

**PENGARUH KONDISI GELAP DAN TERANG TERHADAP
PERTUMBUHAN KALUS BIJI MAHKOTA DEWA
(*Phaleria macrocarpa*)**

**A. ASTY SAFARIDAH
N111 05 048**



PERPUSTAKAAN FARMASI - KAW. TANJUNGPINANG	
Tgl. Terima	2 - 12 - 09
asal Dori	farmasi
Banyaknya	1 lus
Marga	Utari
No. Inventari	51
No. Klas	SKR - F09

SAF
P

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**

**PENGARUH KONDISI GELAP DAN TERANG
TERHADAP PERTUMBUHAN KALUS
BIJI MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*)**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**A. ASTY SAFARIDAH
N111 05 048**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**

PENGARUH KONDISI GELAP DAN TERANG
TERHADAP KECEPATAN PERTUMBUHAN KALUS
BIJI MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*)

A. ASTY SAFARIDAH

N111 05 048

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



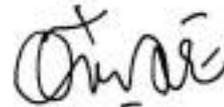
Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
NIP. 19641231 199002 1 005

Pembimbing Pertama,



Dra. Rahmawati Syukur, M.Si., Apt.
NIP. 19651010 199203 2 002

Pembimbing Kedua,



Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M.Sc
NIP. 131 862 603

Pada Tanggal 25 November 2009

UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur alhamdulillah, segala puji hanya milik Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga atas izin-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Rasa bangga, hormat, dan terima kasih yang tak terhingga penulis haturkan kepada Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si, Apt. sebagai pembimbing utama, Ibu Dra. Rahmawati Syukur, M.Si, Apt. sebagai pembimbing pertama, dan Ibu Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M.Sc sebagai pembimbing kedua atas waktu dan tenaga yang diluangkan oleh beliau dalam memberikan arahan dan bimbingan kepada penulis dalam menyusun skripsi ini.

Terima kasih yang tulus penulis haturkan kepada Dekan Fakultas Farmasi Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt., Bapak dan Ibu Dosen Farmasi, Seluruh Staf dan karyawan Fakultas Farmasi dan Laboratorium Bioteknologi Pertanian Pusat Kegiatan Penelitian (PKP) Universitas Hasanuddin, Ibu Prof. Dr. rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt. selaku penasehat akademik atas segala perhatian dan nasehatnya selama perkuliahan.

Akhirnya, dengan sepenuh cinta, hormat, dan rasa bangga, penulis menghaturkan terima kasih kepada :

1. Ayahanda H. Andi Abd. Latief Mapparessa dan Ibunda Hj. Hasnah Ani yang telah mencurahkan kasih sayang, perhatian, serta memberikan semua yang aku butuhkan untuk menjadi lebih baik, dan kakak satu-satunya Hj. A. Alny Hilwany, S.Si, Apt terima kasih atas motivasi dan dukungan selama ini.
2. Teman-teman seperjuangan, Shany, Asih, Mimi, Mardiah, Marni, Jumriah, Tanti, Mahfiah, Jumriah, dan seluruh Gallenica crew atas kebersamaannya dalam menghadapi suka duka dan pahit getirnya menempuh pendidikan di fakultas Farmasi yang tercinta ini, teman-teman Mig33 Makassar terima kasih atas semangat yang kalian berikan. Kalian adalah motivator terbesarku.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, tanggapan, saran, maupun kritik sangat diharapkan dalam penyempurnaan skripsi ini. Semoga karya kecil ini bermanfaat dalam pengembangan farmasi ke depan. Amin.

Makassar, November 2009

A. Asty Safaridah

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kondisi gelap dan terang dalam pembentukan kalus biji Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa*). Ekstraksi dan pemisahan dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk membandingkan kandungan kimia dari kalus biji Mahkota Dewa dengan tanaman asalnya. Biji Mahkota Dewa ditumbuhkan pada media *Murashige Skoog* (MS) dengan penambahan 1 mg/l 2,4-D. Pengamatan pertumbuhan kalus didasarkan pada pengamatan bobot kalus dari awal terbentuknya kalus hingga 1 bulan setelah subkultur kedua. Kalus yang diperoleh berumur 1 bulan setelah subkultur kedua kemudian dipanen dan diidentifikasi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kondisi gelap dapat memberikan pertumbuhan optimum pada kalus biji Mahkota Dewa. Profil KLT kalus biji Mahkota Dewa yang ditumbuhkan pada media *Murashige Skoog* (MS) pada kondisi lingkungan gelap memiliki nilai Rf yang relatif sama dengan nilai Rf tanaman asal.

Kata kunci: Mahkota Dewa, kondisi gelap dan terang, kalus

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the dark and light condition in callus formation of Mahkota Dewa seed (*Phaleria Macrocarpa*). Extraction and separation of chemical content was also done by Thin Layer Chromatography (TLC) to compare its chemical content with original plant. Mahkota Dewa seed was cultivated on *Murashige Skoog* (MS) medium added with 1 mg/l 2,4 D. Observation of callus formation was done by measuring of its fresh weight from initial growth until 1 month after second subculture. Obtained callus after second subculture were harvested and identified its chemical content. The result showed that dark condition gave optimum growth from Mahkota Dewa seed. Thin Layer Chromatography (TLC) profile of callus from Mahkota Dewa seed that cultivated on *Murashige Skoog* (MS) medium has relative same Rf value if compare with original plant

Keywords: Mahkota Dewa, dark and light condition, callus

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Uraian Tanaman Mahkota Dewa	4
II.1.1 Klasifikasi	4
II.1.2 Morfologi	4
II.1.3 Kandungan	6
II.2 Uraian Kultur Jaringan Tanaman	6
II.2.1 Kultur Jaringan Tanaman	6
II.2.2 Media Tanam	9
II.2.3 Sterilisasi	17
II.2.4 Kultur Kalus	19

BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN	26
III.1 Alat dan Bahan	26
III.2 Pembuatan Media	26
III.3 Penyiapan Eksplan	27
III.4 Sterilisasi	27
III.4.1 Sterilisasi Alat	27
III.4.2 Sterilisasi Media	27
III.4.3 Sterilisasi Eksplan	27
III.4.4 Sterilisasi Ruangan	28
III.5 Penanaman Eksplan	28
III.6 Subkultur	29
III.7 Pengumpulan Data	29
III.8 Identifikasi	29
III.9 Pembahasan Hasil	30
III.10 Pengambilan Kesimpulan	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
IV.1 Hasil penelitian	31
IV.2 Pembahasan	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	38
V.1 Kesimpulan	38
V.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL



Tabel	halaman
1. Data Pertambahan Bobot Kalus (g) Pada Kondisi Terang	46
2. Data Pertambahan Bobot Kalus (g) Pada Kondisi Gelap	47
3. Data Nilai Rf	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Kurva pertambahan bobot kalus pada awal penanaman	49
2. Kurva pertambahan bobot kalus pada subkultur I	49
3. Kurva pertambahan bobot kalus pada subkultur II	50
4. Gambar eksplan pada awal penanaman	51
5. Gambar eksplan berumur satu bulan setelah penanaman	52
6. Gambar eksplan berumur satu bulan setelah subkultur I	53
7. Gambar eksplan berumur satu bulan setelah subkultur II	54
8. Gambar profil KLT dengan eluen etil asetat 100%	55
9. Gambar profil KLT dengan eluen heksan : etil asetat (1:1)	55
10. Gambar profil KLT dengan eluen heksan : etil asetat (3:1).....	56
11. Gambar Tanaman Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>)	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Komposisi Media MS (<i>Murashige and Skoog</i>)	41
2. Skema Kerja Pembuatan Media MS (<i>Murashige and Skoog</i>)	43
3. Skema Kerja Penanaman Eksplan Biji Mahkota Dewa	44
4. Klasifikasi Tanaman Mahkota Dewa.....	45

BAB I PENDAHULUAN

Tanaman telah lama dikenal dalam memproduksi beragam senyawa kimia yang disebut metabolit sekunder. Dimasa lampau metabolit sekunder dianggap belum mempunyai fungsi yang jelas. Namun belakangan diketahui metabolit sekunder merupakan senyawa yang sangat penting bagi tanaman produsennya maupun kehidupan manusia.

