

# PENGARUH JENIS EKSPLAN DAN 2,4-D TERHADAP PERTUMBUHAN DAN KANDUNGAN METABOLIT SEKUNDER KALUS PURWOCENG (*Pimpinella Prutjan* Molk)

Ireng Darwati, GA. Wattimena, Ika Mariska, Latifah K. Darusman

## ABSTRAK

Terbentuknya kalus purwoceng (*Pimpinella prutjan* Molk.) sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan dan zat pengatur tumbuh auksin. Eksplan dengan jaringan yang meristematik akan terbentuk kalus lebih mudah dibanding dengan jaringan yang sudah tua. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan pertumbuhan kalus yang optimal dengan memberikan perlakuan kombinasi eksplan daun dan berbagai konsentrasi 2,4-D yang tepat. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan dua faktor, diulang lima kali. Faktor pertama yaitu jenis eksplan (daun dan petiol), faktor kedua adalah konsentrasi 2,4-D (1 ppm, 3 ppm dan 5 ppm). Total perlakuan terdiri dari enam kombinasi. Eksplan ditanaman pada media DKW yang sudah diberi 2,4-D sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bobot basah dan kering tanaman tidak dipengaruhi oleh kombinasi perlakuan. Kalus eksplan daun mempunyai bobot basah (1,0738 g) dan bobot kering (0,0623 g) lebih tinggi dibandingkan dengan bobot basah (0,3377g) dan bobot kering (0,0177 g) kalus dari eksplan petiol. Pada kalus umur 3 bulan, sitosterol (32,86 ppm) dan stigmasterol (0,0540 ppm) tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan eksplan petiol + 2,4-D 3 ppm, sedangkan bergapten (3,11 ppm) tertinggi dihasilkan pada kombinasi perlakuan eksplan daun + 2,4-D 5 ppm. Kandungan stigmasterol dan bergapten kalus hampir sama dengan kandungan tanaman asal lapang umur 9 bulan (0,051 ppm dan 3,18 ppm), sedangkan kandungan sitosterol tanaman asal lapang (0 ppm)

**Kata kunci :** *Pimpinella prutjan* Molk., kalus, eksplan, 2,4-D, sitosterol, stigmasterol, bergapten.

## PENDAHULUAN

Kalus merupakan massa sel yang tidak berdeferensiasi atau belum terorganisir, terbentuk di sekitar luka atau akibat kerja hormon auksin dan sitokinin. Kalus tersusun atas sel-sel parenkhim (George dan Sherington, 1984; Pierik, 1987).

Berdasarkan perubahan ukuran sel, metabolisme dan penampakan kalus, proses perubahan dari eksplan menjadi kalus dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu induksi, pembelahan dan diferensiasi. Pada tahap induksi, sel siap membelah, metabolisme menjadi aktif dan ukuran sel tetap konstan. Tahap pembelahan, sel aktif membelah atau bersifat meristematik dan terjadi penurunan ukuran sel. Akhir pertumbuhan kalus ditandai dengan peningkatan diferensiasi yang dicirikan dengan pembesaran sel, sel menjadi bervakuola dan penurunan laju pembelahan (Aitchison *et al.*, 1977).

Kultur sel tidak hanya menguntungkan untuk sintesis *de-novo* dari produk alami tetapi juga bertindak sebagai faktor untuk biokonversi dari komponen yang rendah menjadi komponen yang tinggi. Hal ini karena tidak ada atau hanya satu atau lebih gen yang berhubungan dengan enzim biosintesis diekspresikan sangat rendah.

Bentuk kalus dapat dibedakan berdasarkan tekstur dan sifat fisik. Berdasarkan tekstur, kalus dibedakan atas kalus kompak dan kalus friabel. Kalus

kompak yaitu kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang kuat dan keras sedangkan kalus yang terdiri dari sel-sel lepas disebut kalus friabel. Kalus friabel sangat cocok digunakan untuk pertumbuhan sebagai kultur suspensi. Komposisi kimia kalus friabel dan kalus kompak berbeda, kalus kompak mempunyai kandungan polisakarida pada dinding sel yang tinggi, persentase selulosa rendah dibanding dengan pektin dan hemiselulosa. Kandungan selulosa yang tinggi, meningkatkan sel lebih rigid. Pektin yang tinggi, sel lebih kuat dan dapat menahan fragmentasi (Aitchison *et al.*, 1977).

