

PENGARUH BA (*BENZIL ADENIN*), ABA (*ABSISIC ACID*) DAN MANITOL TERHADAP PERTUMBUHAN DAN PENYIMPANAN TUNAS SAMBANG COLOK (*Aerva* *sanguinolenta*) SECARA IN VITRO

Amalia, Nursalam dan N. Nova Kristina

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

ABSTRAK

Penelitian pengaruh zat pengatur tumbuh dan manitol terhadap pertumbuhan dan penyimpanan *in vitro* tanaman sambang colok (*Aerva sanguinolenta*) telah dilakukan di laboratorium Plasma Nutfah dan Pemuliaan Balitro, mulai Nopember 2003 sampai dengan Februari 2004. Penelitian terdiri atas dua tahap. Tahap satu adalah perbanyakan tanaman dan tahap kedua adalah penyimpanan pada media penghambat. Media perlakuan untuk perbanyakan adalah MS + BA (0,1, 0,3 dan 0,5) mg/l dan media penyimpanan yang digunakan adalah MS + BA 0,1 mg/l, MS + ABA (1 dan 2) mg/l, MS + Manitol 3 dan 5%. Kedua kegiatan penelitian dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap faktor tunggal, setiap perlakuan terdiri atas 10 botol dan setiap botol terdiri atas 2 eksplan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media terbaik untuk perbanyakan tunas sambang colok adalah MS + BA 0,1 mg/l dengan jumlah tunas rata-rata 9,1 per eksplan. Untuk media penyimpanan perlakuan yang terbaik adalah MS + ABA 1 mg/l dengan jumlah tunas rata-rata 1,5 per eksplan dan tinggi tunas 2,9 sampai masa penyimpanan 32 minggu.

Effect of BA (Benzil Adenin), ABA (Absisic Acid) and manitol on the growth and conservation of Aerva sanguinolenta

ABSTRACT

Effect of growth regulator and manitol on the shoot growth in the in vitro propagation and conservation of Aerva sanguinolenta were studied in the laboratory of Breeding and Gremplasm of Indonesian Spice and Medicinal Crops Research Institute, from November 2003 to February 2004. The research consists of two steps. The first step was plant multiplication. The media for multiplication were MS treated with BA at the concentration of 0,1; 0,3 or 0,5 mg/l. The second step was conservation and the media tested were MS + ABA (1 and 2 mg/l) or + Manitol (3 and 5%). The treatments of the two experiment were arranged single factor of completely randomized design with 10 replications for the first step and 10 replication for the second. Results showed that the best medium for multiflication was MS + BA 0,1 mg/l, producing an average number of shoots of 9,1, while those for in vitro conservation was MS + ABA 1 mg/l, where the average number of shoots was 1,5 with a height of 2,9 cm until a conservation period of 32 weeks.

PENDAHULUAN

Tanaman sambang colok (*Aerva sanguinolenta*) merupakan salah satu tanaman obat terna yang daunnya digunakan untuk mengatasi penyakit pada wanita, yakni haid tidak teratur dan rasa nyeri, keputihan dan radang rahim. Di samping itu juga digunakan untuk mengatasi kencing nanah, kencing tidak lancar, ginjal dan kurang darah (Essai, 1986). Penelitian untuk tanaman ini masih sangat kurang dilakukan, sementara tanaman ini termasuk salah satu tanaman obat potensial yang patut dikembangkan.

Sebagai salah satu sumber plasma nutfah, tanaman ini dikoleksi di kebun-kebun percobaan lingkup Balitro, antara lain di Kebun Percobaan Sukamulya dan Cimanggu. Dalam kondisi ini sering terjadi kehilangan genotipe antara lain karena faktor lingkungan yang tidak aman dan memerlukan tenaga dan biaya yang cukup besar untuk pemeliharannya. Kultur *in vitro* merupakan salah satu yang dapat dimanfaatkan untuk konservasi. Teknik ini berguna untuk memperbanyak secara cepat, dan tanaman akan bebas dari hama dan penyakit sehingga penting artinya bagi pemulia tanaman (Chee *et al.*, 1992). Penambahan zat pengatur tumbuh ke dalam media merupakan salah satu faktor yang sangat mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan. Pada umumnya media perbanyakan secara *in vitro* menggunakan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin, seperti BA yang merupakan salah satu zat pengatur tumbuh yang banyak

digunakan untuk memacu pembentukan tunas dengan daya aktivitas yang kuat mendorong proses pembelahan sel (George and Sherrington, 1984).

