

STUDI PENDAHULUAN : INDUKSI KALUS EMBRIOGENIK DARI EKSPLAN DAUN *Echinaceae purpurea*

Meynarti Sari Dewi Ibrahim, N. Nova Kristina dan Nurliani Bermawie

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

ABSTRAK

Echinaceae merupakan tanaman obat introduksi yang berkhasiat meningkatkan daya tahan tubuh. *Echinaceae* yang belakangan ini banyak peminatnya perlu dikembangkan, namun bahan tanaman yang baik masih terbatas. Salah satu cara perbanyakkan bahan tanaman adalah dengan cara *in vitro*. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan media yang terbaik untuk menginduksi kalus embriogenik melalui eksplan daun dan teknik regenerasinya. Penelitian *in vitro* ini dilakukan dari Januari sampai Desember 2002, dengan 2 tahapan yaitu 1. Induksi kalus embriogenik 2. Regenerasi kalus. Pada tahap pertama digunakan dua macam media yaitu; media MS yang diperkaya dengan BA 0,1mg/l + 2,4 D 0,5 mg/l, dan media MS yang dikombinasi dengan LS yang diberi glutamine + BA (0,1mg/l , 0,2 mg/l) + 2,4 D (0,5 mg/l , 1 mg/l). Pada tahap kedua yaitu regenerasi dilakukan pada media kombinasi MS dan LS yang ditambahkan BA (0 mg/l , 0,2 mg/l , 0,4 mg/l), kombinasi MS dan LS + Kinetin (0,2 mg/l , 0,4 mg/), masing-masing perlakuan dilakukan secara tunggal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi kalus embriogenik hanya berhasil pada kombinasi media MS dan LS, pada media lain sekalipun terbentuk kalus namun bukan embriogenik Untuk tahap regenerasi yang terbaik adalah media kombinasi MS dan LS + BA 0,4 mg/l untuk pembentukan bakal daun dan media kombinasi MS dan LS + Kinetin 0,4 mg/l pembentukan bakal akar.

Kata kunci : *Echinaceae purpurea*, kalus embriogenik, *in vitro*

A pre-liminary study on Induction of embryonic callus from leaf of Echinaceae purpurea

ABSTRACT

Echinaceae is an introduced medicinal plant used to improve immune system of the body. Lately, interest on *Echinaceae* increased, however, good plant material for development is limited. One method to multiply plant material is the *in vitro* culture, so that research and development especially *in vitro* multiplication is required. The aim of the experiment is to procure a medium for the induction of embryonic callus and the technique of regeneration. The experiment is conducted at the Laboratory of Breeding and Genetic Resources, ISMECRI from January to December 2002, consisted of 2 steps, namely (1). Embryonic callus induction, (2). Callus regeneration. In the first step, explants were transferred into MS medium enrich with BA 0,1 mg/l + 2,4 D 0,5 mg/l and a combination medium of MS and LS medium supplemented with glutamine + BA (0,1 mg/l; 0,2 mg/l) + 2,4 D (0,5mg/l 1 mg/l). In the second step, regeneration was conducted on medium MS combined with LS + BA (0 mg/l + 0,2 mg/l + 0,4 mg/l), MS combined with LS + Kinetine (0,2 mg/l; 0,4 mg/l). The results showed that embryonic callus was obtained from culture of leaf explants on MS medium combined with LS. The best treatment for step regeneration was MS combined LS + BA 0,4 mg/l for shoot formation while MS combined LS + kinetine 0,4 mg/l induced root formation.