Mahkota dewa adalah tanaman obat asli indonesia. Dalam daun dan kulit buahnya terkandung alkaloid, saponin, dan flavanoid. Selain itu, di dalam daunnya juga terkandung polifenol. Sampai saat ini banyak penyakit yang berhasil disembuhkan dengan mahkota dewa. Beberapa penyakit berat (seperti sakit lever, kanker, sakit jantung, kencing manis, asam urat, reumatik, sakit ginjal, tekanan darah tinggi, dan ketagihan narkoba) dan penyakit ringan (seperti eksim, jerawat, dan luka gigitan serangga) bisa disembuhkan dengan tanaman ini. (1)

Kebanyakan produk asal tanaman tadi dalam skala komersial diperoleh dengan cara isolasi. Hal ini menimbulkan masalah yang serius karena semakin meningkatnya permintaan kebutuhan akan obat, begitu pula bahan tanaman penghasilnya. Namun penyediaan bahan baku obat-obatan yang berasal dari tanaman menghadapi berbagai hambatan seperti iklim, adanya hama penyakit dan ketidakseragaman kualitas. Untuk mengatasi hambatan-hambatan tersebut dilakukan metode kultur jaringan tanaman. (2)

Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan tanaman dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik. Kultur jaringan mempunyai manfaat yang besar di bidang Farmasi, karena dari usaha ini dapat menghasilkan metabolit sekunder untuk upaya pembuatan obat-obatan, yaitu dengan memisahkan unsur-unsur yang terdapat dalam kalus misalnya alkaloid, steroid dan terpenoid. Dengan cara biasa, untuk mendapatkannya harus menunggu lama sampai tanaman cukup umur bahkan sampai berproduksi hingga bertahun-tahun. Sedangkan dengan teknik kultur jaringan hanya membutuhkan waktu antara tiga minggu sampai satu bulan saja. (3)

Kecepatan pertumbuhan kultur kalus dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain hormon pertumbuhan, macam dan kadar sumber karbon, kadar makroutrien dan mikronutrien serta kondisi kultur seperti cahaya dan suhu ruang inkubasi. (4)

Pembelahan sel dari eksplan dan pertumbuhan dari kalus dihambat oleh cahaya. Umumnya pembentukan kalus maksimum sering terjadi di tempat yang gelap. Contohnya pada kondisi inkubasi gelap akan menghasilkan pertumbuhan kalus tertinggi pada irisan akar dari wortel (*Daucus carota*), dan irisan akar dari jagung (*Zea mays*). (5, 6)

Disisi lain ada beberapa tumbuhan yang pembelahan sel dari eksplan dan pertumbuhan dari kalus tidak dihambat oleh cahaya, bahkan cahaya ini diperlukan untuk hasil yang optimal. Contoh kalus dari



kuncup pohon cemara (*Pseudotsuga menziesii*) akan terbentuk pada kondisi inkubasi terang. Semua ini tergantung dari spesies tanaman tersebut. (5, 6)

Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan penelitian pengaruh kondisi lingkungan gelap dan terang terhadap pertumbuhan kalus biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi lingkungan berupa cahaya yang optimal (gelap atau terang) untuk pertumbuhan kalus biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang dilakukan dengan menggunakan metode kultur jaringan dan melihat profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sehingga bisa diketahui kandungan kimia yang terdapat pada ekstrak kalus biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*).

Penelitian ini merupakan suatu langkah awal dalam upaya untuk menyediakan bahan baku obat dan diharapkan bermanfaat untuk penelitian-penelitian selanjutnya dalam usaha untuk merancang kondisi lingkungan yang paling optimal untuk pertumbuhan kalus biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman Mahkota Dewa

II.1.1 Klasifikasi Tanaman

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermathophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledoneae
Subclassis	: Sympetalae
Ordo	: Thymelaeales
Familia	: Thymelaeaceae
Genus	: Phaleria
Species	: <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boeri. (7)

II.1.2 Morfologi

Tanaman mahkota dewa merupakan tanaman perdu. Ketinggiannya sekitar 1,5-2,5 meter. Namun, jika dibiarkan, bisa mencapai lima meter per tahun. Tanaman mahkota dewa terdiri dari akar, batang, daun, bunga dan buah.

Akar mahkota dewa termasuk akar tunggang dan berwarna kuning kecokelatan. Panjang akarnya bisa sampai 100 cm. Penyebaran akarnya ke samping sesuai ukuran panjang sekeliling lingkaran tajuk daun.

Mahkota dewa memiliki batang yang bulat dengan percabangan simpodial dan bergetah. Permukaan batangnya kasar. Kulitnya berwarna cokelat kehijauan, sedangkan kayunya berwarna putih.

Daun mahkota dewa merupakan daun tunggal. Tangkai daun berbentuk bulat dengan panjang 3-5 mm. Daun ini berwarna hijau dengan permukaan licin dan tidak berbulu. Helai daunnya berbentuk lanset atau lonjong. Ujung dan pangkal daun runcing dengan tepi rata. Panjang daun sekitar 7-10 cm dan lebar 3-5 cm. Pertulangan daun menyirip. Daun yang sudah tua berwarna lebih gelap dibanding daun muda.

Bunga mahkota dewa merupakan bunga majemuk yang tersusun dalam kelompok 2-4 bunga. Pertumbuhannya menyebar di batang atau ketiak daun. Warnanya putih. Bentuknya seperti terompet kecil. Baunya harum. Ukurannya kecil kira-kira sebesar bunga tanaman cengkeh. Bunga ini biasanya paling banyak muncul pada saat musim penghujan.

Buah mahkota dewa terdiri dari kulit, daging, cangkang dan biji. Buah saat masih muda berwarna hijau muda, tetapi akan berubah menjadi merah saat sudah tua. Warna buah saat sudah tua merupakan ciri khas tersendiri pada mahkota dewa. Ukuran buahnya bervariasi. Ketebalan kulit buah berkisar 0,5-1,0 mm. Daging buah berwarna putih dengan ketebalan bervariasi, tergantung ukuran buah.

Cangkang buah adalah batok pada biji. Jadi, cangkang ini bagian buah yang paling dekat dengan biji. Cangkang buah berwarna putih.

Ketebalannya bisa mencapai 2 mm. Seperti bentuk buahnya, biji mahkota dewa juga bulat. Warnanya putih. Diameternya mencapai 1 cm. (1,7)

II.1.3 Kandungan

Komposisi buahnya mengandung senyawa flavonoid yang tinggi, disamping senyawa alkaloid, saponin, fenolik hidrokuinon, tanin, steroid, mono terpen dan sesqui terpen. (8)

Selain itu, suatu senyawa baru glukosida benzofenon berhasil diisolasi dan diidentifikasi sebagai 4,5-dihidroksi,4'-metoksibenzofenon-3-O- β -D-glukosida (Phalerin) dari ekstrak metanol daun mahkota dewa berdasarkan atas data spektroskopi. (9)

II.2 Uraian Kultur Jaringan Tanaman

II.2.1 Kultur Jaringan Tanaman

Tahun 1838 dapat dianggap sebagai awal sejarah kultur jaringan *in vitro*. Saat itu Schwann dan Schleiden mengusulkan suatu teori yang disebut **Totipotensi**. Dikatakan bahwa sel itu otonom dan prinsip ini memungkinkan terjadinya regenerasi sehingga menjadi dasar terbentuknya tumbuhan yang lengkap. Teori ini ternyata menjadi dasar kultur sel atau jaringan tumbuhan. (10)

Menurut Suryowinoto (1991), kultur jaringan dalam bahasa asing disebut sebagai *tissue culture*, *weefsel cultuus* atau *gewebe kultur*. Kultur adalah budidaya dan jaringan adalah sekelompok sel yang mempunyai bentuk dan fungsi yang sama. Maka, kultur jaringan berarti

membudidayakan suatu jaringan tanaman menjadi tanaman kecil yang mempunyai sifat seperti induknya. (3)