Penyimpanan secara *in vitro* perlu didukung oleh beberapa komponen teknologi seperti formulasi media dasar, zat pengatur tumbuh, lingkungan tumbuh, jenis eksplan dan kemampuannya beregenerasi. Pemilihan media yang tepat merupakan kunci keberhasilan dalam teknik *in vitro* (Gati dan Mariska, 2001). Penyimpanan secara *in vitro* dapat dilakukan secara sederhana dengan melakukan subkultur berulang pada media perbanyakan, atau menggunakan media yang mengandung zat penghambat tumbuh, seperti ABA (Absisic acid) dan gula alkohol (sorbitol dan manitol), paclobutrazol, cycocel, dan lain-lain. ABA salah satu jenis inhibitor yang menghambat aktivitas auksin dan mendukung dormansi, absicision dan sencescence (Abidin, 1989). Pada tanaman pule pandak (*Rauvolfia serpentina*) digunakan media MS ditambahkan ABA 1 mg/l (Mariska dan Seswita, 1994). Penyimpanan dapat juga dilakukan dengan cara penurunan kandungan unsur hara, umumnya dilakukan dengan mengurangi konsentrasi garam-garam anorganik menjadi 0,5 sampai 0,1 dari formulasi media dasar (Gati dan Mariska, 2001). Penyimpanan dengan menggunakan manitol telah dilaporkan oleh Unnikrishnan *et al.* (1992) dan mampu menghambat pertumbuhan pada tanaman ubi kayu. Penelitian ini bertujuan untuk mencari komposisi

media yang tepat untuk memperbanyak dan penyimpanan tanaman sambang colok secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Plasma Nutfah dan Pemuliaan-Balittro, dari bulan Nopember 2003 sampai dengan Februari 2004. Penelitian terdiri atas dua tahap yakni 1) tahap memperbanyak dan 2) tahap penyimpanan.

Perbanyak/multiplikasi

Bahan tanaman yang digunakan berasal dari kebun percobaan Sukamulya. Tunas diambil sepanjang 1,5 cm dan disterilisasi dengan menggunakan air mengalir, sabun, alkohol 70% selama 5 menit, kloroks 20% selama 10 menit, cloroks 10% selama 5 menit dan betadine selama 15 menit. Bahan tanaman yang telah steril selanjutnya dikulturkan pada media MS yang diperkaya dengan zat tumbuh untuk memacu pertumbuhan bahan tanaman. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan perlakuan yaitu 1) MS + BA 0,1 mg/l, 2) MS + BA 0,3 mg/l dan 3) MS + BA 0,5 mg/l. Kedalam setiap botol dimasukkan 2 tunas yang telah steril, masing-masing perlakuan ini terdiri atas 10 botol. Botol yang telah terisi tunas steril selanjutnya disimpan pada rak kultur dan mendapat intensitas cahaya sebesar 1000 lux selama 16 jam/hari. Perlakuan tersebut diatas merupakan kultur awal (V_0). Selanjutnya untuk melihat kemampuan eksplan bermultiplikasi dengan baik,

maka tunas kembali disubkultur pada media yang sama, dan ini dianggap subkultur pertama (V_1) Suhu udara di dalam ruangan kultur berkisar 18°C. Pengamatan dilakukan setiap 8 minggu terhadap jumlah tunas yang hidup, tinggi tunas dan kelainan-kelainan yang terjadi.

Penyimpanan tunas

Setelah diperoleh jumlah tunas yang cukup pada perlakuan terbaik dan jumlah serta tinggi/umur tunas telah mencukupi, selanjutnya tunas mendapat perlakuan penyimpanan. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan perlakuan penyimpanan yang diuji adalah 1) MS + BA 0,1 mg/l (kontrol), 2) MS + ABA 1 mg/l, 3) MS + ABA 2 mg/l, 4) MS + Manitol 3%, 5) MS + Manitol 5%. Tunas dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan setiap tabung terisi 1 tunas. Masing-masing perlakuan terdiri atas 10 tabung dengan 2 ulangan. Tabung yang telah terisi tunas selanjutnya disusun dalam rak tabung dan rak kultur dengan mendapat intensitas cahaya 1000 lux selama 16 jam/hari dengan suhu berkisar 18°C. Pengamatan dilakukan setiap 4 minggu terhadap jumlah tunas, tinggi tunas, persentase tunas hidup dan visualisasi tunas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Multiplikasi tunas