Terbentuknya kalus sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan dan zat pengatur tumbuh. Eksplan dengan jaringan yang meristematik akan terbentuk kalus lebih mudah dibanding dengan jaringan yang sudah tua. Eksplan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan tangkai daun. Eksplan dari daun lebih banyak mengandung senyawa pektat dan protein sedangkan tangkai daun (petiol) lebih banyak mengandung selulosa (Taiz dan Zeiger, 2002).

2,4 Diklorofenoksi-asetat (2,4-D) merupakan auksin sintetis yang dapat berfungsi sebagai zat pengatur tumbuh dan herbisida. Pemberian dengan konsentrasi kecil memberikan respon pertumbuhan yang sama dengan indol asam asetat (IAA) sedangkan pada konsentrasi tinggi berfungsi sebagai herbisida. Pada umumnya pemberian 2,4-D yang berlebihan digunakan untuk mengontrol gulma berdaun lebar. 2,4 Diklorofenoksi-asetat menyebabkan pertumbuhan memanjang terhenti dan perluasan secara radial meningkat. Setelah beberapa hari kemudian terbentuk tumor yang diikuti dengan kematian jaringan (Gianfagna, 1995). Hal tersebut menyebabkan perluasan dan pemanjangan sel tidak terjadi tetapi memicu pembelahan sel. Pembelahan sel yang berlebihan yang tidak diikuti dengan perluasan dan pemanjangan mengakibatkan terbentuknya kalus. Pemberian 2,4-D pada medium dasar kultur *in-vitro* dapat menginduksi pembentukan kalus dan menyebabkan pertumbuhan kalus terus berlangsung (Krikorian, 1995).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D yang tepat agar dapat menghasilkan kalus dengan pertumbuhan dan kandungan metabolit sekunder yang baik.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro) dan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen), Bogor, mulai tahun 2002.

Sumber eksplan berasal dari bahan *in vitro* purwoceng, berada di Kelti BSJ (Biologi sel dan Jaringan) BB Biogen, Bogor dan telah mengalami periode kultur *in vitro* selama 1 tahun pada medium Driver Kuniyuki Walnut (DKW). Sumber eksplan tersebut di subkultur untuk multiplikasi tunas pada medium DKW modifikasi dengan penambahan gula pasir 30 g/l, gelrite 2.5 g/l dan BAP 1 ppm, kemasaman media diatur 5.7. Planlet yang tumbuh dan mempunyai daya multiplikasi yang tinggi diambil tangkai daun dan daunnya sebagai sumber eksplan.

Eksplan daun dan tangkai daun (petiol) ditanam pada media DKW sesuai perlakuan selama 2.5 bulan. Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan dua faktor. Faktor pertama yaitu jenis eksplan (daun dan petiol), faktor kedua adalah konsentrasi 2,4-D (1 ppm, 3 ppm dan 5 ppm). Setiap perlakuan terdiri dari lima ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 1 botol sehingga total satuan percobaan 30 botol. Botol kultur disimpan di rak dalam ruangan dengan suhu 16-18<sup>0</sup>C dan diberi penyinaran lampu TLD 80 watt. Penyinaran pada kultur kalus untuk periode terang dan gelap diatur dengan timer. Periode terang diberikan selama 16 jam dan gelap selama 8 jam.

Analisis kandungan metabolit sekunder, pertama-tama kalus yang telah dipanen dikeringkan dengan *freeze dryer* selama 6 jam atau sampai beratnya konstan. Kalus yang telah kering dengan mortar kemudian diekstraksi dengan metanol 99 % selama 24 jam. Ekstrak tersebut disaring dengan kertas saring whatman kemudian ekstrak dimasukkan dalam kolom yang berisi silika gel G 60 GF<sub>254</sub>. Ekstrak yang telah dilewatkan dalam silika gel dianalisis dengan GCMS.