Perbanyakan tanaman dapat digolongkan menjadi dua, yaitu perbanyakan tanaman secara generatif dan perbanyakan tanaman secara vegetatif. Perbanyakan tanaman secara generatif dapat menghasilkan tanaman baru yang sifatnya sama atau bahkan lebih baik dari induknya. Tetapi kadang-kadang dapat pula menghasilkan tanaman yang sifatnya lebih buruk daripada tanaman induknya. Sedangkan perbanyakan tanaman secara vegetatif dengan cepat dapat menghasilkan tanaman baru dalam jumlah banyak. (3)

Kultur jaringan merupakan salah satu cara perbanyakan tanaman secara vegetatif. Kultur jaringan merupakan teknik perbanyakan tanaman dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik yang kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus cahaya sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap. (3)

Kultur jaringan juga mempunyai manfaat yang besar di bidang farmasi, karena usaha ini dapat menghasilkan metabolit sekunder untuk upaya pembuatan obat-obatan, yaitu dengan memisahkan unsur-unsur yang terdapat dalam kalus, misalnya alkaloid, steroid dan terpenoid. Dengan ditemukannya cara mendapatkan metabolit sekunder dari kalus suatu eksplan berarti dapat menghemat waktu dan tenaga. Dengan cara

biasa, untuk mendapatkan metabolit sekunder harus harus menunggu lama sampai tanaman cukup umur bahkan sampai berproduksi hingga bertahun-tahun. Sedangkan dengan teknik kultur jaringan hanya membutuhkan waktu antara tiga minggu sampai satu bulan saja. Metabolit yang dihasilkan dari kalus ternyata juga memiliki kadar yang lebih tinggi daripada dengan cara biasa. Dengan cara pengambilan metabolit sekunder dari kalus, biasanya malah dapat diperoleh kandungan lain yang lebih banyak jenisnya, karena seringkali timbul zat-zat alkaloid atau persenyawaan lainnya yang sangat berguna untuk pengobatan. (3)

Secara umum tipe kultur *in vitro* dapat dibagi menjadi enam, yaitu :

1. Kultur tumbuhan sempurna, yaitu biji yang ditabur secara *in vitro* akan berkecambah dan akhirnya berkembang menjadi lebih lanjut.
2. Kultur embrio tumbuhan, yaitu disini ditumbuhkan embrio tumbuhan yang diisolasi dari biji. Untuk ini kulit biji harus dihilangkan lebih dulu.
3. Kultur organ, yaitu suatu organ yang diisolasi ditumbuhkan secara *in vitro*. Perbedaan tipe ini dapat menjadi pembeda antara kultur meristem, kultur pucuk, kultur akar dll. Sering kali bagian (massa jaringan, organ, dll) tumbuhan yang telah diisolasi dapat merupakan suatu eksplan dan kulturnya disebut kultur eksplan.
4. Kultur kalus, yaitu suatu jaringan yang telah berdiferensiasi dapat mengalami diferensiasi kembali secara *in vitro* dan dapat membentuk jaringan yang disebut kalus.

5. Kultur sel tunggal, yaitu menumbuhkan sel secara individual sehingga membentuk suatu jaringan, kalus atau kultur suspensi yang harus dilakukan secara mekanik.
6. Kultur protoplas, yaitu diperoleh dari sel-sel yang dipisahkan dari dinding selnya secara enzimatis. (10)

II.2.2 Media Tanam

Keberhasilan dalam teknologi serta penggunaan metode *in vitro* terutama disebabkan pengetahuan yang lebih baik tentang kebutuhan hara sel dan jaringan yang dikulturkan. Hara terdiri dari komponen yang utama dan komponen tambahan. Komponen utama meliputi garam mineral, sumber karbon (gula), vitamin dan pengatur tumbuh. Komponen lain seperti senyawa nitrogen organik, berbagai asam organik.

Unsur-unsur yang dibutuhkan oleh jaringan tanaman dikelompokkan menjadi dua, yaitu garam-garam anorganik dan zat-zat organik.

1. Garam-garam Anorganik

Setiap tanaman membutuhkan paling sedikit 16 unsur untuk pertumbuhannya yang normal. Pada perbanyakannya dengan kultur jaringan, unsur-unsur tersebut diberikan dengan menambahkannya pada medium agar. Ada unsur yang dibutuhkan dalam jumlah besar yang disebut unsur makro, ada pula yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit tetapi harus tersedia yang disebut unsur mikro.

Jenis-jenis yang termasuk unsur makro adalah Nitrogen (N), Fosfor (P), Kalium (K), Sulfur (S), Kalsium (Ca), dan Magnesium (Mg). Unsur NPK adalah unsur yang mutlak dibutuhkan oleh tanaman, yang berarti harus selalu tersedia. Sedangkan unsur S, Ca dan Mg boleh ada dan boleh tidak, tetapi karena fungsinya sangat mendukung pertumbuhan jaringan maka akan lebih baik apabila unsur-unsur tersebut juga tersedia. Unsur-unsur yang termasuk di dalam unsur mikro adalah Klor (Cl), Mangan (Mn), Besi (Fe), Tembaga (Cu), Seng (Zn), Boron (B), dan Molibdenum (Mo).

Unsur-unsur makro biasanya diberikan dalam bentuk NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan KH_2PO_4 . Sedangkan unsur-unsur mikro biasa diberikan dalam bentuk $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI , $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Unsur Nitrogen bagi tanaman adalah untuk menyuburkan tanaman, sebab unsur N dapat membentuk protein, lemak dan berbagai persenyawaan organik yang lain. Unsur N juga berperan dalam pembentukan hijau daun, dimana hijau daun ini berguna untuk melaksanakan proses pemasakan pada tanaman (proses fotosintesis) yang nantinya akan menghasilkan karbohidrat.

Unsur P terutama dibutuhkan tanaman untuk pembentukan karbohidrat. Maka unsur P ini dibutuhkan secara besar-besaran pada waktu pertumbuhan benih, pembungaan, pemasakan buah dan biji. Unsur K berfungsi memperkuat tubuh tanaman. karena unsur ini dapat

menguatkan serabut-serabut akar sehingga daun, bunga dan buah tidak mudah gugur. Disamping itu, juga memperlancar metabolisme dan mempengaruhi penyerapan makanan.

Unsur S merupakan unsur yang penting untuk pembentukan beberapa jenis protein, seperti asam amino dan vitamin B1. Unsur S juga berperan penting dalam pembentukan bintil-bintil akar. Disamping itu, unsur S juga membantu pembentukan anakan sehingga pertumbuhan dan ketahanan terjamin. Unsur Ca terdapat pada batang dan daun tanaman. Unsur ini bertugas merangsang pembentukan bulu-bulu akar, mengeraskan akar dan merangsang pembentukan biji karena unsur Ca bersama-sama dengan unsur Mg akan memproduksi cadangan makanan.

Dengan menambahkan unsur Mg maka kandungan fosfat dalam tanaman dapat meningkat. Sedangkat kegunaan dari fosfat sendiri adalah sebagai bahan mentah untuk pembentukan sejumlah protein. Dengan terbentuknya protein ini, maka pertumbuhan daun menjadi hijau sempurna dan terbentuk karbohidrat, lemak serta minyak-minyak.

Unsur Fe dibutuhkan sedikit lebih banyak daripada unsur mikro lainnya. Unsur Fe biasa diberikan dalam bentuk $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Didalam kultur jaringan, pemberian unsur Fe juga berfungsi sebagai penyangga yang sangat penting untuk menyangga kestabilan pH media selama digunakan untuk menumbuhkan jaringan tanaman. Pada tanaman, unsur Fe berfungsi untuk pemapasan dan pembentukan hijau daun.