Key word : *Echinaceae purpurea*, callus embryonic, *in vitro*

PENDAHULUAN

Echinaceae merupakan tanaman obat asli Amerika Utara, dengan nama umum adalah *Coneflower*. Kegunaannya sebagai obat pertama kali diperkenalkan oleh suku Indian pada abad ke 17. Suku Indian menggunakannya sebagai obat sakit gigi, gangguan saluran pernafasan, batuk, demam, berbagai penyakit infeksi, gigitan ular dan penambah stamina. Berbagai obat modern berasal dari bahan baku Echinaceae, antara lain obat demam, sakit gigi, gangguan pernapasan bagian atas, infeksi saluran kencing, luka bakar, penyakit kulit, bronchitis, alergi, gigitan serangan, rematik dan leukimia. Echinaceae juga dikenal sebagai tanaman "immune herb" (peningkatan system kekebalan tubuh), karena mempunyai khasiat untuk meningkatkan pembentukan dan aktifitas sel darah putih. Pada saat ini Echinaceae sedang diuji kemungkinannya untuk dipergunakan sebagai obat anti kanker, penyembuhan Aids dan kelelahan yang kronis (Rahardjo, 2000).

Penggunaan Echinaceae sebagai tanaman obat berkembang sangat pesat baik di Amerika maupun di Eropa. Di Jerman Barat pada tahun 1996 terdapat lebih dari 2000 kemasan obat modern berasal dari tanaman Echinaceae dan pada tahun 1999 telah diproduksi 300 – an kemasan obat modern. Kebutuhan Echinaceae dipasar dunia terus meningkat. Hal ini disebabkan karena minat pengguna telah bergeser kepada obat yang berasal dari bahan baku alami untuk menghindari terjadinya efek samping (Rahardjo *et al.*, 2002).

Kandungan bahan aktif dari Echinaceae secara umum adalah polysaccharides, flavonoids, asam caffeic, minyak esensial, polyacetylenes, alkylamides, dan bahan-bahan kimia lain. Polysaccharides yang larut dalam air berfungsi sebagai stimulan terhadap ketahanan tubuh dan komponen lemak yang larut sebagai peningkatan daya phagocytosis (Rahardjo, 2000). Bagian akar tanaman mempunyai khasiat tinggi sehingga nilai jual simplisia akar lebih tinggi dibandingkan dengan bagian atas (batang, daun, dan bunga). Harga simplisia yang terdiri dari akar dan tajuk bunga baik itu *E. angustifolia* maupun *E. purpurea*, mencapai US\$ 12 per kg dan simplisia akar mencapai 44 – 51 per kg (Rahardjo *et al.*, 2002).

Pembentukan kultivar baru yang mengandung komponen aktif polysaccharides yang tinggi sangat diperlukan. Salah satu caranya adalah dengan meningkatkan keragaman genetik. Peningkatan keragaman genetik dapat dilakukan melalui teknik kultur jaringan. Pada teknik perbanyakan secara *in vitro*, eksplan yang melalui fase kalus dapat menghasilkan planlet yang beragam. Keadaan tersebut dapat dimanfaatkan untuk mendapatkan kultivar-kultivar baru.

Dalam budidaya *in vitro* (kultur jaringan), menginduksi kalus merupakan salah satu langkah penting, setelah itu diusahakan agar terjadi diferensiasi akar dan tunas. Proses terjadinya kalus sampai diferensiasi berbeda-beda, tergantung pada bagian tanaman yang dipakai sebagai eksplan,