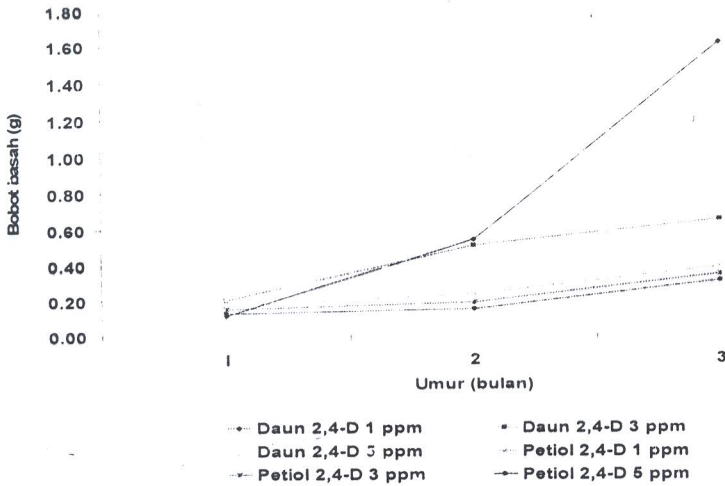
Hasil analisis kuantitatif dapat diperoleh berdasarkan ukuran luas area komponen yang dianalisis dibanding dengan besarnya luas area dari standar yang telah diketahui konsentrasinya.

Pengamatan pertumbuhan dilakukan dengan menimbang berat basah setiap bulan selama 3 bulan. Secara visual diamati warna kalus dan tipe kalus. Analisis metabolit sekunder dikerjakan pada umur 3 bulan yaitu melihat kandungan sitosterol, stigmasterol, bergapten. Sebagai pembanding dianalisis metabolit sekunder herba purwoceng asal lapang umur 9 bulan.

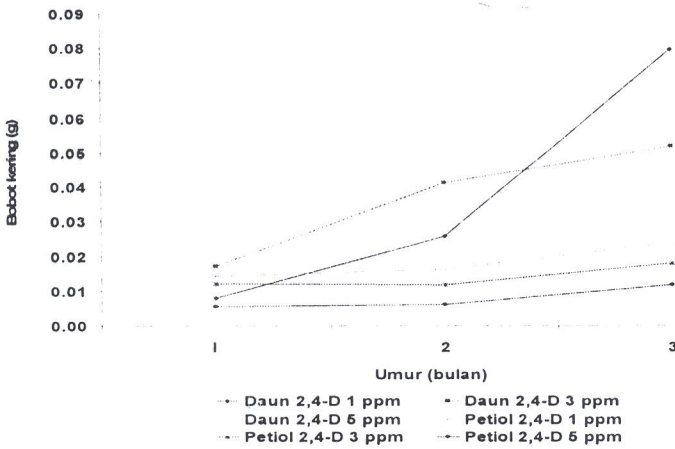
Bobot basah, bobot kering dan kandungan metabolit sekunder dari hasil percobaan dianalisis sidik ragam dengan selang kepercayaan 95%. Apabila perlakuan berpengaruh nyata dilakukan analisis lanjut dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan tanaman yang dicerminkan pada bobot basah dan bobot kering dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2. Penambahan bobot basah dan bobot kering terlihat meningkat terus sampai umur 3 bulan. Pada umur 2 bulan, laju peningkatan bobot basah dan bobot kering terlihat lebih cepat pada perlakuan daun + 2,4-D 1 ppm; daun + 2,4-D 3 ppm serta daun + 2,4-D 5 ppm dibanding perlakuan petiol + 2,4-D 1 ppm; petiol + 2,4-D 3 ppm serta petiol + 2,4-D 5 ppm. Selanjutnya pada umur 3 bulan bobot basah dan kering yang tertinggi dihasilkan pada perlakuan daun + 2,4-D 1 ppm diikuti oleh perlakuan daun + 2,4-D 5 ppm serta daun + 2,4-D 3 ppm.