2. Zat-zat organik

Zat-zat organik yang biasa ditambahkan dalam media kultur jaringan adalah sukrosa, mio-inositol, vitamin, asam-asam amino dan zat pengatur tumbuh. (3)

Unsur Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. Ada beberapa golongan senyawa yang dikenal memiliki efek pengaturan yang berbeda dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman, Ada auksin, sitokinin, giberelin, asam absisat, dan etilen. Paling sedikit, ada satu jenis zat pengatur tumbuh yang dihasilkan oleh tanaman yang sedang tumbuh. Namun ada juga bahan lain (sintetik) yang tidak ditemukan dalam tanaman yang efek fisiologisnya mirip atau sama persis dengan bahan yang dihasilkan secara alami. (12)

Zat pengatur tumbuh sangat diperlukan sebagai komponen medium bagi pertumbuhan dan diferensiasi. Tanpa penambahan zat penagatur tumbuh dalam medium, pertumbuhan sangat terhambat bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali. Pembentukan kalus dan organ-organ ditentukan oleh penggunaan yang tepat dari zat pengatur tumbuh tersebut. (3)

Golongan Auksin yang sering ditambahkan dalam medium adalah : 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D), Indol Asam Asetat (IAA), Naftalen Asam Asetat (NAA), Indol Buterik Asetat (IBA). Sedangkan golongan sitokinin yang sering ditambahkan dalam medium adalah Kinetin, Zeatin, dan Benzalaminopurin (BAP). (3)

Auksin yang digunakan secara luas dalam kultur jaringan adalah α -naphthalene acetic acid (NAA) dan 2,4-D. Senyawa lain dengan aktivitas auksin yang juga digunakan dalam kultur jaringan adalah Indole-3-butyric acid (IBA), dan p-chlorophenoxyacetic acid (CPA). (12)

IBA dan IAA memiliki sifat kimia lebih stabil dan mobilitasnya di dalam tanaman rendah. Sifat-sifat inilah menyebabkan pemakaian IBA dan IAA dapat lebih berhasil karena sifat kimianya yang mantap dan pengaruhnya yang lebih lama. Sedangkan 2,4-D merupakan golongan auksin sintesis yang lebih stabil daripada IAA, karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel atau oleh pemanasan pada saat proses sterilisasi. Dibandingkan terhadap IAA, senyawa 2,4-D menunjukkan aktivitas auksin yang lebih tinggi. (3, 11, 12)

Vitamin

Vitamin-vitamin yang sering digunakan dalam media kultur jaringan adalah Tiamin (vitamin B₁), Piridoksin (vitamin B₆) dan asam nikotinat. Vitamin-vitamin ini umumnya terdapat dalam tanaman. Tiamin adalah vitamin yang esensial untuk hampir semua kultur jaringan tumbuhan. Fungsi tiamin adalah untuk mempercepat pembelahan sel pada meristem akar, juga berperan sebagai koenzim dalam reaksi yang menghasilkan

energi dari karbohidrat dan memindahkan energi. Asam nikotinat juga penting dalam reaksi-reaksi enzimatik, disamping berperan sebagai prekursor dari beberapa alkaloid. Pemberian vitamin C bertujuan untuk mencegah terjadinya pencoklatan pada permukaan irisan jaringan. (3)

Unsur-unsur Asam Amino

Asam-asam amino berperan penting untuk pertumbuhan dan diferensiasi kalus. Kebutuhan asam amino untuk setiap tanaman berbeda-beda. Asparagin dan glutamin berperan dalam metabolisme asam amino, karena dapat menjadi pembawa dan sumber ammonia untuk sintesis asam-asam amino baru dalam jaringan (3).

Sumber Karbon

Gula merupakan komponen yang sangat penting dalam nutrisi medium dan sangat diperlukan dalam pertumbuhan dan perkembangan *in-vitro*. Sukrosa sering ditambahkan pada medium kultur jaringan sebagai sumber energi yang diperlukan untuk induksi kalus. Sukrosa dengan konsentrasi 1% - 5 % biasanya digunakan sebagai sumber karbon. Penggunaan sukrosa di atas 3 % menyebabkan terjadinya penebalan dinding sel. Pengaruh rangsangan dari gula terhadap pertumbuhan ditentukan juga oleh cara sterilisasinya. Penggunaan autoklaf untuk sterilisasi dapat memberikan pengaruh baik atau buruk terhadap pertumbuhan, tergantung dari gula yang digunakan dalam medium tersebut. (3)

Unsur Mio-inositol

Penambahan mio-inositol pada medium bertujuan untuk membantu diferensiasi dan pertumbuhan sejumlah jaringan. Bila mio-inositol diberikan bersama dengan auksin, kinetin dan vitamin, maka dapat mendorong pertumbuhan jaringan kalus. (3)

Mio-inositol ditambahkan ke dalam media kultur sebagai faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dengan kadar 100 mg/l. (4)

Media tanam dalam kultur jaringan adalah tempat untuk tumbuh eksplan. Media yang digunakan dalam kultur jaringan tumbuhan terdiri dari beberapa komponen yaitu garam-garam, vitamin, asam amino, hormon pertumbuhan, gula, agar dan air. Media tanam tersebut dapat berupa larutan (cair) atau padat. Media cair berarti campuran komponen-komponen zat kimia dengan air suling, sedangkan media padat adalah media cair tersebut dengan ditambah zat pematat agar. (3, 17)

Agar ialah suatu derivat rumput laut, yang dapat diperoleh dalam bentuk pellet dan merupakan suatu polisakarida dengan massa molekul yang tinggi yang dapat digunakan sebagai suatu bahan pengental pada sebagian besar media hara. Agar yang dilarutkan membentuk suatu gel yang dapat mengikat air (konsentrasi agar yang tinggi akan mengikat air lebih kuat) dan mengabsorpsi senyawa-senyawa. Ahli kultur jaringan tumbuhan menggunakan agar dengan konsentrasi 0,6-0,8 %. Jika konsentrasi agar dikurangi, mengakibatkan hubungan (kontak) eksplan dan medium menjadi lebih sulit, serta membatasi kecepatan penyerapan

senyawa. Pada kadar yang lebih tinggi media akan menjadi lebih keras sehingga menghambat difusi zat gizi ke dalam jaringan. (4, 10, 15)

Dalam pembuatan medium hara kualitas air perlu diperhatikan benar-benar karena 95 % medium hara terdiri dari air. Air yang digunakan dalam seluruh media kultur jaringan, termasuk air yang digunakan selama pengerjaan aseptis, seharusnya aqua bidestillata atau air suling bebas mineral. Untuk air suling yang disimpan terlalu lama dalam wadah polietilen, perlu dipertimbangkan adanya bahan yang dilepas dari wadah dan bersifat toksik terhadap kultur. (4, 10)

Media MS (*Murashige dan Skoog*) adalah media yang paling banyak digunakan dalam kultur jaringan dan telah terbukti efektif untuk pertumbuhan dari jenis tanaman monokotil maupun dikotil, selain itu media ini juga paling banyak digunakan untuk induksi kalus. Pada umumnya, larutan garam *Murashige dan Skoog* (MS) akan mendukung pertumbuhan kebanyakan sel tumbuhan dalam kultur, dan medium ini mempunyai konsentrasi garam-garam mineral yang tinggi. Media MS adalah media yang kaya akan garam-garam dan tidak sesuai untuk tanaman tertentu. Untuk mencegah itu media MS tidak digunakan dengan konsentrasi makroelemen yang sebenarnya, tetapi dengan konsentrasi makroelemen setengah atau sepertiga dari konsentrasi yang seharusnya diberikan. (3, 13, 14, 17)



Sterilisasi Alat dan Medium

Alat-alat yang akan digunakan untuk kultur jaringan, setelah dicuci dan dikeringkan kemudian dibungkus dengan kertas perkamen dan disterilisasi di dalam autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 15 lb, dan lama sterilisasi 20 – 30 menit.

Botol-botol eksplan yang sudah berisi medium setelah ditutup dengan aluminium foil, kemudian disterilisasi. Sterilisasi medium lebih sedikit waktunya dibandingkan dengan sterilisasi alat-alat, yakni 15 menit, tetapi suhu dan tekanannya sama. (3).