Respon tunas sambang colok terhadap media multiplikasi tunas cukup baik, pada minggu kedua tunas telah terinisiasi membentuk tunas-tunas baru. Sampai dengan minggu ke - 8

pada kultur awal (Vo) didapat rata-rata tunas terbanyak mencapai 4.15 pada media MS + BA 0,1 mg/l (Tabel 1), meskipun tidak berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Pengaruh media terhadap perlakuan tunas mulai terlihat setelah subkultur pertama (V1), yakni antar perlakuan berpengaruh nyata. Media multiplikasi tunas yang terbaik adalah media MS + BA 0,1 mg/l. Diduga pada fase ini, zat tumbuh BA mulai aktif merangsang inisiasi dan pemanjangan tunas-tunas baru.

Tanggap tanaman pada media perbanyakannya berbeda-beda pada beberapa spesies. Pada pule pandak (*Rauvolfia serpentina*), tunas ganda paling banyak didapat pada media MS + BA 0,8 mg/l dengan jumlah tunas rata-rata 14,2/eksplan (Gati dan Mariska, 2001), sementara pada purwoceng (*Pimpinella pruatjan*) jumlah tunas 5 buah/eksplan pada media MS + BA 5 mg/l (Mariska *et al.*, 1991).

BA merupakan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin yang banyak digunakan untuk memacu proliferasi tunas (Zaer dan Mapes, 1982). Pada awal kultur (Vo), daun dan batang biakan berwarna merah, tetapi setelah subkultur pada media yang sama (V1) penampilan tunas berubah, di mana tunas pada media yang mengandung BA 0,3 dan BA 0,5 terlihat adanya vitrifikasi dan daun merah pucat. Dua minggu setelah subkultur pada media yang sama, belum terlihat perubahan. Memasuki minggu keempat, sebagian daun dan batang bagian bawah mulai berubah warna menjadi hijau. Memasuki minggu keenam selain tunas-tunas berwarna merah, tunas-tunas yang baru muncul terlihat berwarna hijau dan pada minggu kedelapan terlihat ada dua kumpulan tunas yang berwarna merah dan hijau. Sementara warna tunas pada media MS + BA 0,1 mg/l tidak berubah.

Tabel 1. Rata-rata jumlah dan tinggi tunas sambang colok pada kultur awal (Vo) dan subkultur 1 (V1)

Table 1 Average number and height of shoots in 1st culture (Vo) and subculture 1 (V1)

No	Perlakuan Treatment	Jumlah tunas Pada kultur awal 8 mgg (Vo) <i>Number of shoots in 1st subculture (Vo) 8 weeks</i>	Jumlah tunas pada subkultur 1 (V1) 8 mgg <i>Number of shoots in subculture 1 (V1) 8 weeks</i>	Tinggi tunas pada subkultur awal (cm) (Vo) <i>Height of shoots in 1st subculture (Vo)</i>	Tinggi tunas pada subkultur awal (cm) (V1) <i>Height of shoots in 1st culture (cm) (V1)</i>
1.	MS + BA 0.1 mg/l	4,15 a	9,10 a	5,73 a	5,55 a
2.	MS + BA 0.3 mg/l	3,70 a	5,25 b	5,25 a	6,215 a
3.	MS + BA 0.5 mg/l	3,45 a	5,00 b	4,765 a	5,38 b
	KK/ CV (%)	23,88	30,65	23,35	12,91

Diduga terjadi ketidak stabilan pigmen pada media perbanyak kultur yang disimpan dengan cara subkultur secara periodik (Gambar 1).



Gambar 1. Penampakan tunas yang berubah warna

Dari hasil pengamatan selanjutnya terlihat bahwa perubahan yang terjadi pada akhirnya bersifat permanen, tunas pada seluruh kultur terlihat berwarna hijau. Hal ini terjadi diduga berkaitan dengan produksi pigmen antosianin lebih tinggi dari pada pembentukan klorofil pada tahap awal kultur. Namun seiring dengan perjalanan waktu dan periode kultur, produksi klorofil meningkat sementara produksi pigmen antosianin menurun. Pemberian ABA dan Manitol nyata menghambat pertumbuhan tunas in vitro.