Gambar 1. Bobot basah kalus pada kombinasi perlakuan asal eksplan dan 2,4-D



Gambar 2. Bobot kering kalus pada kombinasi perlakuan asal eksplan dan 2,4-D

Tabel 1 menunjukkan bahwa persentase pembentukan kalus tertinggi didapat pada perlakuan daun + 2,4-D 3 ppm serta petiol + 2,4-D 1 ppm masing masing 60%. Sedangkan daun + 2,4-D 5 ppm serta petiol + 2,4-D 5 ppm persentase pembentukan kalus paling rendah (30%). Kadar air semua perlakuan diatas 90% dan tekstur kalus remah. Warna kalus untuk perlakuan daun semuanya berwarna putih kekuningan sedangkan perlakuan petiol daun berwarna putih kecoklatan. Hal ini diduga karena eksplan petiol banyak mengandung selulosa dan juga fenol yang tinggi sehingga kalus berwarna coklat. Selulosa dan fenol yang tinggi menyebabkan pembelahan sel terhambat yang mengakibatkan laju pertumbuhan berkurang meskipun diberi ZPT (Gambar 1 dan Gambar 2).

Tabel 1. Persentase tumbuh kalus (%), kadar air kalus (%), tekstur kalus dan warna kalus pada umur 3 bulan

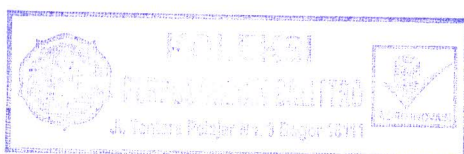
Perlakuan	Persentase tumbuh kalus (%)	Kadar air (%)	Tekstur kalus	Warna kalus
Eksplan daun, 2,4-D 1 ppm	40	95,03	Remah	Putih kekuningan
Eksplan daun, 2,4-D 3 ppm	60	91,93	Remah	Putih kekuningan
Eksplan daun, 2,4-D 5 ppm	30	94,32	Remah	Putih kekuningan
Eksplan petiol, 2,4-D 1 ppm	60	93,69	Remah	Putih kecoklatan
Eksplan petiol, 2,4-D 3 ppm	40	94,73	Remah	Putih kecoklatan
Eksplan petiol, 2,4-5 ppm	30	96,11	Remah	Putih kecoklatan

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa interaksi perlakuan jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D tidak berpengaruh terhadap bobot basah dan kering kalus. Bobot basah dan kering hanya dipengaruhi oleh faktor tunggal jenis eksplan atau konsentrasi 2,4-D. Pada Tabel 2 terlihat bahwa bobot basah kalus asal eksplan daun lebih baik dari pada eksplan petiol. Bobot basah asal daun (1,0738 g) lebih besar dan berbeda nyata dibanding bobot basah eksplan petiol (0,3377) g. Demikian pula pada bobot kering asal daun (0,0623 g) lebih besar dan berbeda nyata dengan asal petiol (0,0177). Kalus asal eksplan daun mempunyai bobot basah 2,18 kali lebih besar dibanding asal petiol dan bobot kering kalus asal eksplan daun 2,52 kali lebih besar dibanding asal petiol. Penelitian yang dilakukan oleh Slusarkiewicz-Jarzina *et al.* (2005) menunjukkan bahwa kalus *Canabis sativa* kultivar silesia asal eksplan daun lebih baik dibanding dengan eksplan petiol, persentase pembentukan kalus secara berurutan adalah 75,1% dan 34,2%.

Tabel 2. Pengaruh asal eksplan dan 2,4-D terhadap bobot basah dan bobot kering kalus pada umur 3 bulan

Bobot basah kalus (g)				
	2,4-D 1 ppm	2,4-D 3 ppm	2,4-D 5 ppm	Rata-rata asal eksplan
Eksplan daun	1,5856	0,6388	0,9972	<b>1,0738 a</b>
Eksplan petiol	0,3778	0,3371	0,2981	0,3377 b
Rata-rata auksin	0,9817	0,4880	0,6476	
Bobot kering kalus (g)				
	2,4-D 1 ppm	2,4-D 3 ppm	2,4-D 5 ppm	Rata-rata Asal eksplan
Eksplan daun	0,0789	0,0515	0,0566	0,0623 a
Eksplan petiol	0,0258	0,0178	0,0116	0,0177 b
Rata-rata auksin	0,0514	0,0346	0,0341	

Keterangan : angka yang diikuti huruf yang sama dalam satu kolom dan satu baris yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5 %