metode budidaya *in vitro*, juga zat-zat tanaman yang di bubuhkan pada media dasar (Suryowinoto, 1996). Menurut Gunawan (1987) untuk mendapatkan kalus penggunaan eksplan dari daun umumnya lebih menguntungkan dari pada eksplan batang. Masalah yang perlu diantisipasi adalah generasi kalus menjadi planlet. Untuk mendapatkan kalus, zat pengatur tumbuh yang biasa digunakan adalah 2,4-D dari golongan auksin dan BAP dari golongan sitokinin (Wernicke dan Milkovist, 1987) sedangkan untuk regenerasi kalus digunakan BA dan Kinetine dari golongan sitokinin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan media yang terbaik untuk menginduksi kalus embriogenik melalui eksplan daun dan teknik regenerasinya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan dilaboratorium kultur jaringan Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat mulai bulan Januari sampai Desember 2002. Sumber eksplan berasal dari jaringan daun *Echinaceae purpurea* dari Kebun Percobaan Cimanggu. Daun tanaman *Echinaceae* disterilisasi dengan air mengalir, diterjen, Dithane, clorok, alkohol 70%, HgCl 0,2%, tiap tahapan dibilas dengan aquades steril. Selanjutnya daun dipotong-potong (± 1 cm) dan dimasukkan ke media. Ini dilakukan untuk menghindari tingkat kontaminasi yang tinggi pada media perlakuan akibat eksplan berasal dari lapangan. Media yang digunakan Murashige dan Skoog + sukrosa 30 g/l + vitamine (thiamin-HCl, Nic.aci, Pyridoxin-HCl, Glycine dan Myo

inositol) dengan pH 5,7 – 5,8. Setelah diisi eksplan eksplan, botol-botol kultur disimpan pada rak kultur dengan intensitas 1000 luks selama 16 jam sehari dengan suhu 18°C. Penelitian *in vitro* ini dilakukan dengan 2 tahapan yaitu

Induksi kalus embrionik

Daun yang telah steril pada media terdahulu kemudian dipotong-potong dan ditanam ke media induksi kalus. Media induksi kalus yang digunakan ada 2 macam yaitu

- Perlakuan MS + BA 0,2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l dan MS + BA 0,1 mg/l + 2,4-D 0,5 mg/l. lalu disubkultur ke media perlakuan b.
- Perlakuan media MS kombinasi LS + glutamine + BA 0,2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l dan MS kombinasi LS + glutamine + BA 0,1 mg/l + 2,4-D 0,5 mg/l.

Setiap perlakuan ditanam 1 eksplan dan diulang sebanyak 10 ulangan. Pengamatan dilakukan setiap minggu terhadap pembentukan dan perkembangan kalus.

Regenerasi kalus

Kalus yang terbentuk dari tahapan sebelumnya kemudian di-regenerasikan. Untuk mendapatkan jumlah kalus yang cukup maka kalus yang terbentuk dipotong (dibagi) menjadi beberapa bagian kemudian ditanam ke media kombinasi MS dan LS + BA (0 mg/l , 0,2 mg/l , 0,4 mg/l) dan kombinasi MS dan LS + kinetine (0,2 mg/l , 0,4 mg/l). Pengamatan dilakukan setiap minggu terhadap proses regenerasi kalus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi kalus embrionik

Pada minggu pertama jaringan daun yang ditanam pada perlakuan a yaitu media MS yang diberi BA 0,2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l dan MS + BA 0,1 mg/l + 2,4-D 0,5 mg/l belum menunjukkan perubahan yang berarti, baru pada minggu kedua mulai terlihat pembengkakan dibekas potongan (luka), berarti BA dan 2,4-D mulai diserap oleh jaringan daun, namun pembengkakan ini sampai minggu ke-4 tidak berhasil membentuk kalus. Hal ini mungkin disebabkan oleh kurang seimbang komposisi media yang digunakan. Padahal penelitian Ranch *et al.*, (1986) sebelumnya berhasil menginduksi kalus embrionik kedelai dengan menggunakan kombinasi 2,4-D dengan BA (0,1 – 0,5 mg/l). Untuk itu dilakukan subkultur ke perlakuan b yaitu media Murashige and Skoog (MS) yang dikombinasikan dengan Linn Staba (LS) dan diberi glutamine + BA (0,1 mg/l; 0,2 mg/l) + 2,4-D (0,5 mg/l; 1 mg/l) dan berhasil membentuk kalus. Pada minggu pertama baik perlakuan MS + LS + BA 0,2 mg/l + 2,4-D 1mg/l atau pada perlakuan MS + LS + BA 0,1 mg/l + 2,4-D 0,5 mg/l terjadi pembengkakan dibekas potongan dan minggu kedua kalus sudah terbentuk, kalus terus bertambah sampai minggu ke 4 (Tabel 1). Hal ini sesuai dengan pernyataan George *et al.*, (1987) yang menyatakan bahwa pemberian gultamine dan mengkombinasikan media Murashige and Skoog (MS) dengan Linn Staba (LS) memberikan hasil yang baik untuk beberapa

