrosa	20 g
Agar (<i>Phytigel</i>)	2 g
pH	5.7

Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.