Sterilisasi eksplan

Sterilisasi eksplan dapat dilaksanakan dengan dua cara, yaitu secara mekanik dan secara kimia.

a. Sterilisasi Eksplan secara Mekanis

Cara ini digunakan untuk eksplan yang keras atau berdaging, yaitu dengan membakar eksplan tersebut di atas lampu spiritus sebanyak tiga kali.

b. Sterilisasi Eksplan secara Kimiawi

Sterilisasi secara kimiawi digunakan untuk eksplan yang lunak (jaringan muda) seperti daun, tangkai daun, anther dan sebagainya. Bahan-bahan kimia yang dapat digunakan untuk sterilisasi antara lain sodium hipoklorit, merkuri klorit, dan alkohol 70 %. (3)

II.2.4 Kultur Kalus

Kalus adalah suatu kumpulan *sel amorphous* yang terjadi dari sel-sel jaringan yang membelah diri secara terus menerus. Secara *in vivo*, kalus pada umumnya terbentuk pada bekas-bekas luka akibat serangan infeksi mikroorganisme, gigitan atau tusukan serangga dan nematoda. Kalus juga terbentuk sebagai akibat stress. (5)

Kalus merupakan salah satu wujud dari dediferensiasi. Dediferensiasi adalah jaringan dewasa yang masih hidup yang telah mempunyai fungsi tertentu menjadi meristematis kembali. (16)

Sel-sel penyusun kalus berupa sel parenkim yang mempunyai ikatan yang renggang dengan sel-sel lain. Dalam kultur jaringan, kalus dapat dihasilkan dari potongan organ yang telah steril, di dalam media yang mengandung auksin dan kadang-kadang juga sitokinin. Organ tersebut dapat berupa kambium vaskular, parenkim cadangan makanan, kotiledon, mesofil daun dan jaringan provaskular. Kalus mempunyai pertumbuhan yang abnormal dan berpotensi untuk berkembang menjadi akar, tunas atau embrio yang nantinya akan dapat membentuk plantlet. (5)

Banyak sekali faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan kecepatan pertumbuhan kultur kalus. Faktor tersebut antara lain macam dan kadar hormon pertumbuhan yang dipakai, macam dan kadar sumber karbon, kadar makroelemen yang dipakai misalnya kadar nitrat, fosfat dan lain-lain, macam dan kadar zat kompleks yang ditambahkan pada media seperti kasein hidrolisat, air kelapa dan lain-lain serta kondisi lingkungan

kultur seperti cahaya dan suhu ruangan kultur. Dengan melakukan variasi terhadap variabel tersebut, kita dapat mencari keadaan yang optimal untuk pertumbuhan kultur. (4)

Adapun faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan kalus pada kultur jaringan antara lain:

1. Keasaman (pH)

Sel-sel tanaman yang dikembangkan dengan teknik kultur jaringan mempunyai toleransi pH yang relatif sempit dengan titik optimal 5,0-6,0. Bila eksplan sudah mulai tumbuh, pH dalam lingkungan kultur akan naik apabila nutrisi habis terpakai. Senyawa dapar fosfat dalam media kultur jaringan mempunyai peran yang penting dalam menstabilkan pH. Pengukuran pH dapat dilakukan dengan pH meter, atau bila menginginkan yang lebih praktis dan murah dapat digunakan kertas pH. Bila ternyata pH media masih kurang normal, maka dapat ditambahkan KOH 1-2 tetes. Sedangkan apabila pH melampaui batas normal, dapat dinetralkan dengan meneteskan HCl. (3)

2. Kelembaban

Kelembaban relatif lingkungan biasanya mendekati 100 %. RH sekeliling kultur mempengaruhi pola pengembangan. Jadi, pengaturan RH pada keadaan tertentu memerlukan suatu bentuk diferensiasi khusus. (3)

3. Cahaya

Cahaya sangat mempengaruhi pertumbuhan kalus. Eksplan dari jaringan yang berhijau daun seperti daun melon, daun tembakau, daun

bawang putih dan lain sebagainya membutuhkan penyinaran selama menumbuhkan kalusnya. Sedangkan jaringan yang tidak berhijau daun seperti tunas pucuk dari bawang putih, endosperm kacang kedelai, endosperm wortel, embrio jeruk, anther padi dan sebagainya membutuhkan suasana yang gelap untuk pertumbuhan kalusnya. (3)

Pembelahan sel dari eksplan dan pertumbuhan dari kalus dihambat oleh cahaya. Umumnya pembentukan kalus maksimum sering terjadi di tempat yang gelap. Contohnya pada kondisi inkubasi gelap akan menghasilkan pertumbuhan kalus tertinggi pada irisan akar dari wortel (*Daucus carota*), dan irisan akar dari jagung (*Zea mays*). (5, 6)

Disisi lain ada beberapa tumbuhan yang pembelahan sel dari eksplan dan pertumbuhan dari kalus tidak dihambat oleh cahaya, bahkan cahaya ini diperlukan untuk hasil yang optimal. Contoh kalus dari kuncup pohon cemara (*Pseudotsuga menziesii*) akan terbentuk pada kondisi inkubasi terang. Semua ini tergantung dari spesies tanaman tersebut. (5, 6)

Suasana gelap dalam ruang inkubasi dapat diciptakan dengan memasang kain hitam seluas kotak pada rak tersebut. Dengan cara demikian dapat terjadi pula bahwa di dalam ruang inkubasi tersebut beberapa kotak ditutup kain hitam dan kotak-kotak yang lain dibiarkan terbuka dan disinari dengan lampu neon. (3)

4. Temperatur

Temperatur yang dibutuhkan untuk dapat terjadi pertumbuhan yang optimal umumnya adalah berkisar antara 20°-30°C. Faktor lingkungan, di samping faktor makanan (media) yang cocok, dapat mempengaruhi pertumbuhan dan differensiasi. (3)

Pemilihan eksplan

Kultur kalus dapat diperoleh dari banyak jenis pada organ tanaman seperti akar, daun, tangkai daun, tunas dan tipe yang lebih spesifik dari sel seperti endosperma, serbuk sari dan lain- lain. Untuk mendapatkan kultur dengan kandungan senyawa kimia alami yang cukup besar, kualitas tanaman asalnya harus diperhatikan. Bila tanaman dengan kualitas baik telah dipilih dan jenis organ telah ditentukan, pilihlah jaringan yang muda, karena lebih mudah menginduksi kalus dari jaringan yang relatif muda. (4, 13)

Penyiapan dan sterilisasi eksplan

Pada prinsipnya ada empat macam sumber infeksi: tumbuhan, medium hara (yang tidak cukup steril), udara dan peneliti (ketidackermatan dalam bekerja). Hal yang terpenting adalah tumbuhan itu sendiri dan materi tumbuhan harus disterilisasi sebaik-baiknya sebelum diisolasi secara *in vitro*. (10)

Organ tanaman biasanya tercemar oleh berbagai macam mikroba. Dengan adanya media kultur jaringan yang mengandung sumber karbon seperti sukrosa, pertumbuhan mikroba yang relatif lebih cepat daripada

sel tanaman akan mengganggu pertumbuhan sel tanaman bahkan dapat mematikannya. Karena itu pada setiap pengerjaan dengan sistem kultur jaringan diperlukan suasana bebas mikroba. (4)

Banyak zat kimia yang dapat digunakan untuk sterilisasi eksplan. Pemilihan zat untuk sterilisasi dan lamanya waktu sterilisasi sangat tergantung pada kepekaan eksplan yang ada. Bahan-bahan kimia yang dapat digunakan untuk sterilisasi antara lain Sodium hipoklorit (Clorox) dengan konsentrasi yang digunakan berkisar 5 %- 10 % dan waktunya antara 5-10 menit, sublimat 0,05 %, dan alkohol 70 %. (3, 4)

Sebelum memulai sterilisasi, beberapa sisa tanah atau bagian yang mati, dan lain-lain harus dihilangkan (dibuang) dari tumbuhan (atau bagian tumbuhan). Untuk ini, harus dilakukan pencucian dengan air, jika kontaminasi amat buruk (misalnya kentang atau rhizoma yang tumbuh di dalam tanah). Sebagian besar lapisan terluar dapat dihilangkan dengan cara mengelupas/menguliti. Setelah langkah ini, sterilisasi dapat dimulai, biasanya organ direndam dalam alkohol 70% selama beberapa detik (bukan alkohol 96% karena terlampau kuat, sehingga dapat mengakibatkan dehidrasi), untuk menghilangkan gelembung udara, kemudian dilakukan sterilisasi selama 5-30 menit dalam 1% NaClO yang mengandung beberapa tetes tween (20-80) dan bilas (untuk menghilangkan hipoklorit) dengan air (biasanya 3 kali, masing-masing selama 2, 5, dan 15 menit). Setelah langkah kerja tersebut, dapat dimulai pemotongan bagian tumbuhan menjadi irisan kecil, dalam keadaan steril