tanaman satu species yang menggunakan eksplan daun. Penelitian Kristina dan Syahid (1997) pada tanaman lada menunjukkan pada minggu pertama potongan daun menunjukkan adanya pembengkakan dibekas potongan, minggu kedua mulai terbentuk kalus dan minggu ketiga mulai terbentuk nodul-nodul. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa pembentukan kalus untuk kedua media yang dipakai mencapai 100%, namun untuk kalus kompak dan embrionik lebih banyak terbentuk pada media MS + LS + glutamine + BA 0,2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l; demikian juga ukuran berat basah kalusnya lebih baik.

Regenerasi kalus

Regenerasi pada 2 minggu setelah penanaman di media kombinasi MS + LS + BA 0 mg/l, MS + LS + BA 0,2 mg/l dan MS + LS + Kinetin 0,2 mg/l, sebanyak 50% kalus belum berkembang namun untuk media kombinasi MS dan LS + BA 0,4 mg/l dan Kinetin 0,4 mg/l perkembangan sudah mencapai 75 % (Tabel 2). Ini berarti bahwa pemberian BA 0,4 mg/l dan Kinetin 0,4 dapat mendiferensiasi kalus namun pada 6 minggu setelah subkultur terlihat bahwa pemberian BA 0,4 mg/l ternyata lebih baik untuk pembentukan bakal daun dan kinetine 0,4 mg/l lebih baik untuk pembentukan bakal akar. Hal ini terjadi karena BA lebih menstimulir kearah dediferensi dan proliferasi tunas sedangkan kinetin memacu pemanjangan sel (Gunawan, 1987). Pada jahe merah, pemakaian kinetine juga merangsang pembentukan akar dari pada pembentukan tunas (Mariska *et al.*, 1989).

Tabel 1 Induksi kalus pada minggu ke- 4 setelah sub kultur.

Table 1. *Callus induction 4 weeks after subcultured*

Media/medium	Persentase pembentukan kalus/ <i>Callus percentage</i>	Rataan berat kalus/ <i>The average weight of callus</i>	Bentuk kalus/ <i>Callus performance</i>	Warna kalus/ <i>Color of callus</i>
MS + LS + Glutamine + BA 0,2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l	100 %	1,745 gram	80% kompak embri- nik, 20% non embri- nik, 80% kompak embryo- nic, 20% non embryonic	Putih kekuningan sedikit hijau dan ungu/ <i>white yellowish a little green and purple</i>
MS + LS + Glutamine + BA 0,1 mg/l + 2,4 -D 0,5 mg/l	100 %	1,579 gram	70% kompak embri- nik dan 30% non embri- nik, 70% kompak embryo- nic, 30% non embryonic	Putih kekuningan sedikit hijau dan ungu./ <i>white yellowish a little green and purple</i>

Tabel 2. Proses regenerasi kalus setelah disubkultur.