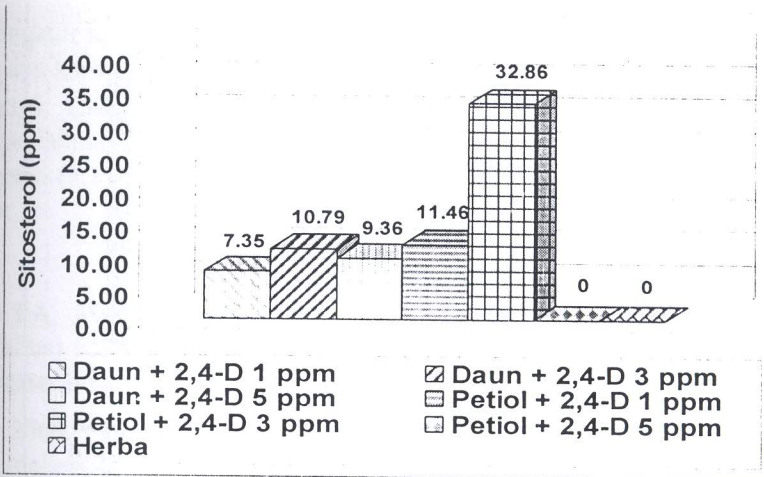


Daun muda banyak mengandung IAA dan sukrosa dibanding petiol, IAA diperlukan untuk pembelahan sel sehingga meningkatkan pembentukan kalus. Dinding sel pada daun muda kandungan selulosanya lebih rendah dibanding petiol (Salisbury dan Ross, 1992). Dinding sel dengan selulosa yang tinggi menyebabkan kecepatan pembelahan sel berkurang yang mengakibatkan pertumbuhan kalus lambat.

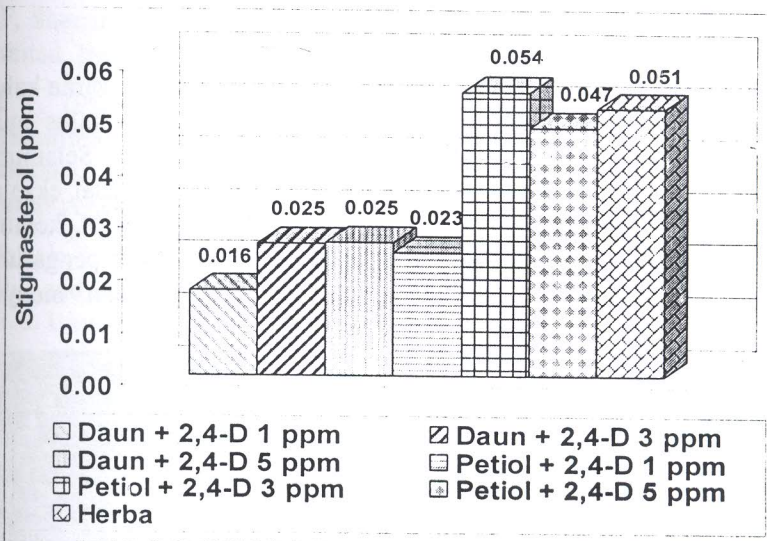
Pengaruh faktor tunggal konsentrasi 2,4-D tidak berbeda nyata terhadap bobot basah dan bobot kering umur 3 bulan (Tabel 2). Perlakuan 2,4-D 1 ppm memberikan hasil tertinggi dibanding perlakuan 2,4-D 3 ppm dan 5 ppm. Penelitian yang dilakukan oleh Gopi dan Vatsala (2006) menunjukkan bahwa bobot basah dan kering kalus *Gymnema sylvestre* R. Br. umur 7 minggu yang diberi perlakuan 2,4-D 1 ppm (146,12 g/l dan 8,02 g/l) lebih tinggi dibanding dengan 2,4-D 2,5 ppm (105,57 g/l dan 6,01 g/l) dan 2,4-D 5 ppm (8,02 g/l dan 4,28 g/l). Berbeda pada tanaman *Rauwolfia serpentina* L, bobot basah umur 4 bulan yang lebih tinggi dihasilkan pada perlakuan 2,4-D 3 ppm (5,155 g) dibanding dengan perlakuan 2,4-D 1 ppm (3,295 g) dan 2,4-D 5 ppm (3,581 g) (Purwijiyanti, 2001). Pemberian 2,4-D secara tunggal tidak memberikan pengaruh yang nyata pada pertumbuhan kalus purwoceng, hal ini terlihat bahwa 2,4-D tidak berpengaruh nyata terhadap bobot basah dan kering kalus. Pertumbuhan yang baik diperlukan adanya keseimbangan antara zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin (Gaba, 2000). Adanya sitokinin dapat meningkatkan daya aktifitas auksin dalam memacu pembelahan sel untuk membentuk kalus. Auksin berperan dalam pembesaran sel, sedangkan sitokinin merangsang pembelahan sel.