(dilakukan di dalam Laminar Air Flow), dan menggunakan alat-alat steril (ditempatkan dalam alkohol 96%, yang kemudian disterilasi dengan nyala api). (10)

Induksi kalus, subkultur dan pemeliharaan kultur kalus

Eksplan yang sudah siap ditanam (sudah steril), dipotong-potong dengan menggunakan scalpel di dalam cawan petri. Irisan eksplan dapat berbentuk segi empat, silinder, segitiga, dan sebagainya tergantung dari macam eksplannya. Potongan eksplan dimasukkan ke dalam botol kultur yang berisi media tumbuh, hingga permukaan yang teriris bersentuhan dengan medium. Selanjutnya botol kultur ditutup kembali dan diinkubasikan di dalam ruang inkubator dengan suhu dan intensitas cahaya yang disesuaikan. (3)

Dalam waktu 3-8 minggu, eksplan akan tumbuh menjadi kalus. Kalus adalah suatu massa sel yang terbentuk pada permukaan eksplan atau pada irisan eksplan. Kalus ini akan tumbuh pada eksplan di media padat, sedangkan pada eksplan di media cair akan tumbuh protokormus. (3)

Subkultur adalah usaha untuk mengganti media tanam kultur jaringan dengan media yang baru, sehingga kebutuhan nutrisi untuk pertumbuhan kalus dapat terpenuhi. (3)

Pertumbuhan kalus selama periode waktu tertentu setelah disubkultur dapat diukur secara kuantitatif antara lain dengan parameter pertambahan bobot kalus segar atau bobot kalus kering, kemudian dibuat

kurva hubungan antara waktu dengan bobot kalus segar atau bobot kalus kering sehingga dapat diketahui fase-fase pertumbuhan kalus. Fase-fase pertumbuhan kalus tersebut meliputi fase lag, yaitu fase dimana belum terjadi pertumbuhan kalus secara nyata; fase eksponensial, yaitu fase mulai terjadinya pertumbuhan kalus, diikuti dengan fase linier, dimana pertumbuhan kalus terus naik menyerupai garis lurus ke atas sampai berhenti; fase stasioner, yaitu fase pertumbuhan kalus yang menurun dan menjadi berhenti. (5)



BAB III
PELAKSANAAN PENELITIAN

III. 1 Alat dan Bahan yang digunakan

Alat- alat yang digunakan adalah autoklaf, botol kultur, cawan petri, gunting, Laminar Air Flow (LAF), Lampu TL 40 watt, oven, pH meter, pinset, pisau steril.

Bahan-bahan yang digunakan adalah biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*), media *Murashige dan Skoog* (MS), hormon tumbuh 2,4-diklorofenoksi asetat, agar, alkohol 70 %, natrium hipoklorit, air suling.

III. 2 Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS (*Murashige dan Skoog*). Formula media MS dapat dilihat pada lampiran hal. 40-41. Disiapkan larutan stok mikro dan makro nutrien, elemen besi, vitamin dan mio inositol untuk pembuatan media MS. Masing-masing larutan stok dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer yang berisi 250 ml air suling. Kemudian ditambahkan hormon tumbuh 2,4 diklorofenoksiasetat (2,4-D) dengan konsentrasi 1 mg/l. Ke dalam larutan media ditambahkan 20 gram sukrosa, aduk sampai larut. Dicukupkan volumenya hingga 500 ml. Selanjutnya ditetapkan pH nya sekitar 5,7-5,8. Jika pH dibawah 5,7 ditambahkan beberapa tetes KOH 10%, jika pH diatas 5,8 ditambahkan HCl 2% beberapa tetes. Dimasukkan agar-agar lalu dipanaskan sampai larut. Setelah agar larut, 20 ml media dituang ke dalam botol

kultur yang telah disterilisasi dalam oven. Setelah terisi, botol kultur di tutup rapat.

III. 3 Penyiapan Eksplan

Buah mahkota dewa dicuci dengan air mengalir. selanjutnya buah dibelah dan diambil bagian bijinya. Biji dipisahkan dari kulit biji yang kemudian diambil sebagai eksplan.

III. 4 Sterilisasi

III. 4. 1 Sterilisasi Alat

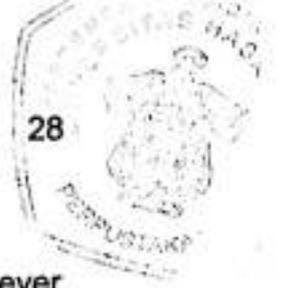
Alat-alat yang akan digunakan untuk kultur dicuci, kemudian dikeringkan, masing-masing alat dibungkus dengan kertas perkamen, dimasukkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C , tekanan $1,5 \text{ kg/cm}^2$, selama 20–30 menit.

III. 4. 2 Sterilisasi Media

Botol media ditutup dan diusahakan supaya benar-benar tertutup rapat, botol-botol media dimasukkan ke dalam autoklaf dan disterilisasi dengan suhu 121°C , dan tekanan $1,5 \text{ kg/cm}^2$ selama 15-20 menit, Botol-botol media yang sudah steril diangkat, kemudian disimpan di tempat yang sejuk sampai siap untuk penanaman eksplan.

III. 4. 3 Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan dengan menggunakan larutan Bayclin[®] (mengandung NaOCl 5,25%). Larutan Bayclin[®] diencerkan dengan perbandingan 1:4 (25 ml bayclin dalam 100 ml air) dan ditambahkan tween-20 sebanyak satu tetes. Eksplan yang sebelumnya telah dicuci



bersih dan dicuci dalam alkohol 70% dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi larutan Bayclin®, dan digoyang-goyang dengan arah memutar mendatar selama kurang lebih 3 menit, eksplan dikeluarkan dari erlenmeyer kemudian dicuci dengan air suling steril sebanyak 3 kali, masing-masing selama 3 menit, eksplan diambil dengan pinset dan diletakkan di atas cawan petri yang ada kertas saringnya. Eksplan sudah siap untuk ditanam.

III. 4. 4 Sterilisasi Ruangan

Ruang *Laminar Air Flow* (LAF) disemprot dengan alkohol 70 %. Jika LAF dilengkapi dengan lampu UV, maka sebelum digunakan lampu UV dinyalakan. Sebelum ruangan kultur digunakan, sebaiknya lampu UV dinyalakan untuk sterilisasi di dalam ruangan kultur. Ketika akan memasuki ruangan, lampu UV dimatikan dan lampu neon dinyalakan. Ketika akan meninggalkan ruangan, lampu neon dimatikan dan lampu UV dinyalakan kembali untuk menjaga kondisi ruangan tetap steril.

III. 5 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Eksplan yang telah siap untuk ditanam dipotong dengan menggunakan pisau steril dalam cawan petri. Potongan eksplan dimasukkan ke dalam botol kultur yang berisi media tumbuh hingga permukaan yang teriris bersentuhan dengan media, dan ditutup kembali dengan rapat. Diinkubasi dengan suhu dan intensitas cahaya yang divariasikan yaitu sebagian botol kultur diinkubasi pada kondisi gelap dan sebagian lagi diinkubasi pada

kondisi terang. Suasana gelap dalam ruang inkubasi diciptakan dengan memasang kain hitam seluas kotak pada rak tersebut dan kotak-kotak yang lain dibiarkan terbuka dan disinari dengan lampu neon.

III. 6 Subkultur

Subkultur dilakukan tiap 4 minggu dengan media yang sama dengan media awal. Subkultur dilakukan dengan mengambil kalus yang terbentuk lalu dipotong-potong dengan pisau steril pada cawan petri. Selanjutnya diletakkan pada media baru yang komposisinya sama dengan media awal. Botol kultur ditutup rapat dan diinkubasi dengan suhu dan intensitas cahaya yang divariasikan yaitu sebagian botol kultur diinkubasi pada kondisi gelap dan sebagian lagi diinkubasi pada kondisi terang.