Penyimpanan

Biakan yang dikultur pada media MS + ABA (1 dan 2 mg/l) dan MS + Manitol (3% dan 5%) terhambat pertumbuhannya bila dibandingkan dengan kontrol (MS + BA 0,1 mg/l). Persentase tumbuh tunas berkurang seiring dengan periode waktu. Pada media MS + ABA 1 mg/l dan MS + BA 0,1 mg/l menunjukkan bahwa tunas masih bertahan hidup, masing-masing adalah 85% dan 80%. Kematian tunas tertinggi terlihat pada media yang mengandung Manitol 5% sampai minggu ke 32. Tunas menguning dan akhirnya layu dan berwarna kecoklatan (Tabel 2). Santoso dan Herman (1997) melaporkan bahwa pemberian manitol 1 - 6% pada tanaman ubi kayu dapat menghambat pertumbuhan tinggi tanaman, panjang dan jumlah akar pada masa simpan delapan minggu. Lebih jauh Sunarlin dan Zuraida (2001) menyatakan bahwa penyimpanan pada media MS + manitol 2 dan 4% sampai masa simpan enam bulan, persentase daun hijau berkisar 60%.

Tabel 2. Persentase eksplan yang hidup pada masa penyimpanan
Table 2. Number of living explant (%) during storage

No.	Perlakuan <i>Treatment</i>	% hidup minggu ke/ <i>living explant (%) at – weeks</i>							
		4	8	12	16	20	24	28	32
1	MS + BA 0,1 mg/l (kontrol)/ <i>control</i>	100	100	100	100	100	100	85	80
2	MS + ABA 1 mg/l	100	100	95	95	90	90	90	85
3	MS + ABA 2 mg/l	100	100	80	80	75	65	55	55
4	MS + Manitol 3%	100	75	60	55	45	45	30	30
5	MS + Manitol 5%	90	70	55	45	35	30	15	15

Pada penelitian ini penampakan tunas terlihat dua warna yakni merah dan hijau pada batang dan daun. Kadangkala dalam satu tunas batang dan daun bagian bawah berwarna merah dan daun dan batang bagian atas berwarna hijau. Bila dikaitkan dengan persentase tumbuh, maka media penyimpanan yang terbaik untuk sambang colok adalah MS + ABA 1 mg/l dengan jumlah tunas rata-rata 1,5 dan sampai dengan minggu ke - 32 dan dapat hidup sekitar 85%. Penyimpanan dengan MS + Manitol 3 dan 5% keberhasilan tumbuhnya sangat rendah dan sampai dengan minggu ke - 32 yang mampu bertahan hanya 30 dan 15%, kondisi tunas saat itu telah menunjukkan gejala-gejala kematian yakni memperlihatkan penampakan menguning pada bagian atas, pucuk dan batang, dan akhirnya layu. Pengolahan data dilakukan sampai dengan minggu ke - 20, sebab pada minggu di atas itu persentase kematian tunas sangat tinggi (Tabel 3). Jumlah tunas antar perlakuan berbeda nyata dengan kontrol (MS + BA 0,1 mg/l), tetapi antar perlakuan media penyimpanan tidak berbeda nyata. Jumlah tunas pada media MS + ABA 1 mg/l adalah yang terbanyak sekitar 1,5 dan terendah pada media MS + Manitol 5%, sekitar 0,45 selama 20 minggu. Untuk tinggi tunas media MS + ABA 1 mg/l juga merupakan yang terbaik karena didapat tunas dengan tinggi 2,9 cm dan terendah 0,8 cm pada media MS + Manitol 5% selama 20 minggu.

Tunas-tunas yang tumbuh baik pada penyimpanan MS dengan ABA

maupun pada media MS + BA 0,1 mg/l, memperlihatkan gejala yang sama dengan saat dikultur pada media perbanyakan/multiplikasi yakni perubahan warna tunas menjadi hijau. Belum diketahui apakah perubahan ini bersifat permanen atau sementara.

Umumnya tunas yang disimpan pada media MS yang mengandung ABA ataupun Manitol mampu tumbuh normal kembali, seperti pada tanaman pule pandak (*Rauvolfia serpentina*) yang disimpan pada media MS + ABA mampu beregenerasi kembali, demikian juga dengan ingu (*Ruta angustifolia*) yang disimpan pada media mengandung MS + manitol (Husni, 1977). Bahkan menurut Gati dan Mariska, (2001), penyimpanan dengan pembekuan dalam nitrogen cair tidak mengurangi kemampuan tunas untuk beregenerasi secara *in vitro*. Penelitian ini belum sampai pada tahap pengujian hasil penyimpanan tunas.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan 1) media perbanyakan *in vitro* yang terbaik untuk sambang colok adalah MS + BA 0,1 mg/l dengan jumlah tunas rata-rata 9,1/eksplan selama 8 minggu. 2) Untuk penyimpanan *in vitro*, media MS + retardan ABA 1 mg/l merupakan yang terbaik, dan dapat menghambat pertumbuhan tunas menjadi 1,5/eksplan dengan masa simpan 32 minggu. 3) Terjadi ketidakstabilan pigmen baik pada media perbanyakan maupun penyimpanan. Perlu diteliti lebih jauh pengaruh kultur *in vitro* terhadap perubahan genetik pada tanaman.