Table 2 *Regeneration process of callus after subcultured*

Media/ Medium	Kondisi kalus setelah subkultur/Callus condition after subcultured			
	2 minggu/2 weeks	4 minggu/4 weeks	6 minggu/6 weeks	8 minggu/8 weeks
MS + LS (Kontrol)	50% kalus belum berkembang, 50% kalus berkembang kompak warna putih kekuningan. 50% <i>callus didnot developed</i> , 50% <i>developed compact white yellowish callus</i>	50% kalus berkembang sangat lambat, 50% berkembang kompak embrionik warna putih kekuningan. 50% <i>callus developed slowly</i> , 50% <i>developed compact embryonic callus</i>	50% kalus berhenti berkembang 37,5% kalus berkembang lambat warna putih kekuningan 12,5 kalus membentuk nodul warna putih. 50% <i>callus stop developing 37,5% developed slowly 12,5% callus form white nodul</i> .	50% kalus menjadi coklat, 37,5% berkembang lebih lambat, 12,5% kalus jadi nodul bakal akar terlihat nyata dengan panjang $\pm 0,2$ cm. 50% <i>callus browning</i> , 37,5 % <i>developed slowly</i> , 12,5% <i>callus form rest nodul 0,2 cm</i> .
MS + LS + BA 0,2 mg/l	50% kalus belum berkembang 50% kalus berkembang kompak warna hijau. 50% <i>callus didnot developed</i> , 50% <i>developed green callus</i>	50% kalus berkembang lambat, 50% membentuk nodul warna hijau kekuningan. 50% <i>callus developed slowly</i> , 50% <i>formed green yellowish nodul</i>	50% kalus berhenti berkembang, 50% nodul yang terbentuk bertambah banyak. 50% <i>callus stop developing, 50% multiplication of nodul</i>	50% kalus menjadi coklat, 25% nodul mulai memanjang warna hijau, 25% nodul membentuk bakal akar warna putih. 50% <i>callus browning</i> , 25% <i>length green nodul</i> 25% <i>callus formed root nodul</i>

Tabel 2. Lanjutan

Media/ Medium	Kondisi kalus setelah subkultur/Callus condition after subcultured			
	2 minggu/2 weeks	4 minggu/4 weeks	6 minggu/6 weeks	8 minggu/8 weeks
MS + LS + BA 0,4 mg/l	25% kalus belum ber kembang, 25% kalus berkembang kompak putih kekuningan, 50% kalus berkembang kompak embrionik warna hijau kekuning- an 25% callus didnot developed, 25% develo- ped compact white yellowish, 50% develo- ped green yellowish	25% kalus berkembang lambat, 25% membentuk nodul putih kekuningan, 50% membentuk nodul warna kuning kehijauan 25% callus developed slowly, 25% developed white yello- wish nodul, 50% developed yellow greenish nodul	25% kalus berhenti berkembang, 25% nodul memanjang membentuk bakal akar, 50% nodul memanjang membentuk bakal tunas 25% callus stop developed, 25% for- med root nodul, 50% nodul formed shoot nodul	25% kalus menjadi coklat, 25% nodul akar terlihat nyata dengan panjang $\pm 0,3$ Cm, 50% bakal tunas terlihat nyata 25% callus browning, 25% lengthen root nodul 0,3 cm, 50% callus formed nodul shoot nodul
MS + LS Kinetin 0,2 mg/l	50% kalus belum ber kembang, 50 % kalus kompak embrionik warna kuning kemerahan 50% callus didnot developed, 50% develo- ped compact yellow reddish	25% kalus berkembang lambat, 25% berkembang dengan warna putih kekuningan, 50% mem- bentuk nodul warna kuning kemerahan 25% callus developed slowly, 25% developed white yello- wish nodul, 50% developed yellow reddish nodul	25% kalus berhenti berkembang, 25% kalus membentuk nodul, 50% nodul yang terbentuk mulai memanjang 25% callus stop deve- loping, 25% formed root nodul, 50% formed lengthen nodul	25% kalus coklat, 25% nodul akar terlihat nyata dengan panjang $\pm 0,3$ Cm, 50% nodul bakal tunas terlihat nyata 25% callus browning, 25% lengthen root nodul 0,3 cm, 50% callus formed shoot nodul