III. 7 Pengumpulan Data

Data diperoleh dari pengamatan masing-masing perlakuan dengan mengamati perubahan sel atau jaringan menjadi kalus dan warna kalus. Kemudian dilakukan identifikasi dan analisis golongan kandungan kimia terhadap kalus yang diperoleh.

III.8 Identifikasi

Kalus segar yang diperoleh dikumpulkan dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C. Kalus kering diekstraksi dengan metanol kemudian ditotolkan pada lempeng silika gel dengan pembanding ekstrak daging buah mahkota dewa dengan menggunakan eluen etil asetat 100%, heksan : etil asetat (1:1), dan heksan : etil asetat (3:1). Noda yang dihasilkan kemudian diamati.

III. 9 Pembahasan Hasil

Pembahasan dilakukan terhadap data yang telah diperoleh.

III. 10 Pengambilan Kesimpulan

Kesimpulan diambil berdasarkan hasil pembahasan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Penelitian pengaruh kondisi inkubasi gelap atau terang terhadap pertumbuhan kalus biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh hasil sebagai berikut :

1. Bobot basah kalus pada kondisi inkubasi terang adalah 1,1448 gram dan bobot kering kalus adalah 0,1264 gram.
2. Bobot basah kalus pada kondisi inkubasi gelap adalah 1,3640 gram dan bobot kering kalus adalah 0,1783 gram.
3. Kalus biji mahkota dewa memiliki nilai Rf yang relatif sama dengan nilai Rf daging buah tanaman asalnya.

IV.2 Pembahasan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Pertanian PKP Unhas selama kurang lebih 6 bulan. Pada penelitian ini digunakan eksplan dari biji mahkota dewa. Karena pada biji tingkat kontaminasinya lebih kecil dibandingkan dengan menggunakan daun. Pada awalnya eksplan yang digunakan adalah daun mahkota dewa, namun sulit untuk mengatasi kontaminasi yang terjadi meskipun telah dilakukan berbagai metode sterilisasi eksplan, sehingga dipilih biji mahkota dewa sebagai eksplan.

Media yang digunakan adalah Media MS (*Murashige dan Skoog*) karena merupakan media yang paling banyak digunakan untuk induksi kalus. Pada media MS (*Murashige dan Skoog*) ditambahkan zat pengatur tumbuh yaitu hormon tumbuh asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) dengan konsentrasi 1 mg/l.

Eksplan berupa biji mahkota dewa yang sudah siap ditanam terlebih dahulu dilakukan proses sterilisasi dengan menggunakan larutan natrium hipoklorit. Hal ini dilakukan untuk mencegah kontaminasi yang mungkin timbul dari eksplan itu sendiri. Kemudian dipotong-potong dengan menggunakan scalpel di dalam cawan petri. Selanjutnya potongan eksplan ditanam dalam botol kultur yang berisi media MS yang telah ditambahkan zat pengatur tumbuh 2,4-D pada konsentrasi 1mg/l. Selanjutnya botol kultur ditutup kembali dan diinkubasikan di dalam ruang inkubator dengan suhu dan intensitas cahaya yang disesuaikan yaitu sebagian di inkubasikan pada kondisi gelap dan sebagian lagi pada kondisi terang dan diamati perkembangannya.

Seperti halnya pertumbuhan tanaman dalam kondisi *in-vivo*, cahaya juga mempengaruhi pertumbuhan eksplan dalam kultur *in-vitro*. Atas dasar inilah, pada penelitian ini saya ingin mengetahui kondisi lingkungan berupa cahaya yang optimal (gelap atau terang) untuk pertumbuhan kalus biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*).

Eksplan biji Mahkota Dewa yang ditanam di dalam medium mulai memperlihatkan respon pertumbuhan pada minggu kedua. Pembentukan

kalus dimulai dari pinggiran eksplan yang terluka dan selanjutnya akan menutupi permukaan eksplan. Pada sel yang rusak akibat perlukaan terjadi otolisis dan dari sel yang rusak tersebut dihasilkan senyawa-senyawa yang merangsang pembelahan sel di lapisan berikutnya sehingga terbentuk kalus. Jika kalus sudah terbentuk, dilakukan penimbangan terhadap bobot kalus yang terbentuk itu. Penimbangan dilakukan tiap minggu.

Massa kultur yang ditumbuhkan terlalu lama dalam media yang tetap, akan menyebabkan terjadinya kehabisan hara dan air. Kehabisan hara dan air dapat terjadi karena selain terhisap untuk pertumbuhan juga karena media menguapkan air dari masa ke masa. Kalus tersebut kecuali kehabisan unsur hara, kalus juga mengeluarkan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan kalus itu sendiri. Untuk itulah, kalus yang dihasilkan perlu disubkulturkan. Subkultur dilakukan 28 hari sekali (4 minggu sekali). Pada minggu keempat, dilakukan subkultur dengan memindahkan kalus yang telah terbentuk pada media baru yang sama. Subkultur ini dilakukan sebanyak dua kali tiap 4 minggu dan diamati pertambahan bobot kalus tiap minggunya.

Tekstur kalus yang dihasilkan pada kalus adalah agak remah pada bagian atas dan bertekstur kompak pada bagian bawahnya. Pada kondisi terang dan gelap kalus yang terbentuk pada awal pertumbuhan berwarna putih. Pada tahap selanjutnya kalus mulai berwarna putih kekuningan dan akhirnya warna kalus menjadi putih kecoklatan pada bagian dasar

pinggiran kalus. Setelah disubkultur, kalus yang sebelumnya kecoklatan perlahan-lahan kembali berwarna putih kekuningan diiringi pertumbuhan yang semakin membesar. Kalus yang berumur satu bulan setelah subkultur kedua pada kondisi gelap berwarna putih kekuningan dan pada kondisi terang berwarna putih kecoklatan.

Berdasarkan pengamatan, belum terjadi pembentukan kalus pada minggu awal penanaman eksplan, pertumbuhan kalus pada minggu kedua juga belum terlalu tampak, pada minggu ketiga pertumbuhan kalus meningkat pesat namun pada minggu keempat pertumbuhannya menurun lagi. Hal yang sama juga terjadi pada subkultur, pada minggu awal belum tampak penambahan bobot kalus, pada minggu kedua bobot kalus mulai bertambah, pada minggu ketiga terjadi perkembangan yang pesat dan minggu keempat menurun lagi.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus pada biji mahkota dewa sesuai dengan fase pertumbuhan kalus yaitu fase dimana belum terjadi pertumbuhan kalus secara nyata (fase lag), fase mulai terjadinya pertumbuhan kalus (fase eksponensial), dan diikuti dengan fase linier, dimana pertumbuhan kalus terus naik menyerupai garis lurus ke atas sampai berhenti menjadi fase stasioner, yaitu fase pertumbuhan kalus yang menurun dan menjadi berhenti.

Dari kedua perlakuan kondisi cahaya, yang menunjukkan bobot kalus biji Mahkota Dewa paling tinggi adalah pada kondisi inkubasi gelap dibandingkan dengan kondisi inkubasi terang. Hal ini mungkin karena biji

merupakan sumber auxin dan konsentrasi auksin lebih tinggi pada bagian tanaman yang tidak tersinari dibandingkan dengan tanaman yang tersinari, yang mana hormon auksin sangat berperan dalam pertumbuhan kalus. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi lingkungan yang optimum untuk pertumbuhan kalus biji mahkota dewa adalah kondisi inkubasi gelap.

Kalus yang diperoleh setelah berumur 1 bulan setelah subkultur kedua kemudian dipanen, selanjutnya dikumpulkan dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C. Setelah itu, diidentifikasi kandungan kalus dengan metode Kromatografi Lapis Tipis. Kalus yang telah kering kemudian diekstraksi dengan menggunakan metanol dan selanjutnya ditotolkan pada lempeng Kromatografi Lapis Tipis dengan pembanding ekstrak daging buah mahkota dewa.