Tabel 3. Rata-rata jumlah dan tinggi tunas sambang colok pada media penyimpanan
 Table 3. *Average of number and height of shoot at conservation medium*

No	Media perlakuan MS + <i>Treatments of MS +</i>	Jumlah tunas/mgg (<i>Number of shoot/week</i>)					Tinggi tunas (cm)/mgg (<i>Height of shoot/week</i>)				
		4	8	12	16	20	4	8	12	16	20
1	BAP 0.1 mg/l	4,25a	5,3 a	6,4a	7,20a	9,85a	2,02a	2,69a	3,18a	3,53a	4,9a
2	ABA 1 mg/l	1,65b	1,75b	1,65b	1,55b	1,50b	1,75ab	2,02ab	2,24ab	2,49b	2,9b
3	ABA 2 mg/l	1,15b	1,10c	1,00c	0,75c	1,0 b	1,7ab	2,11ab	2,16abc	2,21bc	2,4b
4	Manitol 3%	1,05b	0,8 c	0,6 c	0,50c	0,55b	1,68ab	1,51bc	1,39bc	1,36cd	1,35c
5	Manitol 5%	1,0 b	0,8 c	0,6 c	0,50c	0,45b	1,54b	1,17c	1,17c	1,13d	0,8c
	KK(CV)%	40,65	35,71	25,43	37,86	49,14	15,96	32,58	40,59	39,71	38,33

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z., 1989. Dasar-dasar pengetahuan tentang zat pengatur tumbuh. Penerbit. Angkasa-Bandung. 85 h.
- Chee, R.P., J.R. Schultheis and D.J. Cantliffe, 1992. Micropropagation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. 19 107 - 117
- Essai, 1986. Medicinal Herbs Index in Indonesia. PT Essai Indonesia. 428 h.
- Gati, E. dan I. Mariska, 2001. Perbanyakan dan penyimpanan tanaman *Raufolevia serpentina* secara in vitro. Buletin Plasma Nutfah Vol 7 No.1 (40 - 45).
- George, F and PD. Sherrington, 1984. Plant propagation by tissue culture. Eastern Press, Reading, Berks, England, 709 p.
- Husni, A., 1997 Perbanyakan dan penyimpanan inggu melalui kultur jaringan. Bul. Plasma Nutfah 11 9 - 13.
- Mariska, I., E. Gati dan D. Sukmadjaya, 1991 Upaya pelestarian tumbuhan obat langka purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk). Dalam Prosiding Seminar Pelestarian Pemanfaatan Tumbuhan dari Hutan Tropis Indonesia. Fak. Kehutanan IPB. Bogor.
- Mariska, I. dan D. Seswita, 1994. Pengaruh lamanya penyimpanan dan zat penghambat terhadap regenerasi biakan pule pandak. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Bioteknologi. Puslitbang Bioteknologi LIPI. Bogor 6-7 September.
- Santosa, B. dan M. Herman, 1997 Pengaruh manitol terhadap pertumbuhan tanaman ubi kayu secara in vitro. Prosiding Kesiapan dan Kewaspadaan terhadap hasil-hasil Bioteknologi, Bioetika Penelitian dan Hak Paten Produk Akhir. Univ. Brawijaya, Malang. hal. 150 - 157.
- Sunarlim, N. dan N. Zuraida, 2001 Penyimpanan ubi kayu in vitro dengan pertumbuhan minimal. Buletin Plasma Nutfah Vol 7 No. 1 (7 - 12).
- Unnikfishnan, M., N.G. Nair and G.G. Nayar, 1992. Preliminary studies on conservation of germplasm of tuber crops through in vitro cultures. In N.S. Subba Rao *et al* (Eds.). New Trends in Biotechnology. Oxford & IBH publ. Co. PVT.LTD. New Delhi. p. 51 - 55.
- Zaer dan Mapes, 1982. Action of growth regeneration. In Bonga and Durzan (Eds.). Tissue culture in Forestry. Martinus Nijhoff. London. p. 231 - 235.