Tabel 2. Lanjutan

Media/ Medium	Kondisi kalus setelah subkultur/ <i>Callus condition after subcultured</i>			
	2 minggu/2 weeks	4 minggu/4 weeks	6 minggu/6 weeks	8 minggu/8 weeks
MS + LS Kinetin 0,4 mg/l	25% kalus belum berkembang, 75% kompak berkembang, kompak embrionik warna putih kekuningan 25% <i>callus</i> <i>didnot</i> <i>developed</i> , 75% <i>developed compact white yellowish callus</i>	25% kalus berkembang lambat, 25% kalus membentuk nodul warna kuning, hijau kemerahan, 50% kalus membentuk nodul warna putih, kuning kemerahan 25% <i>callus</i> <i>developed slowly</i> , 25% <i>formed yellow green reddish nodul</i> , 50% <i>developed white yellow greenish nodul</i>	25% kalus berhenti berkembang, 25% nodul mulai memanjang warna kuning, hijau kemerahan, 50% nodul bertambah panjang warna putih kekuningan 25% <i>callus</i> <i>stop developing</i> , 25% <i>formed lengthen green reddish nodul</i> , 50% <i>formed lengthen white yellowish nodul</i>	25% kalus coklat, 50% nodul membentuk bakal akar dengan panjang $\pm 0,2$ Cm 25% nodul mulai membentuk bakal tunas 25% <i>callus</i> <i>browning</i> , 50% <i>root nodul</i> <i>length 0,2 cm</i> , 25% <i>callus</i> <i>formed shoot nodul</i>

KESIMPULAN

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa jaringan daun *Echinaceae purpurea* dapat dipakai untuk menghasilkan kalus. Induksi kalus embrionik hanya dapat diperoleh pada kombinasi media MS dan LS sedangkan pada media lain walaupun terbentuk kalus namun tidak embriogenik. Untuk pembentukan bakal tunas media kombinasi MS dan LS + BA 0,4 mg/l dan bakal akar media kombinasi MS dan LS + kinetine 0,4 mg/l adalah terbaik. Sebaiknya perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk melihat keragaman dari tanaman yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- George, E.F., D.J.M. Puttock and H.J. George, 1987 Plant culture media. Volume 1 Formations and uses. exetetics limited. Edington, Westbury, Wits. BA134 qG, England. 567 pp.
- Gunawan, L.W., 1987 Teknik kultur jaringan PAU – IPB. 278 h.
- Kristina, N.N. dan S.F. Syahid, 1997 Pengaruh sitokinin terhadap pembentukan kalus dan pertumbuhan biakan lada liar. Jurnal Penelitian Tanaman Industri II (5) 193 – 198.
- Mariska, I., D.Sukmadjaja dan E. Gati, 1989. Perkembangan penelitian bioteknologi kultur jaringan tanaman obat. Edisi Khusus Littro, V (2) 8 – 18.
- Rahardjo, M., 2000. *Echinaceae* tanaman obat introduksi potensial. Warta Penelitian dan Pengemb-
angan Tanaman Perkebunan 6 (2)
h 1-3.
- Raharjdo, M., SMD Rosita, dan Sudiarto, 2002. Pengaruh penun-
daan umur panen *Echinaceae purpurea* terhadap mutu simplisia. Jurnal Bahan Alam Indonesia (The Indonesian Journal of Natural Product). PERHIBA. 1 (2) 68-72.
- Ranch, J.P.L., S.B.Y Ogel and A.C. Ziclinski, 1986. Plant Regeneration from Tissue Culture of Soybean by Somatic Embriogenesis. p. 97-110. in K.Vasil (Ed). Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 3. Academic Press.
- Suryowinoto, M., 1996. Pemuliaan tanaman secara *in vitro*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, UGM, Yogyakarta 252 h.
- Wercicke, W and L. Milkovist, 1987 Effect of auxin on mitotic cell cycle in cultured leaf segments at different stages of development in wheat. Physiologia Plantarum. The Scandinavian Society for Plant physiology. Copenhagen. January 1987 (1) 16 - 22.