Kultur jaringan mempunyai manfaat yang besar di bidang Farmasi, karena dari usaha ini dapat menghasilkan metabolit sekunder untuk upaya pembuatan obat-obatan. Produksi metabolit sekunder dipengaruhi oleh jenis eksplan, seperti produksi diterpane glycosida yang optimal diperoleh dari kultur daun *Nicotiana attenuata* (Keinanen dkk. 2001) dan produksi shikonin juga diperoleh dari kultur akar *Lithospermum erythrorhizon* (Kazufumi 2001).

Selain jenis eksplan, perbedaan kondisi kultur juga mempengaruhi kualitas dan kuantitas senyawa metabolik sekunder yang dihasilkan. Kazufumi *et.al.* (2001) menyatakan bahwa cahaya dan auksin merupakan dua faktor yang sangat mempengaruhi produksi falvonoid dan pigmen

lainnya dalam kultur. Kultur sel dan sel suspensi yang ditanam dalam kondisi terang (dengan pencahayaan) memproduksi enzim yang berperan dalam biosintesis flavonoid, sehingga produksi flavonoid pada sel tersebut meningkat. Pada kultur sel parsley misalnya, aktivitas enzim phenylalanine amonia-lyase (PAL), cinnamic acid-4-hydroxylase dan p-coumarate: CoA ligase meningkat setelah sel parsley diinkubasikan di bawah penyinaran sehingga flavonoid diproduksi oleh sel tersebut. Akan tetapi tidak semua senyawa metabolik sekunder dapat meningkatkan produksinya pada suasana kultur terang. Pada kultur kalus *Catharanthus roseus*, kandungan ajmalisin lebih tinggi pada kondisi gelap dibandingkan pada kondisi terang (Retno, 2004).

Kalus biji mahkota dewa yang sebelumnya telah diekstraksi selanjutnya ditotolkan pada lempeng KLT bersama dengan ekstrak daging buah mahkota dewa dan dielusi dengan eluen tertentu. Pada eluen etil asetat 100%, pada ekstrak kalus biji dan ekstrak daging buah diperoleh noda yang menumpuk pada bagian atas dari lempeng pada UV 254 dan dengan penyemprotan H_2SO_4 , pada UV 366 ada satu noda yang tampak pada ekstrak daging buah, yang tidak tampak pada ekstrak kalus biji, dan dengan penyemprotan H_2SO_4 ada beberapa noda yang tampak pada ekstrak kalus biji yang tidak tampak pada ekstrak daging buah.

Pada ekstrak daging buah didapatkan satu noda dengan nilai Rf 0,5 pada UV 254, UV 366, dan dengan penyemprotan H_2SO_4 yang mana noda ini tidak tampak pada ekstrak kalus biji serta ada beberapa noda

yang menumpuk di batas atas lempeng KLT yang terdapat pada ekstrak kalus biji dan daging buah yang dielusi dengan eluen heksan : etil asetat (1:1). Pada eluen heksan : etil asetat (3:1), pada UV 254 tidak terdapat noda sama sekali, dan pada UV 366 terdapat satu noda dengan nilai Rf 0,8 pada ekstrak daging buah yang tidak nampak pada ekstrak kalus biji, serta dengan penyemprotan H_2SO_4 diperoleh noda pada ekstrak daging buah dan kalus biji dengan Rf yang sama yaitu 0,6 dan 0,05. .

Dari hasil profil KLT dapat dikatakan bahwa Kalus biji mahkota dewa memiliki nilai Rf yang relatif sama dengan nilai Rf daging buah tanaman asalnya.

BAB V PENUTUP

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, maka dapat disimpulkan bahwa kondisi lingkungan berupa cahaya yang optimum untuk pertumbuhan kalus biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang ditumbuhkan pada media MS (*Murashige Skoog*) dengan penambahan 2,4-D 1 mg/l adalah kondisi gelap dengan profil KLT kalus biji mahkota dewa memiliki nilai Rf yang relatif sama dengan Rf daging buah tanaman asalnya.

V.2 Saran

Saran yang dapat dikemukakan dari hasil penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut mengenai identifikasi kandungan senyawa-senyawa yang terdapat di dalam kalus biji mahkota dewa pada kondisi lingkungan gelap maupun terang.
2. Perlu dilakukan isolasi senyawa-senyawa yang terdapat di dalam kalus biji mahkota dewa.

DAFTAR PUSTAKA

1. Harmanto N. *Mahkota dewa obat pusaka para dewa*. Agromedia Pustaka. Jakarta. 2003. hal. 1, 5-11.
2. Christy D. Pengaruh Kadar Sukrosa dan Kondisi Inkubasi Terang dan Gelap Terhadap Metabolit Sekunder dari Kultur Suspensi Sel Selasih. *Skripsi Fakultas Farmasi UGM*. Yogyakarta. 1995. hal. 1.
3. Hendaryono DPS & Wijayani A. *Teknik kultur jaringan*. Kanisius. Yogyakarta. 1994. hal. 20, 26-27, 33-34, 55-56, 59-63, 68-69, 89-92.
4. Indrayanto G. *Kultur Jaringan Tanaman*. PAU Bioteknologi. UGM. Jogjakarta. 1988. hal. 28, 40-41, 29, 55.
5. George EF & Sherrington PD. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics Limited. 1984. hal. 17, 147, 184, 288.
6. Wetter LR & Constabel F. *Metode kultur jaringan tanaman*, terjemahan oleh Mathilda B. Widiyanto. Ed. 2. ITB. Bandung. 1991. hal. 10-11.
7. Winarto. *Mahkota dewa : budi daya dan pemanfaatan untuk obat*. Penebar Swadaya, Jakarta. 2003. hal. 2-9.
8. Arini S, Nurmawan D, Alfiani F, Hertiani T. Daya antioksidan dan kadar flavonoid hasil ekstraksi etanol-air daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.). *Buletin Penalaran Mahasiswa UGM*. 2003. 10 (1); 2-6.
9. Mae Sri Hartati W. Phalerin, glukosida benzofenon baru diisolasi dari ekstrak metanolik daun Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (scheff.) Boerl.]. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2005; 16 (1); 57.
10. Lukas. *Kultur Jaringan Tumbuhan*. Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Institut Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Surabaya. 1991. hal. 1, 27, 34, 63-64, 101.
11. Wattimena GA. *Diktat zat pengatur tumbuh tanaman*. Lab Kultur Jaribgan Tanaman IPB. Bogor. 1987. hal 161.
12. Staba EJ. *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida. 1982. hal. 44-45.

13. Butchner DN dan Ingram DS. *Plant Tissue Culture*. Edward Arnold (publisher) ltd. New York. 1974. hal. 1-2, 55.
14. Dixon RA. *Plant Cell Culture, a practical approach*. IRL Press. Oxford, Washington DC. 1987. hal. 4, 10.
15. Pierik RLM. *In Vitro Culture Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publisher. 1987. hal. 54-55, 60, 213-217.
16. Suryowinoto M. *Petunjuk laboratorium: pemuliaan tanaman secara in vitro*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 1991. hal. 36-38.
17. Kors FTM. *Biochemicals plant cell and tissue culture*. Duchefa Bochemie BV. Netherlands. 2000. hal. 7, 50.
18. Abidin Z. *Dasar-Dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Penerbit Angkasa. Bandung. 1993. hal 19-20, 31.
19. Gunawan LW. *Teknik Kultur Jaringan*. Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi. IPB. Bogor. 1987. hal. 167-181.
20. Prihartini R. Pengaruh Pencahayaan dan Elisitasi Sinar Ultra Violet Terhadap Kandungan Ajlaminin Pada Kultur Kalus *Catharanthus roseus*. 9 februari 2004. T 583.75 PRI p.
21. Kazufumi Y, 2001. Root-specific production of secondary metabolites: Regulation of shikonin biosynthesis by light in *Lithospermum erythrorhizon*. *Natural Medicines* 55 (2): 49-54.
22. Keinanen M, Oldham NJ, Baldwin IT, 2001. Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (8): 3553-3558.