Kandungan metabolit sekunder sitosterol pada perlakuan daun dengan berbagai konsentrasi 2,4-D menunjukkan hasil yang hampir sama berkisar antara 7-10 ppm. Pada eksplan petiol yang dikombinasikan dengan 2,4-D memberikan respon yang berbeda, perlakuan petiol + 2,4-D 3 ppm memberikan hasil tertinggi yaitu 32,86 ppm. Sedangkan petiol + 2,4-D 5 ppm tidak mengandung sitosterol sama seperti herba dari tanaman asal lapang (Gambar 3).

Kandungan stigmasterol yang dihasilkan pada kalus dan herba dapat dilihat pada Gambar 4. Kalus dari daun yang dikombinasikan dengan berbagai konsentrasi 2,4-D menghasilkan kandungan stigmasterol yang tidak banyak berbeda (0,01-0,025) ppm. Respon perlakuan petiol dengan berbagai kombinasi 2,4-D lebih bervariasi terhadap kandungan stigmasterol. Pada perlakuan petiol + 2,4-D 3 ppm serta petiol + 2,4-D 5 ppm kandungan stigmasterol yang dihasilkan hampir sama (0,04-0,05) ppm, sedangkan petiol + 2,4-D 1 ppm lebih rendah yaitu 0,0232 ppm. Herba asal lapang menghasilkan kandungan stigmasterol yang tinggi  $\pm 0,0510$  ppm.

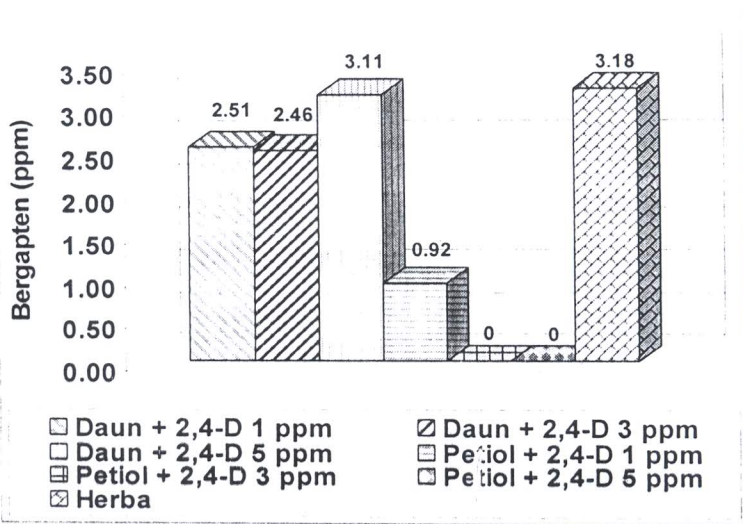


Gambar 3. Kandungan sitosterol



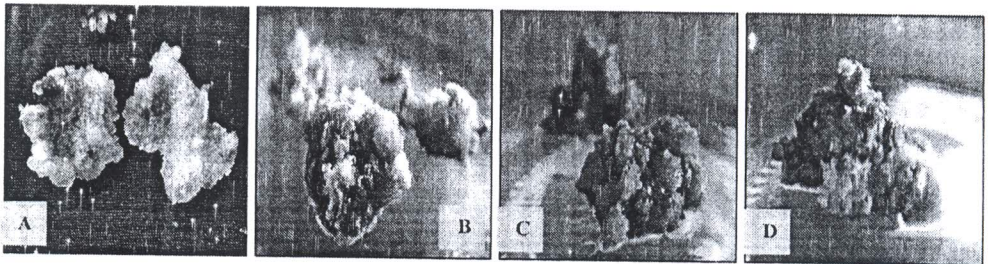
Gambar 4. Kandungan stigmasterol

Kandungan bergapten kemungkinan dapat mempengaruhi kandungan sitosterol atau stigmasterol karena lintasan biosintesis terbentuknya sama melalui lintasan mevalonat. Pada Gambar 5 menunjukkan bahwa kandungan bergapten pada perlakuan daun dengan kombinasi berbagai konsentrasi hampir sama antara 2-3 ppm. Petiol + 2,4-D menghasilkan bergapten yang bervariasi yaitu petiol + 2,4-D ppm menghasilkan 0,92 ppm sedangkan petiol + 2,4-D 3 ppm serta petiol + 2,4-D 5 ppm kandungan bergapten 0 ppm. Kandungan bergapten herba asal tanaman lapang 3,18 ppm.



Gambar 5. Kandungan bergapten

Pembentukan kalus asal daun dan petiol, terlihat bahwa warna kalus petiol lebih coklat dibanding asal daun (Gambar 6). Pembentukan kalus mula-mula terlihat adanya pembengkakan pada semua permukaan eksplan. Selanjutnya sel-sel membelah dan kalus tumbuh membesar. Pembelahan sel asal eksplan daun lebih cepat dibandingkan dengan pembelahan asal eksplan petiol, kemungkinan disebabkan petiol lebih banyak mengandung selulosa yang mempengaruhi dalam pembelahan sel sehingga pembelahan sel lebih lambat dan menyebabkan pertumbuhan menurun.



Gambar 6. Kalus dari eksplan yang berbeda A) dan B) Kalus asal eksplan daun; C) dan D) kalus asal eksplan petiol

### KESIMPULAN

- Kombinasi perlakuan antara jenis eksplan dan konsentrasi 2,4-D tidak berpengaruh nyata interaksinya terhadap bobot basah dan bobot kering. Pertumbuhan kalus hanya dipengaruhi oleh faktor tunggal.
- Kalus asal eksplan daun mempunyai bobot basah (1,0738 g) dan kering (0,0623 g) tertinggi.

- Zat pengatur tumbuh 2,4-D tidak memberikan pengaruh nyata terhadap bobot basah dan kering.
- Sitosterol (32,85 ppm) dan stigmasterol (0,05 ppm) tertinggi diperoleh pada perlakuan petiol dengan 2,4-D 3 ppm.
- Bergapten (3,11 ppm) tertinggi dihasilkan pada perlakuan daun dengan 2,4-D 5 ppm.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Aitchison PA, Macleod AJ, Yeoman MM. 1977. Growth patterns in tissue (Callus) culture. Di dalam Street HE, editor. Plant tissue and cell culture culture. Ed ke-2. London : Blackwell Scientific, 267-307.
- Gaba VP. 2000. Plant growth regulator in plant tissue culture and development. Di dalam Trigiano RN dan Gray DJ., editor. Plant development and biotechnology. New York: CRC Pr., 87-99.
- George EF, Sherrington PD. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Limited. Basingstoke.
- Gianfagna T. 1995. Natural and synthetic growth regulator and their use in horticultural and agronomic crops. Di dalam Davies, PJ., editor. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. London : Kluwer Acad, 751-773.
- Gopi C, Vatsala TM. 2006. Invitro studies on effect of plant growth regulators on callus and suspension cultur biomass yield from *Gymnema sylvestre* R Br. Afr. J. Biotechnol, 5 (12) : 1215-1219.
- Krikorian AD. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. di Dalam Davies PJ, editor. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. London : Kluwer Acad, 774-792.
- Pierik RLM. 1987. In-vitro culture of higher plants. Dordrecht: Martinus Nijhoff .
- Purwijiyanti. 2001. Penentuan konsentrasi 2,4-D dan BAP terbaik dalam pembentukan kalus *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth.ex Kurz serta pengaruhnya terhadap kadar reserpin [Tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia, Fak. MIPA jurusan Biologi.
- Salisbury FB, Ross CW. 1992. Fisiologi Tumbuhan. Lukman DR, Sumaryono, penerjemah; Niksolihin S, editor. Bandung: Penerbit ITB. Terjemahan dari Plant physiology.
- Slusarkiewicz-Jarzina A, Ponitka A, Kaczmarek Z. 2005. Influence of cultivar, eksplant source and Plant Growth Regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. Acta Biologica Cracoviensia series Botanica 47 (2) : 145-151
- Taiz L, Zeiger E. 2002. Plant physiology. Third edition. USA: Sinauer.